

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**  
**INSTITUTO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



1218 ~ 2018



**TESIS DOCTORAL**

---

Análisis genómico y funcional de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> como bioinoculante agrícola y estudio de la regulación del operón *celABC* en la biosíntesis de celulosa bacteriana.

Memoria presentada por **Alexandra Díez Méndez** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Fdo. Alexandra Díez Méndez

Salamanca, 2019



**D. Raúl Rivas González, Profesor Titular del área de Microbiología y D. Pedro F. Mateos González, Catedrático del área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad De Salamanca,**

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Análisis genómico y funcional de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> como bioinoculante agrícola y estudio de la regulación del operón *celABC* en la biosíntesis de celulosa ”, elaborada por Doña Alexandra Díez Méndez y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de Doctora.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 13 de junio 2019.

Fdo.: Dr. D. Raúl Rivas González

Fdo.: Dr. D. Pedro F. Mateos González



## Agradecimientos.

¡Ya ha llegado...el final de un camino que comenzó un septiembre de 2012, casi 7 años! Desde mucho ha cambiado esa chica que entró a la que termina esta etapa.

A lo largo de esta trayectoria, como es propio, ha habido tanto alegrías como tristezas, que todas ellas han permitido que hoy pueda escribir estas palabras como fruto del trabajo realizado.

Me gustaría agradecer a mis directores de Tesis el Dr. Raúl Rivas y el Catedrático Dr. Pedro F. Mateos por haberme permitido estudiar a *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, cuyo nombre seguro que esta mal escrito en alguna de las páginas venideras. Además, y de manera particular me gustaría agradecer al Dr. Raúl Rivas por haberme dado la oportunidad de entrar y conocer a personas maravillosas personas que han formado parte de este grupo, ya que a muchos de ellos les puedo llamar amig@s, así como su comprensión en las circunstancias personales complicadas que han ocurrido... Gracias.

Al Dr. Pedro F Mateos, le quiero agradecer todo lo que me ha enseñado sobre celulasas, ALA10B2<sup>T</sup>, microscopía, que han hecho de mí la “científica que soy”, por todas las historias, relatos, charlas ya fueran científicas o de otra índole, por los cafés, y por siempre tener la puerta abierta para recibirme.... Gracias.

También quiero agradecer a la Dra. Encarna Velázquez por darme la oportunidad en su día de trabajar con ella, aunque luego tuviera la “suerte” de que me concedieran un contrato predoctoral, siempre has estado con la puerta abierta .... Gracias.

Como no agradecer a mi Laboraterapia, que desde luego sin ell@s, los que han estado hasta el último momento de esta tesis doctoral, como a los que ya no están físicamente, pero sí en nuestro pensamiento, gracias. Por todas las aventuras que hemos vivido, porque junto a vosotr@s he crecido y madurado tanto a nivel personal como a nivel científico, porque sin vosotr@s mi paso no hubiera sido igual, por todas las risas, viajes, complicidades, por toda la ayuda que siempre me habéis prestado y sobre todo en esta última recta y porque tengo de la suerte de poder llamaros amig@s... Gracias.

A mis Locas, que desde luego mucho tengo que agradecerlas ya que son más de 23 años de amistad... y que decir que ya no os haya dicho. ¡Que tengo una suerte enorme de teneros en mi vida!... Gracias.

También me gustaría agradecer a la gente del Zaidin, al Dr, José Ignacio, Dra Marta Robledo, Natalia, Sensi y el resto del equipo que hicieron que mi estancia allí fuera un lujo tanto en lo personal como científicamente, parte de esta tesis es vuestra...Gracias.

A mis padres, hermano y a mis viejis que son un gran pilar donde me apoyarme y buscar consuelo cuando se apagan las luces de mi camino. La familia no se escoge, pero yo repetiría... Gracias.

A mis amores, y en especial Draky que han sido la mayor distracción y calma en momentos de máxima tensión, y que con un simple gesto me alegran el alma.

A Ángel, gracias por estar ahí en todo momento, y sobre todo en esta recta final de subidas y bajadas. Tengo una gran suerte de que Brugi cruzara nuestros caminos, ¿qué haría yo sin ti? TQ ...Gracias



# Índice de contenidos

## INTRODUCCIÓN.

1.	La agricultura del siglo XXI: un desafío medioambiental.....	1
2.	El uso de probióticos en la agricultura.....	2
2.1.	Mecanismos promotores del crecimiento vegetal.....	4
2.1.1.	Biofertilización.....	5
2.1.2.	Fitoestimulación.....	7
2.1.3.	Biopesticidas.....	9
3.	La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosas, un modelo sostenible para la agricultura. ....	11
3.1.	Especificidad.....	12
3.1.1.	Señalización molecular.....	12
3.1.2.	Adhesión y colonización radicular.....	14
3.2.	Infectividad.....	15
3.3.	Efectividad.....	17
3.3.1.	Liberación de las bacterias en el nódulo y formación de simbiosomas (infección secundaria).....	17
3.3.2.	Diferenciación en bacteroides y Fijación de Nitrógeno.....	19
3.4.	Los rhizobia.....	19
3.4.1.	El género <i>Rhizobium</i> .....	19
3.4.2.	El género <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ).....	20
3.5.	Las leguminosas.....	21
3.5.1.	<i>Trifolium repens</i> L.....	22
3.5.2.	<i>Medicago sativa</i> L.....	22
3.5.3.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	23
4.	Uso de <i>Rhizobium</i> como probiótico para la mejora de la producción de cereales.....	23
4.1.	<i>Zea mays</i> L.....	25
4.2.	<i>Triticum aestivum</i> L.....	25
4.3.	<i>Avena sativa</i> L.....	26
5.	La importancia de la celulosa bacteriana en el ámbito agrícola.....	26
5.1.	Biosíntesis de celulosa bacteriana.....	27
5.2.	Regulación de la biosíntesis de celulosa bacteriana.....	28
5.2.1.	El operón <i>celABC</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> ANU843.....	29

## Índice de contenidos

6. Importancia de las técnicas de secuenciación para el análisis y selección de bioinoculantes para el desarrollo de una agricultura sostenible. ....	30
---	----

## MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Técnicas microbiológicas. ....	39
1.1. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio. ....	39
1.1.1. Cepas bacterianas de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> . ....	39
1.1.2. Cepas bacterianas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> . ....	39
1.1.3. Cepas del género <i>Ensifer</i> empleada en este estudio. ....	40
1.1.4. Cepas de <i>Escherichia coli</i> . ....	41
1.1.5. Otras cepas pertenecientes al género <i>Rhizobium</i> empleadas en el estudio. ....	41
1.2. Medios de cultivos empleados en el estudio. ....	41
2. Técnicas bioquímicas. ....	44
2.1. Detección de actividad celulolítica. Ensayo de doble capa. ....	44
2.1.1. En cultivo puro. ....	44
2.1.2. Con extractos sonicados. ....	44
2.2. Determinación de la producción de celulosa y la formación de biofilms. ....	45
2.2.1. Tinción con Rojo Congo para la determinación cualitativa de la producción de celulosa. ....	45
2.2.2. Tinción con Calcoflúor para la determinación cualitativa de la producción de celulosa. ....	46
2.2.3. Determinación de la producción de celulosa y proteínas amiloides. ....	46
2.2.4. Determinación de la formación de biofilms <i>in vitro</i> . ....	47
2.3. Análisis de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal (PGPB). ....	47
3. Técnicas de Biología Molecular. ....	52
3.1. Aislamiento de ácidos nucleicos. ....	52
3.1.1. Extracción de ADN total. ....	52
3.1.2. Extracción de ADN plasmidico (ADNp). ....	52
3.1.3. Extracción de ADN total para la secuenciación genómica de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> . ....	52
3.1.4. Determinación de la concentración y pureza de ADN. ....	52
3.2. Clonación. ....	53
3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	53
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en colonia. ....	54



3.2.3.	Clonación celular: tecnología del ADN recombinante.....	54
3.2.3.1.	Digestión mediante el empleo de endonucleasas de restricción.....	54
3.2.4.	Primers empleados.....	58
3.3.6.	Electroforesis de fragmentos de ADN en geles de agarosa.....	61
3.3.7.	Purificación de los fragmentos de ADN amplificados.....	61
3.3.8.	Secuenciación de ADN.....	61
3.3.9.	Secuenciación y anotación del genoma de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2T.....	62
4.	Métodos de transferencia genética en bacterias.....	62
4.1.	Transformación.....	62
4.2.	Conjugación.....	63
5.	Ensayos <i>in planta</i> .....	64
5.1.	Desinfección y germinación de las semillas.....	64
5.1.1.	<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	64
5.1.2.	<i>Trifolium repens</i> L.....	65
5.1.3.	<i>Medicago sativa</i> L.....	65
5.1.4.	<i>Zea mays</i> .....	66
5.1.5.	<i>Triticum aestivum</i> L.....	66
5.1.3.	<i>Avena sativa</i> L.....	66
5.2.	Ensayos de colonización e infección en cultivo hidróponico.....	67
5.2.1.	<i>Trifolium repens</i> L y <i>Medicago sativa</i> L.....	67
5.2.2.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	68
5.3.	Inoculación de semillas en placa de cereales.....	69
5.4.	Ensayo <i>in vivo</i> en invernadero.....	69
5.5.	Ensayos en plantas de <i>Zea mays</i> en campo.....	71
5.6.	Parámetros analizados de los ensayos <i>in planta</i> .....	72
5.6.1.	Medición de clorofila.....	72
5.6.2.	Análisis iónico.....	72
5.6.3.	Procesado de los nódulos.....	72
5.6.4.	Medida del grado de competitividad.....	72
6.	Técnicas histológicas.....	73
6.1.	Cortes histológicos de nódulos. Azul de Toluidina.....	73
7.	TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.....	74
7.1.	Preparación de muestras para su observación.....	74
7.1.1.	Frotis bacteriano.....	74

## Índice de contenidos

7.1.2.	Preparación de raíces para su observación.....	74
7.1.3.	Cortes transversales de raíces y nódulos.....	74
7.1.4.	Preparación de muestras para microscopía electrónica.....	75
7.2.	Tipos de microscopía empleada.....	76
7.2.1.	Microscopía óptica.....	76
7.2.2.	Microscopía de fluorescencia.....	76
7.2.3.	Microscopía confocal.....	76
7.2.4.	Microscopía electrónica de transmisión.....	76
8.	Softwares y bases de datos utilizados.....	77
8.2.	Análisis de las secuencias de ADN.....	77
8.2.1.	Análisis comparativo <i>in silico</i> de las secuencias nucleotídicas.....	77
8.2.2.	Edición de plásmidos y diseño de primers.....	77
8.2.3.	Análisis del genoma de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> .....	77
8.3.	Visualización de imágenes.....	78
8.4.	Análisis Estadístico.....	78
8.5.	Gestor bibliográfico.....	78

## CAPÍTULO I.

### Caracterización *in vitro* del potencial PGPB y simbiótico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*.

1.	Estudio de los potenciales mecanismos PGPB <i>in vitro</i> .....	81
1.1.	Producción de ácido indolacético IAA.....	81
1.2.	Producción de sideróforos.....	82
1.3.	Solubilización de fosfato.....	83
2.	Estudio de la biosíntesis de celulosa.....	84
2.1.	Tinción con Rojo Congo.....	84
2.2.	Tinción con calcoflúor.....	86
2.3.	Microscopía de transmisión.....	87
2.4.	Determinación de la naturaleza exopolisacáridica.....	88
2.5.	Estudio de la formación de biofilms <i>in vitro</i> .....	91
2.5.1.	Ensayos en placas de microtitulación de PVC.....	91
3.	Caracterización de la actividad celulolítica.....	92
3.1.	Ensayo de colonias.....	92

3.2. Ensayo de difusión en placa a distintas temperaturas y pHs.....	93
3.3. Estudio genético de la presencia de la celulasa celC2 en <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> .....	96
4. Amplificación del gen <i>nodC</i> en <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> .....	96

## CAPÍTULO II.

### Secuenciación y análisis del genoma de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*.

1. Descripción general del genoma.....	101
2. Análisis del potencial CAZome.....	102
3. Minería de genes promotores del crecimiento vegetal y simbióticos.....	107
3.1. Búsqueda de genes relacionados con la regulación del crecimiento vegetal. ..	107
3.2. Búsqueda de genes relacionados con la producción de sideróforos.....	112
3.3. Búsqueda de genes relacionados con la síntesis de compuestos volátiles. ....	115
3.4. Búsqueda de genes relacionados con la solubilización de fosfatos. ....	116
3.5. Búsqueda de genes relacionados con la nodulación y fijación de nitrógeno....	121
3.6. Búsqueda de genes relacionados con la producción de polisacáridos superficiales rizobianos (PSR). ....	122
3.6.1. Adhesión bacteriana.....	122
3.6.7. Producción de celulosa bacteriana.....	126

## CAPÍTULO III.

### Análisis del comportamiento simbiótico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* con *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris*.

1. Estudio mediante microscopía de la colonización e infección de la cepa ALA10B2 <sup>T</sup> con diferentes leguminosas.....	133
2. Estudio del comportamiento de ALA10B2 <sup>T</sup> en co-inoculación con un endosimbionte de <i>Phaseolus vulgaris</i> en cámara iluminada.....	139
3. Estudio del efecto de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> como PGPB de <i>Phaseolus vulgaris</i> bajo condiciones de invernadero. ....	147
3.1. Análisis del fenotipo foliar durante el desarrollo del experimento.....	147
3.2. Análisis del fenotipo radicular.....	151

## Índice de contenidos

3.2.1. Histología nodular.....	152
3.3. Análisis de los parámetros de productividad.....	154
3.4. Análisis del contenido nutricional del grano de alubia.....	155
4. Estudio del efecto de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> junto a simbiontes de leguminosas forrajeras en condiciones de invernadero.....	156

## CAPÍTULO IV.

**Análisis de la interacción de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* con *Avena sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum*.**

1. Estudio de la capacidad de colonización e infección de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> en diferentes cereales.....	163
2. Estudio del efecto de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> como bacteria PGPB en cámara iluminada empleando diferentes cereales.....	169
3. Ensayos de microcosmos en invernadero.....	170
4. Ensayo de campo con plantas de <i>Zea mays</i> .....	172
4.1. Análisis de los elementos fertilizantes de los suelos agrícolas.....	173
4.2. Análisis de parámetros de productividad.....	174
4.3. Análisis del valor nutricional del grano de <i>Zea mays</i> .....	176

## CAPÍTULO V.

**Estudio de la implicación de la celulasa CelC2 en de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> y regulación del operón *celABC* en la biosíntesis de celulosa.**

1. Obtención de cepas transformantes de la cepa de <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> que expresen heterológicamente la celulasa CelC2 y su ortóloga perteneciente al género <i>Ensifer</i> .....	179
2. Estudio de la implicación de la producción heteróloga de las celulasas CelC2 y CelC en la biosíntesis de celulosa y celulasas en <i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup> .....	179
3. Estudio del efecto de la expresión heteróloga de las celulasas CelC2 y CelC en la colonización e infección simbiótica.....	183
4. Estudio de la regulación de la biosíntesis de celulosa de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> ANU843.....	192
4.1. Obtención de fusiones transcripcionales.....	192

4.1.1.	Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales en cultivo puro. ... .....	193
4.1.2.	Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales <i>in planta</i> . .....	195

**DISCUSIÓN GENERAL.**

Discusión general.	201
--------------------	-----

**CONCLUSIONES.**

Conclusiones	215
--------------	-----

**REFERENCIAS.**

Referencias	217
-------------	-----



# **INTRODUCCIÓN**





## 1. La agricultura del siglo XXI: un desafío medioambiental.

Uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la agricultura del siglo XXI, es satisfacer la demanda mundial de alimentos, ya que se estima un incremento del 60% para 2050 (Alexandratos and Bruinsma 2012) siendo los principales factores el incremento en el envejecimiento demográfico y el crecimiento poblacional, estimándose un aumento de más de un tercio para 2050 (FAO, 2010) (Figura 1).



Figura 1. Previsión del crecimiento mundial. Adaptado de *World Population Prospects* (2015).

En el siglo pasado las hambrunas fueron la principal amenaza en prácticamente todo el mundo. Para intentar mitigar esta problemática gobiernos y empresas realizaron inversiones para la mejora de las infraestructuras agrícolas, el desarrollo del mercado, así como el fomento en investigaciones dentro del ámbito de la agricultura (Gómez *et al.*, 2013) naciendo de este modo la denominada Revolución Verde entre los años 1966 y 1985 (Pingali 2012).

Uno de los principales éxitos de la Revolución Verde fue la mejora genética de las especies agrícolas, ya que se seleccionaron aquellas que presentaban una mayor adaptación a factores biótico y/o abióticos lo que supuso un aumento de producción por hectárea cultivable (Skorov 1973; Khush 2001). La creación de estos nuevos híbridos junto con la maquinaria agrícola, las mejoras de los métodos de cultivo y del proceso de riego, la aplicación de pesticidas y el uso de fertilizantes químicos hicieron un éxito de la Revolución Verde (Skorov 1973; Conway and Barbie 1988; Pingali 2012). A pesar de que estas prácticas han contribuido, en los últimos 50 años, a una mejora en la esperanza de vida, reducción de la mortalidad infantil y disminución de la pobreza mundial (Estes *et al.*, 2015; Whitmee *et al.*, 2015); estos beneficios para la salud humana se están viendo mermados por el estilo de vida actual, dominado por una dieta de alto contenido calórico altamente procesado siendo la principal fuente de proteínas de origen animal. Además estos impactos negativos en la salud humana, hay que sumar una fuerte evidencia científica de que la producción de alimentos actual es el motor del cambio climático global, la pérdida de biodiversidad y de fuentes de agua dulce, la contaminación química y el desajuste de los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y el fósforo (García-Fraile *et al.*, 2017).

## Introducción

Diferentes organizaciones como Sustainable Development Goals (SDGs) o Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), han puesto de manifiesto la necesidad de un cambio para mitigar los problemas medio ambientales derivados de las prácticas agrícolas y por consiguiente reducir su impacto sobre la salud humana. Hoy en día aún existen más de 820 millones de persona malnutridas en el mundo, 151 millones de niños con algún tipo de atrofia, 51 millones de niños tienen emaciación y más de 2 mil millones de personas padecen un déficit nutricional (Willett *et al.*, 2019)

Dado que el actual sistema de alimentación no es capaz de proporcionar una dieta saludable siendo a su vez sostenible con los recursos del planeta, un grupo multidisciplinar de científicos procedentes de diversos campos como la medicina, ciencias políticas, sostenibilidad ambiental y agricultura han publicado un estudio reciente, en donde establecen diferentes objetivos para una producción sostenible y saludable a nivel mundial (Willett *et al.*, 2019). Asimismo, estos autores determinan que los objetivos planteados ayudarán a garantizar los Objetivos del Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas y el Acuerdo de París en el que se establece medidas para la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero a través del ahorro energético, adaptación al cambio climático y resiliencia de los ecosistemas.

Por otra parte, este estudio multidisciplinar hace referencia a la agrobiodiversidad, es decir, a la diversidad de plantas incluyendo aquellas especies cultivadas y no cultivadas que están asociadas directamente con la dieta humana. Además, incluyen a la biodiversidad agrícola no comestible como son los insectos, microbiomas, aves, mamíferos, cuyas actividades ejercen un impacto positivo en la agricultura a través de procesos como la polinización, control de plagas, almacenar carbono en el suelo. Por ello, todas esas especies deben de incluirse como parte del desarrollo de nuevas prácticas agrícolas. También pone de manifiesto, la necesidad de ingerir más frutas, verduras, legumbres etc, ya que sostienen que los distintos procesos químicos que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución para defenderse de depredadores y enfermedades, proporciona unos grandes valores nutricionales (Willett *et al.*, 2019).

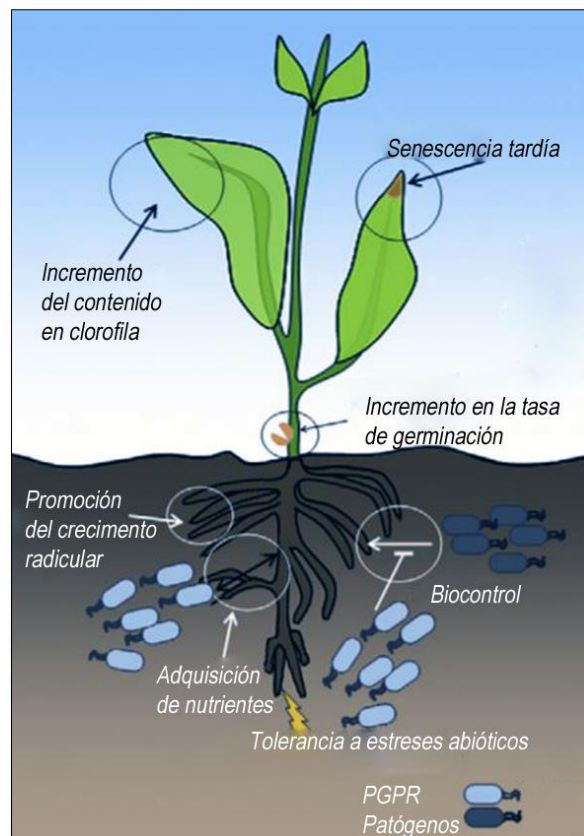
## 2. El uso de probióticos en la agricultura.

El concepto probiótico se atribuye al microbiólogo ruso Eli Metchnikoff, galardonado con el premio Nobel por sus trabajos realizados en el Instituto Pasteur, quién afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” Metchnikoff, E. (1907). Sin embargo, este término no fue acuñado hasta 1960 para designar que los probióticos eran sustancias producidas por microorganismo con capacidad para promover el crecimiento de otros organismos (Lilly and Stillwell 1965). En 2002, la FAO junto con la OMS (Organización mundial de la Salud) definió los probióticos como microorganismos vivos, que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador (FAO/OMS, 2002).

Hoy en día, es necesario y urgente un cambio en las prácticas agrícolas que permitan mantener una producción elevada para satisfacer la demanda de alimento en concordancia con el medio ambiente. Una alternativa a los fertilizantes, herbicidas y pesticidas químicos lo constituyen los probióticos de plantas, es decir bacterias con capacidades para promover el crecimiento

vegetal denominadas bacterias PGPR (de sus siglas en inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Pérez-Montaño *et al.*, 2014).

Las bacterias PGPR son un conjunto de bacterias que habitan en las inmediaciones de la rizosfera de las plantas y que producen un efecto positivo en las mismas. Las interacciones planta-microorganismo suelen ocurrir en tres zonas diferenciadas de las plantas que son la filosfera (partes áreas de las plantas como las hojas, frutos y flores), la endosfera (tejidos tisulares internos) y la rizosfera (Figura 2). La rizosfera se define como la zona del suelo que rodea las raíces de las plantas y que desempeña un gran impacto en el desarrollo de las plantas, no solo debido a la adquisición de nutrientes sino también a los microorganismos que viven en ella (Lugtenberg and Kamilova 2009).



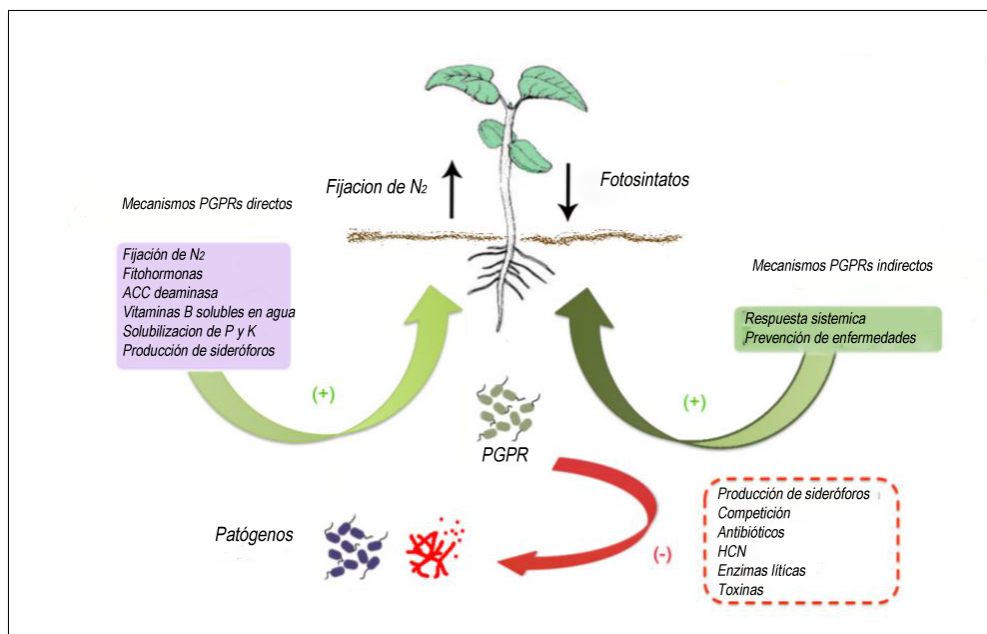
**Figura 2.** Beneficios derivados de las interacciones planta-bacterias PGPR. Estos beneficios son incluyen el incremento en la tasa de germinación, la senescencia tardía, el incremento de clorofila en las hojas, la promoción del crecimiento radicular, mejora en la adquisición de nutrientes, tolerancia a estrés abióticos y biocontrol. Adaptado de (Pérez-Montaño *et al.*, 2014).

Las rizobacterias con aptitudes promotoras del crecimiento vegetal pueden desempeñar un papel fundamental en la adquisición nutrientes por parte de la planta, favoreciendo factores que induzcan la acumulación de biomasa en la raíz y/o impedir efectos perjudiciales en las raíces de las plantas (Glick 2012). Se pueden clasificar en dos tipos en función de su grado de proximidad e intimidad con la planta, dividiéndose en PGPR extracelulares (ePGPR) cuando se localizan en la rizosfera e intracelulares (iPGPR) cuando se encuentran en el interior de las células vegetales o entre los espacios intercelulares de las células del córtex comportándose como endófitos (Gray and Smith 2005).

## Introducción

### 2.1. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal.

La capacidad de las bacterias PGPR para promover el crecimiento vegetal pueden ser a través de mecanismos directos como por ejemplo la mejora en la adquisición de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, la producción de fitohormonas o indirectos mediante la producción de antibióticos, producción de enzimas líticas de la pared fúngica o mediante la estimulación de la respuesta sistémica (ISR) de las plantas (Figura 3) (García-Fraile *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Mecanismos de acción directos e indirectos de las bacterias PGPR. Modificado de (García-Fraile *et al.*, 2015).

A su vez y en función de los mecanismos de acción involucrados en el desarrollo vegetal, estas rizobacterias beneficiosas se las denominan biofertilizantes, fitoestimuladores, y biopesticidas cuyas características se encuentran recogidas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Formas de PGPRs y sus mecanismos de acción que estimulan el crecimiento de las plantas.

Forma	Definición	Mecanismos de acción	Referencias
Biofertilización	Sustancia que contienen microorganismos vivos, los cuales, aplicados en las semillas, superficie de las plantas o en los suelos, colonizan la rizosfera y promueven el desarrollo vegetal de la planta huésped mediante el incremento en la adquisición de nutrientes.	Fijación Biológica de nitrógeno (FBN). Uso de fósforo insoluble.	(Vessey 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Ahmad <i>et al.</i> , 2016)
Fitoestimulación	Microorganismos capaces de sintetizar fitohormonas tales como auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno.	Producción de reguladores del crecimiento vegetal	(Lugtenberg <i>et al.</i> , 2002; Vessey 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004)

Continuación Tabla 1.

Biopesticida	Microorganismos que promueven el crecimiento vegetal mediante el control de agentes patógenos.	Producción de sideróforos, enzimas líticas, HCN, inducción de la respuesta sistémica de las plantas.	(Somers et al., 2004; Chandler et al., 2008)
--------------	--	--	--

**2.1.1. Biofertilización.**

Las bacterias beneficiosas que promueven el crecimiento de las plantas a través de la mejora en la adquisición de nutrientes se denominan biofertilizantes. Este tipo de bacterias desempeñan un papel crucial en el balance nutricional de la planta huésped a través de la fijación de nitrógeno, incremento de la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera así como promoviendo el desarrollo del sistema radicular (Pérez-Montaño *et al.*, 2014).

**2.1.1.1. Fijación biológica de nitrógeno.**

El nitrógeno es el principal elemento esencial para el desarrollo de los seres vivos, ya que es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos, enzimas, proteínas y clorofila, en el caso de las plantas. La atmósfera contiene aproximadamente un 78% de nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>), el cual no puede ser asimilable por la mayoría de los seres vivos, incluidas las plantas (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Los suelos presentan un déficit de formas nitrogenadas asimilables por las plantas como son los nitritos, nitratos o compuestos amoniacales, ya que con frecuencia los fertilizantes químicos nitrogenados empleados en la agricultura se pierden durante la lluvia o por la lixiviación de minerales constituyendo un factor limitante dentro del sector agrícola (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Por ello, la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) desempeña un papel crucial en los sistemas agrícolas, ya que se trata de una conversión biológica del nitrógeno atmosférico mediante la ruptura enzimática del triple enlace covalente del nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) en dos átomos de nitrógeno para producir amonio, forma asimilable por las plantas. Esta habilidad está restringida a los procariontes, siendo las proteobacterias las que mayor cantidad de diazotrófos incluyen (Kneip *et al.*, 2007).

La conversión enzimática de nitrógeno molecular a amonio es catalizada por la nitrogenasa, un complejo enzimático sensible a la presencia de oxígeno y altamente conservado en diazotrófos simbiotes y de vida libre. La nitrogenasa está constituida por dos metaloproteínas denominadas ferroproteína y ferromolibdoproteína cuyo grupo prostético está formado por el complejo FeMoCo (cofactor hierro molibdeno) (Franche *et al.*, 2009).

La capacidad para fijar nitrógeno puede llevarse a cabo en microorganismos simbióticos o por microorganismo de vida libre. Estos últimos pueden ser quimiótrofos anaerobios como *Clostridium* o *Desulfovibrio*, anaerobios facultativos como por ejemplo *Citrobacter* y *Enterobacter* que fijan nitrógeno únicamente cuando crecen en anaerobiosis (Bellenger *et al.*, 2014) o en aerobiosis estricta como *Azotobacter* y *Azospirillum* y se encuentran comúnmente en zonas templadas y asociadas a la rizosfera de cereales (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011)

## Introducción

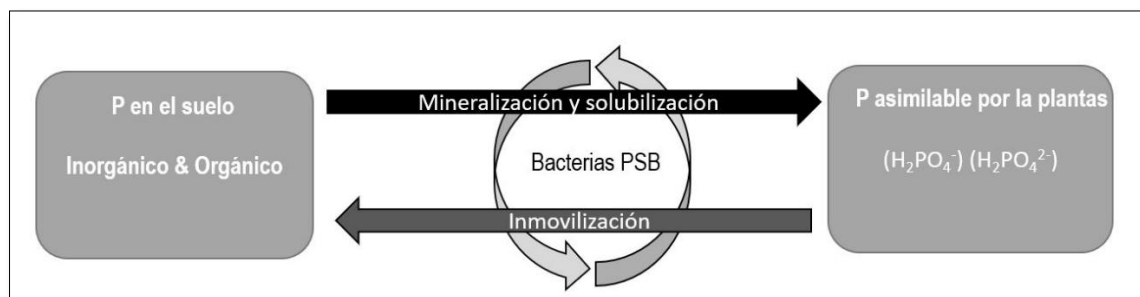
La FBN llevada a cabo por microorganismos simbióticos se ha descrito en diferentes microorganismos como por ejemplo en cianobacterias como *Nostoc* con el género *Gunnera* (Santi *et al.*, 2013), en bacterias del género *Frankia* con plantas actinorrhizas (Wall 2000) o en bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* con leguminosas, siendo esta una de las más estudiadas (Van Rhijn and Vanderleyden 1995).

### 2.1.1.2. Solubilización de fosfato.

Tras el nitrógeno, el fósforo (P) constituye un elemento esencial para el desarrollo de las plantas ya que es necesario para la división y desarrollo celular, el transporte de energía, la biosíntesis de macromoléculas, fotosíntesis y respiración de las plantas (Shenoy and Kalagudi 2005; Khan *et al.*, 2013a; Ahemad and Kibret 2014). Irónicamente, los suelos son el mayor reservorio de fósforo, pero las cantidades disponibles para las plantas se encuentran en una fracción mínima debido a que la mayoría se encuentra en formas insolubles (Buol and Eswaran 1999; Saqlan Naqvi *et al.*, 2009). Las plantas asimilan este elemento en forma de iones ortofosfatos monobásico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y dibásico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ ) de carga negativa (Bhattacharyya and Jha 2012). Una problemática asociada al uso de fertilizantes fosforados, es que el P reacciona con distintos componentes presentes en el suelo dejando de estar disponible para la planta. Por ello, los agricultores emplean grandes cantidades de estos fertilizantes, lo cual no sólo supone un alto coste económico, sino también medio ambiental (Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

Desde hace años, se ha descrito que existen bacterias PGPRs capaces de solubilizar formas inorgánicas de P mejorando el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Hayat *et al.*, 2010; Saharan and Nehra 2011; Yu *et al.*, 2011; Kaur and Reddy 2013). La transformación bacteriana de formas insolubles de fósforo presentes en el suelo a formas solubles se realiza a través de diferentes procesos como la solubilización (P inorgánico) y la mineralización (P orgánico), siendo la inmovilización la reacción inversa a la mineralización (Figura 4).

Durante la inmovilización, los microorganismos convierten las formas inorgánicas de P en fosfato orgánico que incorporan a sus células. La mineralización y la inmovilización tiene lugar simultáneamente y están influenciadas por las características fisicoquímicas de los suelos, las poblaciones microbianas, así como de los exudados de las plantas (Shenoy and Kalagudi 2005; Khan *et al.*, 2013b).



**Figura 4.** Representación esquemática de la solubilización del fósforo presente en el suelo por rizobacterias PSB. Adaptado de (Khan *et al.*, 2009).

Entre las diferentes estrategias de las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB de sus siglas en inglés *Phosphate Solubilizers Bacteria*) destacan la síntesis de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como ácido málico, ácido 2-cetoglucónico, ácido málico, ácido cítrico, ácido oxálico etc, provocando un acidificación del entorno (Rashid *et al.*, 2004). Otra estrategia es la mineralización del fosfato orgánico gracias a la liberación de exo-enzimas como las ácido fosfatasa, las fitasa, fosfohidrolasas o las C-P liasas (Gopalakrishnan *et al.*, 2015)

Estos mecanismos no son exclusivos, ya que se ha descrito que algunas bacterias pueden presentar ambos procesos (Tao *et al.*, 2008). Diferentes géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* se han descrito como buenas bacterias PSB (Sturz and Nowak 2000; Mehnaz and Lazarovits 2006). La importancia de las bacterias PSB en la mejora de la producción del garbanzo y de la cebada ha sido demostrada por *Mesorhizium mediterraneum* (Peix *et al.*, 2001). Esta habilidad tiene un gran interés en la agricultura ya que representa un posible mecanismo para la mejora de los cultivos en condiciones de reales de producción (Verma *et al.*, 2001).

### 2.1.2. Fitoestimulación.

Las bacterias PGPR capaces de alterar la estructura radicular y promover el crecimiento vegetal de la planta huésped a través de la síntesis de fitohormonas como auxinas, giberelinas (GAs), citoquininas, ácido abscísico, ciertos compuestos volátiles así como reguladores de estrés son conocidos como fitoestimuladores (Bloemberg and Lugtenberg 2001; Gopalakrishnan *et al.*, 2015). El efecto estimulador deriva de la manipulación compleja y equilibrada de las hormonas vegetales que intervienen directamente en el crecimiento o estimulación de la raíz de la planta huésped (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

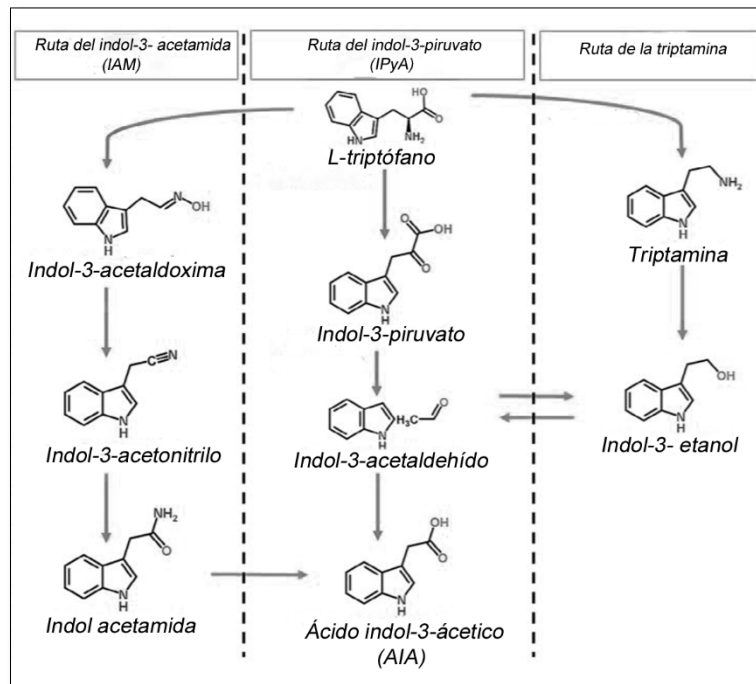
El ácido indolacético (AIA), es una auxina producida por numerosas PGPRs y que está involucrada en la aceleración del desarrollo vegetal, crecimiento de la raíz y vigor de las plántulas, división celular, formación de haces vasculares y es una hormona esencial para la formación de nódulos (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Se ha estimado que el 80% de las bacterias aisladas de la rizosfera son capaces de producir AIA (Patten and Glick 1996).

Existen diferentes estrategias involucradas en la producción de AIA por parte de los microorganismos asociados a las plantas que pueden ser dependiente o independientes del L-triptófano. La mayoría de las bacterias PGPRs utilizan el L-triptófano exudado por las raíces de las plantas como precursor para la síntesis de AIA. Se conocen muy pocos ejemplos sobre la producción de AIA por vías independientes, siendo el caso más estudiado el de *Azospirillum brasilense*, donde más del 90% de AIA es producido por vías independientes al L-triptófano, siendo el 10% restante producido por vía dependiente del triptófano (Spaepen *et al.*, 2007; Kumar Jha and Saraf 2015).

Se han descrito 3 rutas dependientes del L-triptófano empleadas por bacterias (Figura 5). A modo de ejemplo se podría decir que géneros bacterianos tales como *Rhizobium* o *Azospirillum* sintetizan IAA a través de la ruta del indol-3- pirúvico (IPyA) (Costacurta and Vanderleyden 1995; Patten and Glick 1996; Burdman *et al.*, 2000). Por otro lado, bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Erwinia herbicola*

## Introducción

utilizan la ruta del indol-3-acetamida (IAM) para la síntesis de AIA. Mientras que bacterias pertenecientes al género *Bacillus* se ha descrito que emplean la ruta de la triptamina (Goswami *et al.*, 2016).



**Figura 5.** Rutas biosintéticas dependientes de L-triptófano para la síntesis de AIA en bacterias. Modificado de (Goswami *et al.*, 2016).

Las giberelinas (GAs) son otro grupo de fitohormonas que están involucradas en diferentes procesos de desarrollo en plantas superiores como la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo, la floración y la fructificación (Hedden and Phillips 2000). La producción de GAs en bacterias se ha documentado en especies bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* o *Azospirillum* (Piccoli *et al.*, 1997; Gutierrez-Manero *et al.*, 2001; Bottini *et al.*, 2004). La importancia de esta fitohormona radica en la traslocación desde las raíces a las partes aéreas donde sus efectos son más notables y más aún cuando las bacterias también sintetizan AIA estimulando el sistema radicular y por consiguiente mejorando la adquisición de nutrientes que facilitan el crecimiento de la parte aérea (Wong *et al.*, 2015).

Las citoquininas son otro grupo de fitohormonas que de manera similar al AIA están involucradas en la división celular, estimulación del desarrollo radicular, formación de los pelos radiculares, inhibición del alargamiento de la raíz (Frankenberger and Arshad 1995; Amara *et al.*, 2015). La producción de citoquininas se ha identificado en cepas de diferentes géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Gladys *et al.*, 1996; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003), *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhizobium* spp, *Azotobacter* spp, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* (García de Salamone *et al.*, 2001; Glick 2012)

El ácido abscísico (ABA) es un regulador hormonal que se sintetiza parcialmente en los cloroplastos y toda la biosíntesis se lleva a cabo en las hojas. EL ABA es importante para la aclimatación de las plantas a diferentes condiciones adversas como son la sequía, la salinidad, el frío así como en la inhibición de la germinación de las semillas y la latencia, regula el cierre de los



estomas en condiciones de estrés hídrico (Li *et al.*, 2006; Assmann 2010). La producción de ABA por parte de bacterias PGPRs se ha documentado en diferentes especies como *Azospirillum brasilense* Sp 245 (Cohen *et al.*, 2008), *Rhizobium* sp. (Dobbelaere *et al.*, 2003), *Bradyrhizobium japonicum* (Boiero *et al.*, 2007), *Rhodococcus* sp. P1Y y *Novosphingobium* sp. P6W (Belimov *et al.*, 2014).

El etileno es otra hormona vegetal que se produce de manera natural en las plantas, pero sus niveles aumentan drásticamente bajo condiciones de estrés abióticos como sequías, salinidad o inundación. También es conocida por los efectos perjudiciales que provoca en las plantas en la senescencia de las hojas, marchitamiento de las flores, clorosis o la abscisión de las hojas (Jha *et al.*, 2015). El ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) es el precursor de la fitohormona del etileno. Los microorganismos PGPRs mitigan los efectos negativos del etileno mediante la síntesis de la enzima ACC desaminasa. Las plantas en condiciones de estrés producen ingestas cantidades de ACC que se escinde en amoníaco y  $\alpha$  cetobutirato por acción de la ACC bacteriana (Glick 2014). Además, de proteger a la planta frente el estrés oxidativo provocado por el exceso de etileno, los productos derivados de la ruptura del ACC es usado por las plantas como fuente de carbono y nitrógeno (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Diversas publicaciones ponen de manifiesto la producción de ACC-desaminasa en diferentes rizobios como *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti*, *Ensifer meliloti* (Kaneko *et al.*, 2000; Okazaki *et al.*, 2004; Hafeez *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2009), así como en la especie bacteriana *Methylobacterium fujisawaense* (Madhaiyan *et al.*, 2006) o en bacterias pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* (Ghosh *et al.*, 2003; Govindasamy *et al.*, 2008).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la producción bacteriana de compuestos orgánicos volátiles (COVs) como la acetoina, jasmonatos, y el compuesto 2-3 butanodiol constituyen un mecanismo de gran importancia en la estimulación del crecimiento vegetales por rizobacterias (Ping and Boland 2004). Los COVs producidos por rizobacterias pueden desempeñar un papel importante como molécula de señalización en las interacciones planta-microorganismo (Ryu *et al.*, 2003). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para esclarecer el papel de estos compuestos en los sistemas plantas-rizobacterias.

### 2.1.3. Biopesticidas.

La promoción del desarrollo vegetal se puede realizar de una forma indirecta mediante el control de patógenos. En la literatura se han descrito diversos mecanismos para tal fin, que se detallan a continuación.

#### 2.1.3.1. Producción de sideróforos.

El hierro es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas, ya que actúa como cofactor de numerosas enzimas esenciales en diferentes procesos fisiológicos como la respiración, la fotosíntesis o la fijación del nitrógeno. En hábitats aerobios el  $Fe^{2+}$  se oxida a  $Fe^{3+}$  formando compuestos insolubles para las plantas y los microorganismos. Bajo estas circunstancias tanto las

## Introducción

plantas como los microorganismos son capaces de producir quelantes de hierro de bajo peso molecular que exhiben una alta afinidad por el hierro y se denominan sideróforos (Machuca *et al.*, 2007; Miethke and Marahiel 2007). Los grupos funcionales bacterianos más frecuentes son hidroximados y catecoles. Las rizobacterias productoras de sideróforos mejoran la salud de la planta huésped a varios niveles, mejorando la adquisición del hierro y dificultando el crecimiento de patógenos ya que limitan la concentración del hierro alrededor de la rizosfera en el caso de los hongos, estos no son capaces de absorber el complejo hierro-sideróforo (Shen *et al.*, 2013). En la literatura se ha puesto de manifiesto la capacidad de los sideróforos bacterianos inhibiendo el desarrollo de fitopatógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Erwinia* o *Macrophomina phaseolina* por acción de diferentes especies bacterianas tales como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* A-13, *Enterobacter cloacae*, *Bradyrhizobium* y *Ensifer meliloti* (Sayyed *et al.*, 2013). Además del hierro, los sideróforos pueden formar complejos estables con otros metales que son de interés como Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn ayudando a las plantas en la adquisición del hierro en suelos contaminados (Schalk *et al.*, 2011).

### 2.1.3.2. Inducción de la respuesta sistémica de las plantas.

La resistencia sistémica inducida (ISR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) forman parte de las respuestas de resistencia sistémica de las plantas y es activada por ciertas moléculas denominadas inductores. Durante este proceso, se genera una señal bacteriana que está involucrada con la ruta del etileno o jasmonato en el caso de la ISR. En el caso de SAR, este mecanismo se activa por bacterias patógenas necróticas siendo la molécula del ácido salicílico clave en este proceso (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Ambos mecanismos están involucrados en la respuesta defensiva de la planta a algunas bacterias, virus y hongos fitopatógenos (Lugtenberg and Kamilova 2009). En la literatura se han descrito diferentes especies bacterianas capaces de inducir la ISR como *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Yanni *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2006) así como diferentes cepas no patógenas pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Por lo tanto la inducción iniciada por la rizobacterias se propaga de manera sistemática en el interior de la plantas aumentando las respuestas basales de defensa de la planta en tejidos distintos (Thakker *et al.*, 2013).

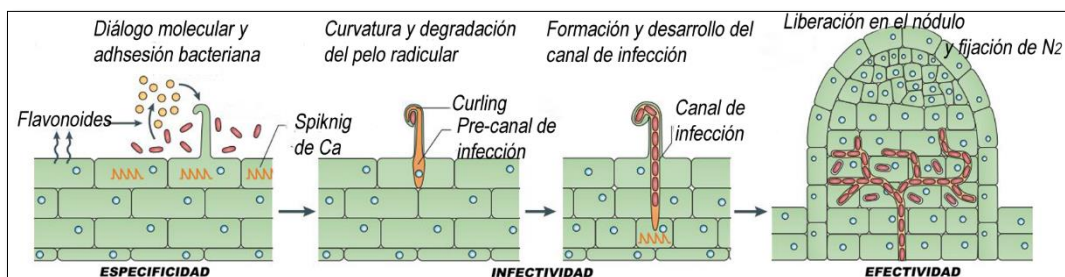
### 2.1.3.3. Otros mecanismos.

Otro de los mecanismos empleados por las bacterias PGPRs para mejorar el desarrollo de las plantas de un modo indirecto, controlando la propagación de patógenos es la producción de enzimas degradadoras de la pared celular como las quitinasas, lipasas, proteasas y  $\beta$  1-3, glucanasas que rompen la pared celular de bacterias y hongos patógenos (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Asimismo, la producción de metabolitos como el ácido cianhídrico (HCN) (Ahemad and Kibret 2014) o la producción de antibióticos siendo en este último caso, las actinobacterias las mayores productoras (Sathya *et al.*, 2017) constituyen mecanismos englobados dentro de la categoría de biopesticidas.

### 3. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, un modelo sostenible para la agricultura.

Las plantas leguminosas tienen la capacidad de establecer simbiosis con los rizobios, bacterias presentes en el suelo capaces de llevar a cabo la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) dentro de unas estructuras especializadas denominadas nódulos. Estos nódulos proporcionan a la bacteria un ambiente microaerófilo o anaerobio, ya que los rizobios por sí solos no disponen de mecanismos para dicho fin, por lo que requieren una posterior diferenciación en bacteroides rodeados de una membrana específica en el interior del nódulo para iniciar la FBN. Una vez diferenciados, transforman el nitrógeno atmosférico en amonio, siendo en esta forma asimilable por las plantas. Esta interacción está catalogada como una rizoendosimbiosis mutualista estricta, ya que, a pesar de que ambos pueden vivir de manera independiente, su capacidad de interacción implicada algún tipo de beneficio para cada parte involucrada, reforzando la existencia de una especificidad entre ambos. Este proceso biológico tiene un gran impacto para el desarrollo de una agricultura sostenible, ya que reduce el uso de fertilizantes nitrogenados exógenos, a la vez que proporciona una fuente alimentos ricos en proteínas (Wang *et al.*, 2012).

El establecimiento de una simbiosis *Rhizobium*-leguminosas eficiente sigue una serie de etapas secuenciales (Figura 6), en las que intervienen diferentes moléculas sintetizadas por el macro y/o el microsimbionte.



**Figura 6.** Representación esquemática de una simbiosis *Rhizobium*-leguminosa efectiva de las etapas del proceso de infección. Modificado de (D Oldroyd 2013).

Las etapas simbióticas se pueden agrupar en 3 grupos en función de las denominadas funciones simbióticas.

1. Especificidad: capacidad para interactuar a nivel molecular de una manera específica permitiendo al rizobio anclarse a la superficie radicular e inducir la diferenciación del primordio nodular, así como la deformación completa del pelo radicular.
2. Infectividad: capacidad de penetración en el tejido radical de la planta huésped, así como de llegar hasta los nódulos a través del canal de infección.
3. Efectividad: capacidad de transformarse en bacteroide y llevar a cabo la FBN en el interior del nódulo.

Dentro de cada una de estas etapas simbióticas interviene diferentes moléculas sintetizadas por el microsimbionte y se encuentran recogidas en la Tabla 2.

## Introducción

**Tabla 2.** Etapas del proceso de infección *Rhizobium*-leguminosas y moléculas sintetizadas por la bacteria necesarias para cada una de ellas. Adaptado de (Robledo *et al.*, 2011b).

Propiedad simbiótica	Etapas	Fenotipo	Moléculas implicadas	Genotipo	Referencias
Especificidad	Señalización molecular	Had/Noi	Factores de nodulación (NF)	nodABC, nodDFE	(Geurts and Bisseling 2002)
	Adhesión al pelo radical	Roc	Ricadhesinas	rapA1	(Smit <i>et al.</i> , 1987)
		Roa Caps	Microfibrillas de celulosa	celABC	(Mateos <i>et al.</i> , 1995; Ausmees <i>et al.</i> , 2001)
Infectividad	Curvatura y degradación del pelo radical	Hac/Hot	Celulasa C2	celC	(Mateos <i>et al.</i> , 2001)
			NF	nodF, nodL	
	Formación y desarrollo del canal de infección	Inf		exoY, exoH	(Cheng and Walker 1998)
			Succinoglicano/EPSI		
Efectividad	Liberación en el nódulo	Bar	Proteína hemo, FixL,	hemA fixL	(Gilles-Gonzalez <i>et al.</i> , 1991; Kereszt <i>et al.</i> , 1995)
	Fijación de N <sub>2</sub>	Fix	Reguladores transcripcionales	fixJ, fixK	(Fischer 1994)
			Nitrogenasa	nifHDK	

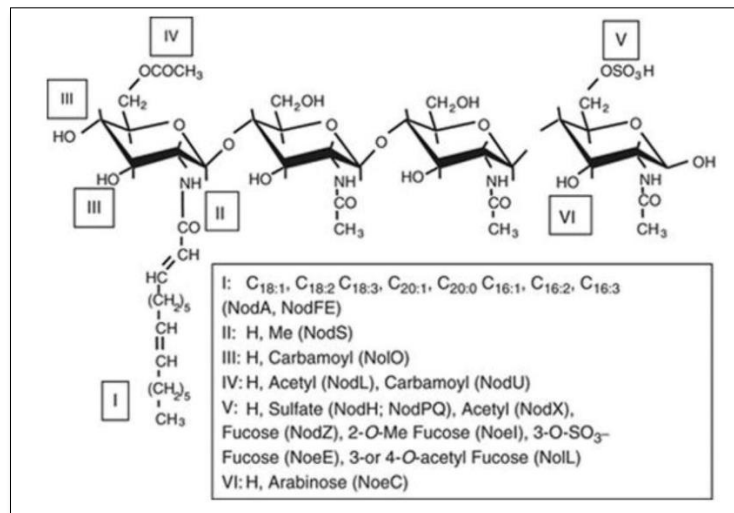
### 3.1. Especificidad.

#### 3.1.1. Señalización molecular.

La interacción *Rhizobium*-leguminosa comienza con un dialogo molecular altamente regulado entre el macro y el microsimbionte. El inicio de la interacción está marcado por la secreción por parte de las plantas y a través de las raíces, de un coctel de compuestos fenólicos, siendo predominantes los flavonoides, derivados de 2-feil-1,4-benzopiranos (Smit *et al.*, 1987). La composición de los flavonoides varía en función de la leguminosa, y desencadena una respuesta específica en los rizobios circundantes como atrayentes moleculares hacia la rizosfera (Gulash *et al.*, 1984). Al mismo tiempo, los flavonoides son reconocidos por los rizobios y activan los genes de nodulación (*nod*), a través del regulador transcripcional denominado NodD perteneciente a la familia LysR, que activa a su vez la cascada enzimática encargada de sintetizar los polichitolooligosacáridos (LCOs) conocidos como factores de nodulación (NF). Estas moléculas

específicas (NF) son reconocidas por las plantas e inducen cambios notables en las raíces de las plantas como la despolimerización de la membrana plasmática, alcalinización de los pelos radicales, cambios en los flujos de  $Ca^{+}$  y la deformidad de los pelos radicales (Ehrhardt *et al.*, 1996)

Los NF están formados por un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina unido por enlaces  $\beta$  1, 4 sintetizados por el operón *nodABC*. Esta cadena puede sufrir modificaciones difiriendo en su longitud y tamaño (Figura 7). Asimismo, dichas modificaciones dependen de la cepa de rizobio, como por ejemplo de productos génicos de nodulación tales como *nodFE* (Spaink 2002).

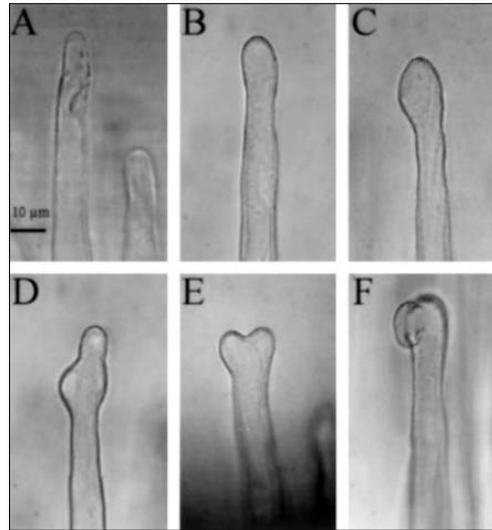


**Figura 7.** Diversidad de Factores de Nodulación (NF). Los NF están formados, normalmente por 4 o 5 residuos  $\beta$  (1-4) N-acetilglucosamina. En el recuadro se indican las posibles combinaciones codificadas por los genes de nodulación generados por diferentes rizobios. Adaptado de (Downie 2010a).

La percepción de los NF en las leguminosas esta mediada por receptores específicos de factores de nodulación (NFR) de naturaleza quinasa, y con dominios pertenecientes a la familia LysM necesarios para la respuesta de la planta a los NF (Jones *et al.*, 2007a). Además, como respuesta a la inducción, las plantas expresan varios genes que de manera conjunta se denominan nodulinas tempranas (ENDOS por sus siglas en inglés “**early nodulin-genes**”) y son necesarios para la deformación de los pelos radicales y la formación del primordio nodular (Hirsch *et al.*, 2009).

Una de las actividades biológicas mejor caracterizadas debido a la presencia de los NF es la inducción de deformaciones en los pelos radicales de la planta huésped (“**Hair deformation**” o fenotipo Had) (Oldroyd and Downie 2008). Una vez en contacto, los pelos radicales paran su crecimiento, y comienzan a cambiar de forma, observándose un engrosamiento de la punta del pelo apical, seguido de una reorientación desde dicho engrosamiento (Maekawa-Yoshikawa and Murooka 2009) (Figura 8). Asimismo, el pelo radical exhibe todas las características del crecimiento, es decir, con un área rica en vesículas en la extremidad externa, seguida de una región densa de citoplasma subapical (Sieberer and Emons 2000; Miller *et al.*, 2000). Diversos estudios ponen de manifiesto que el denominado “cayado de pastor” o fenotipo *Hac* solo se forma en presencia del rizobio compatible (Maekawa-Yoshikawa and Murooka 2009; Wang *et al.*, 2012).

## Introducción



**Figura 8.** Deformaciones de los pelos radiculares debido a la presencia de NF en raíces de *Phaseolus*. A) es el control donde no se observan deformaciones. B y C) respuesta a los NF mostrando diferentes grados de engrosamiento de la punta del pelo apical. D) Continuación del engrosamiento y reorientación del crecimiento de la punta del pelo radical. E) Crecimiento bifurcado de la zona apical. F) Formación de "loops" continuos. Modificado de (Cárdenas *et al.*, 2000).

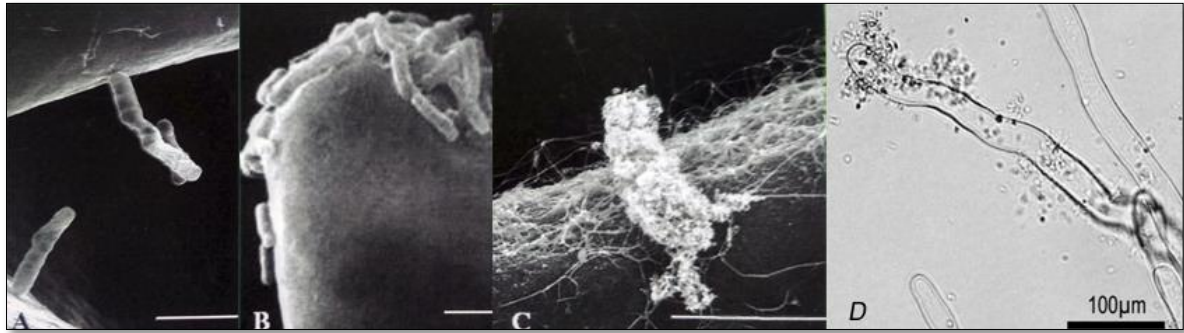
Estos cambios morfológicos no ocurren de manera homogénea a lo largo de la raíz, sino que existen tres zonas diferenciadas. Los pelos más susceptibles de sufrir estos cambios morfológicos son los que se localizan en las zonas I y II, ubicándose a 1 o 2 cm por encima del meristemo respectivamente. Por su parte los pelos ubicados en la III zona de la raíz, ya no se encuentran en fase de crecimiento y por lo tanto no son susceptibles de sufrir deformaciones (Dazzo *et al.*, 1996; Gage 2004).

La nodulación implica el desarrollo de nódulos radiculares a partir de células corticales que se controlan a través del sistema de transporte de las auxinas. Así, los flavonoides desempeñan diferentes papeles durante la simbiosis tanto fuera de la raíz como dentro de ella, ya que actúan como quimiotácticos de los rizobios, inductores de la síntesis de NF, reguladores del desarrollo de la raíz o como moléculas capaces de alterar las respuestas defensivas de las plantas (Cooper 2004).

### 3.1.2. Adhesión y colonización radicular.

Los rizobios son microorganismos móviles capaces de detectar los flavonoides exudados por las raíces actuando como quimiotácticos frente a los rizobios iniciando el proceso de colonización de la raíz (fenotipo Roc: **root** colonization) (Tabla 2) (Miller *et al.*, 2007). El anclaje a las raíces es considerado una etapa inicial necesaria para el desarrollo de la infección y nodulación en donde intervienen diversas moléculas de ambos simbiosis (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

En primer lugar, se produce una unión reversible en la que participan diferentes moléculas bacterianas como las ricadhesinas, proteínas flagelares y lectinas (Dazzo *et al.*, 1984; Fujishige *et al.*, 2006). Las ricadhesinas (rhizobial calcium-binding surface protein) se unen al calcio y a uno de los polos de las bacterias, y estos a su vez a los pelos radiculares (Gage 2004). Por otra parte, las moléculas responsables de la unión del rizobio a la punta apical son las lectinas junto algunos polisacáridos localizados en la membrana externa (Dazzo and Hrabak 1981) (Figura 9).



**Figura 9.** Microscopía electrónica de barrido en la que se observan los diferentes estadios relacionados con la adhesión y colonización por parte de los rizobios. A) Adhesión polar de las bacterias a las raíces de las plantas (fenotipo Roa). B) Adhesión a la punta del pelo radical (fenotipo Roc). C) Adhesión mediante la formación de microfibrillas de celulosa (caps) Adaptado de (Robledo, TD, 2010). D) Microscopía óptica mostrando la adhesión de las bacterias a la punta del pelo radical. Elaboración propia.

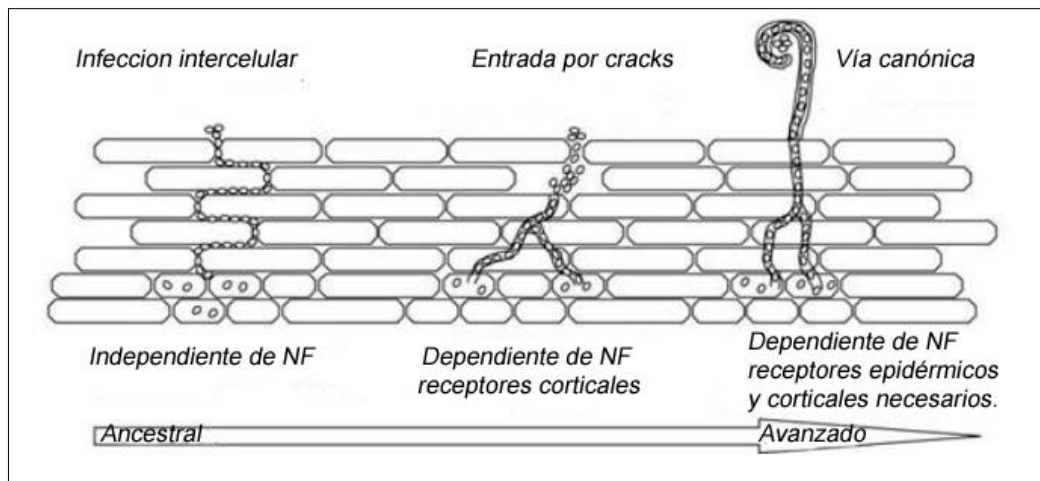
De este modo los rizobios se adhieren a los pelos radicales de su planta hospedadora marcando el paso previo a la infección (fenotipo Roa: **root adhesion**). Los polisacáridos bacterianos de superficie son cruciales para el desarrollo de una simbiosis efectiva, ya que son los responsables de la unión irreversible y son lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (CPS),  $\beta$  1,2 glucanos cíclicos (C $\beta$ G), exopolisacáridos ácidos (EPS) (Skorupska *et al.*, 2006). Estos polisacáridos desempeñan una función importante en la adhesión a la punta del pelo radical, ya que se ha demostrado que mutantes deficientes en la síntesis de estos presentan una menor capacidad de infección, baja capacidad para nodular, llegando a afectar en el rango de hospedador (Frayssé *et al.*, 2003; John and Qi 2008). Además, estudios recientes sugieren que en el caso de EPS y LPS pueden desempeñar un papel importante durante la infección reprimiendo la respuesta defensiva de la planta huésped (Cheng and Walker 1998) (Tabla 2).

Las microfibrillas de celulosa que median la firme adhesión de la bacteria a los pelos radicales y son cruciales para la firme adhesión ya que están implicadas en la formación de agregados o “caps” en la punta de los pelos radicales tras la adhesión inicial (Dazzo *et al.*, 1984; Smit *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 1995) (Figura 9, B,D). Además, la implicación de la celulosa en la colonización y adhesión se ha descrito en otras especies bacterianas como *Gluconoacetobacter (Acetobacter) xylinum* (Masaoka *et al.*, 1993), *Escherichia coli* (Monteiro *et al.*, 2009), *Rhizobium leguminosarum* (Mateos *et al.*, 1995) constituyendo el principal componente de la matriz exopolisacáridica.

### 3.2. Infectividad.

La capacidad de penetración por parte del rizobio es un paso imprescindible para una exitosa simbiosis. La entrada en la planta se puede realizar de varias formas (Figura 10). Una de ellas, constituye una vía ancestral a través de los espacios intercelulares independientemente de factores de nodulación. Otra de las vías propuestas en la entrada mediante “cracks” o heridas en la pared celular derivadas de la emergencia de raíces secundarias. La infección canónica, es la forma de entrada más frecuente en la mayoría de las leguminosas. Asimismo, se ha descrito que un mismo rizobio puede presentar varias rutas de penetración en la planta (Madsen *et al.*, 2010).

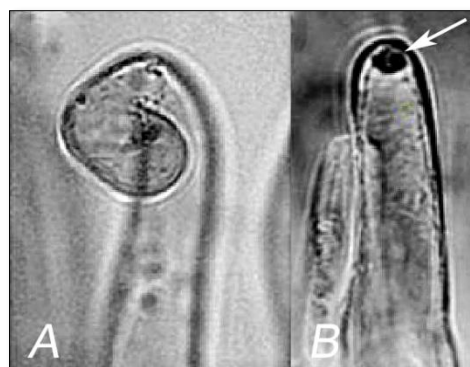
## Introducción



**Figura 10.** Modelos de infección por parte de los rizobios en leguminosas. De izquierda a derecha, se observa la vía más ancestral que consiste en la infección intercelular, seguida de la entrada por cracks, siendo la vía más evolutiva la vía canónica. Modificado de (Madsen *et al.*, 2010).

### 3.2.1. Curvatura y degradación del pelo radicular.

La primera evidencia de una efectiva relación simbiótica es la deformación y posterior curvatura de la punta del pelo radicular, o fenotipo Hac: **hair curling**. Estos cambios fisiológicos estimulan el crecimiento del extremo apical del pelo radicular, formando en última instancia el denominado cayado de pastor (*"Shepherd's crook"*) característico de la interacción *Rhizobium*-leguminosa (Figura 11, A) (Shaw *et al.*, 2000). Se ha descrito que los NF son necesarios para la modulación, extensión y elongación del canal de infección (Dazzo *et al.*, 1996; Szczyglowski *et al.*, 2003), teniendo una gran relevancia los genes *nodF* y *nodL* (Ardourel *et al.*, 1994)



**Figura 11.** Fenotipos radicales característicos de la etapa de Infectividad. A) Cayado de pastor o fenotipo Hac. B) Fenotipo Hot por acción de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en *Trifolium repens*. Adaptado de Robledo *et al.*, 2011

Una vez formado el cayado de pastor, algunas bacterias quedan atrapadas en una cavidad que se corresponden a dónde estaba adheridos, comenzando a formar el canal de infección. La formación del inicio del canal de infección es un proceso altamente regulado, ya que es causado por enzimas hidrolíticas de poligalacturonasas, pectinasas (Oldroyd and Downie 2008). Estudios



recientes, han demostrado que la celulasa simbiótica CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, es la responsable de la formación del fenotipo Hot: **hole on tip** en *Trifolium repens* constituyendo la vía de penetración en la infección primaria (Figura 9, B) (Robledo *et al.*, 2011).

### 3.2.2. Formación y desarrollo del canal de infección.

Seguidamente al atrapamiento de las bacterias en la curvatura y formación del fenotipo Hot, se produce la formación progresiva del canal de infección o fenotipo Inf: **infection thread** (Inf) (Gage 2004). Los canales de infección son estructuras tubulares por donde los rizobios viajan hacia el nódulo donde serán liberados al final del canal. La membrana del IT se origina a partir de la invaginación de la pared vegetal por lo que su constitución es similar, aunque los componentes de su matriz aún no se conocen (Brewin and Hirsch 2004; Gage 2004). Esta separación física impide que la bacteria entre en contacto directo con el interior celular.

Durante la formación del IT se sintetiza nueva pared, existiendo una reorganización de la polaridad de la célula (Gage 2004). El canal de infección atraviesa el pelo por completo y posteriormente, las células adyacentes hasta alcanzar el córtex (Mateos *et al.*, 2011). A medida que el canal de infección se va formando, la degradación de las paredes vegetales es necesaria para permitir el paso al rizobio. El mecanismo de hidrólisis no se conoce en profundidad, algunos autores sugieren la intervención de enzimas hidrolíticas de la planta (Vance 1983), de la bacteria (Mateos *et al.*, 1992, 2011; Robledo *et al.*, 2008) o de ambos simbiosomas (van Spronsen *et al.*, 1994).

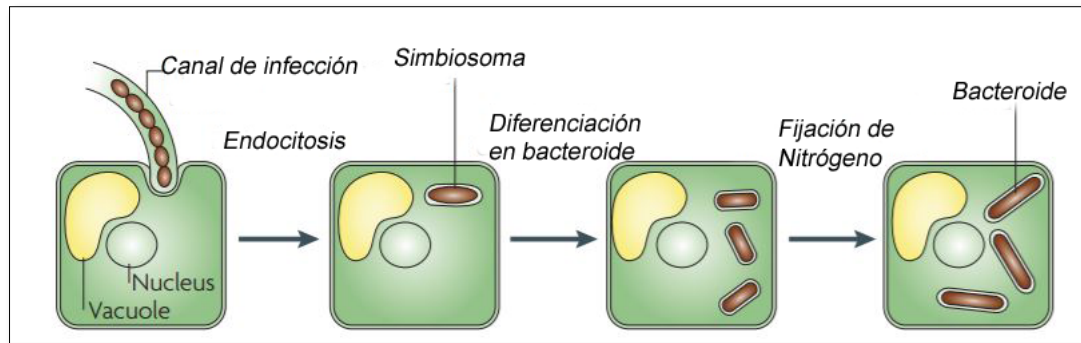
### 3.3. Efectividad.

Esta etapa simbiótica se caracteriza por la liberación de los rizobios desde el canal de IT al interior del nódulo para convertirse en bacteroides y a su capacidad para llevar a cabo la FBN.

#### 3.3.1. Liberación de las bacterias en el nódulo y formación de simbiosomas (infección secundaria).

Al llegar al primordio nodular, los canales de infección liberan en el citoplasma de la célula vegetal a las bacterias de su interior (infección secundaria) rodeadas por una membrana peribacteroidea, para en última instancia convertirse en bacteroides. Este proceso de liberación de las células bacterianas se conoce como fenotipo Bar: **bacterial release** (Figura 12) (Jones *et al.*, 2007b).

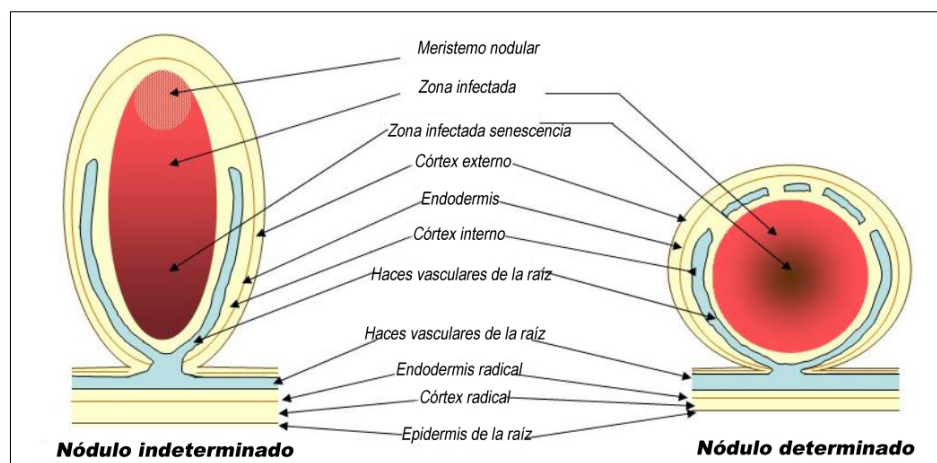
## Introducción



**Figura 12.** Representación esquemática del proceso de infección secundaria. De izquierda a derecha se puede observar la liberación de los rizobios al final del canal de infección, la transformación en bacteroides para llevar a cabo la fijación de nitrógeno en simbiosomas. Modificado de (Jones *et al.*, 2007b).

Algunos de los genes que se han descrito con funcionalidad en esta etapa simbiótica son el gen *hem* que está relacionado con la biosíntesis de proteínas con alguno grupo hemo en su estructura y otras proteínas implicadas en la sensibilidad al oxígeno, se ha descrito que mutantes deficientes en este gen (*hem*) son incapaces de liberarse del canal de infección y formar simbiosomas (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1991; Kereszt *et al.*, 1995). Otro gen es el que codifica para la proteína BacA la cual es indispensable para la protección del bacteroide en *Ensifer meliloti* frente algunos péptidos de secreción ricos en cisteína conocidos como NCR: nodule-specific cysteine-rich peptide que poseen actividad antimicrobiana (Haag *et al.*, 2011) (Tabla 2).

Los nódulos inducidos por los rizobios se dividen en dos tipos: determinado e indeterminados (Figura 13). La diferencia entre ambos tipos radica en que, los nódulos indeterminados son característicos de leguminosas de géneros como *Trifolium*, *Medicago*, *Pisum* y *Vicia*. Además, estos nódulos exhiben una forma alargada y poseen un meristemo permanente que se localiza en el ápice provocando un crecimiento hacia el exterior (Foucher and Kondorosi 2000). Por el contrario, los nódulos determinados se encuentran en leguminosas pertenecientes a los géneros *Phaseolus*, *Lotus*, *Vigna* y *Glycine*. En este tipo no hay meristemo permanente, sino que su crecimiento se realiza en expansión y por ello exhibe una forma esférica.



**Figura 13.** Esquema de los dos tipos de nódulos en leguminosas. Modificado de (Buchanan *et al.*, 2010).

### 3.3.2. Diferenciación en bacteroides y Fijación de Nitrógeno.

La diferenciación del rizobio a bacteroide conlleva una serie de cambios morfológicos, bioquímico e inductores del sistema enzimático de la nitrogenasa, ya que es la encargada de llevar a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico a formas asimilables por las plantas como es el amonio. El fenotipo derivado de esta actividad es conocido como Fix: nitrogen **fixation**.

Referentes a los cambios morfológicos destacan la adquisición en forma de "Y" como ocurre con *Rhizobium leguminosarum* o a un aumento de entre 5 y 7 veces mayor que su tamaño original como ocurre con *Ensifer meliloti* (Wang *et al.*, 2010).

Por otro lado, los cambios bioquímicos hacen referencia al silenciamiento de la mayoría de los procesos metabólicos, así como la inducción de genes involucrados en la respiración y fijación del nitrógeno por parte de los reguladores transcripcionales FixJ y FixK (Tabla 2) que actúan ante la deficiencia de oxígeno dentro del bacteroide (Fischer 1994).

Respecto a la activación de genes, los genes que codifican para el complejo enzimático nitrogenasa son los *nif*. Además, es necesario la activación de leg-hemoglobina para secuestrar el oxígeno evitando que alcance el complejo nitrogenasa bloqueando su activación (Fischer 1994). El amonio derivado de la FBN es asimilado por las plantas en forma de glutamina y es transportado a la planta

Dada la naturaleza simbiótica de esta interacción, es de suma importancia la existencia de un equilibrio en el intercambio de metabolitos, ya que cualquier alteración podría provocar la acidificación del interior del bacteroide y por consiguiente la activación de hidrolasas, muerte del simbiosoma y senescencia del nódulo (Gage 2004).

### 3.4. Los rhizobia.

La selección de un buen probiótico de plantas, además de presentar mecanismos promotores del crecimiento vegetal, debe ser seguro para la salud humana y el medio ambiente. En este sentido, las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son bacterias catalogadas de riesgo 0, es decir, que son inocuas tanto para la salud humana, animal y medio ambiente (García-Fraile *et al.*, 2012).

Esta familia está formada por un conjunto fenotípicamente heterogéneo de bacterias aerobias, Gramnegativas, en forma de bacilos. Dentro de los géneros que conforman la familia *Rhizobiaceae*, los géneros *Rhizobium* y *Ensifer* tienen un especial interés en estudios simbióticos.

#### 3.4.1. El género *Rhizobium*.

El género *Rhizobium* fue descrito por Frank en 1889. Las bacterias englobadas dentro de este género son bacilos, Gram negativos cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 0,9  $\mu\text{m}$  de ancho y 1,2 y 3,0  $\mu\text{m}$  de largo. Son heterótrofos y tienen la capacidad de producir ácido a partir de muchos

## Introducción

azúcares. En la fase logarítmica son móviles y poseen flagelos. La mayoría de ellos producen una matriz polisacárida densa cuya composición puede ser variable.

Los rizobios englobados dentro de este género nodulan leguminosas pertenecientes a los géneros *Phaseolus*, *Trifolium*, *Vicia*, *Lens* y *Pisum*. Los genes involucrados en la simbiosis se localizan en plásmidos que pueden ser transferidos a distintas especies presentes en la rizosfera, de manera que distintas especies pueden establecer simbiosis con una misma leguminosa y viceversa.

Hoy en día y gracias a los avances de secuenciación se dispone del genoma de muchas de ellas, siendo algunos ejemplos *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* WSM2304 (Reeve *et al.*, 2010) o *Rhizobium etli* (González *et al.*, 2006).

Actualmente el género *Rhizobium* consta de 73 especies bacterianas, aunque algunas de ellas no se les conoce hospedador específico ya que se han aislados de sistemas relacionados con el tratamiento de petróleo como *Rhizobium petrolearium* (Zhang *et al.*, 2012), *Rhizobium phenanthrenilyticum* (Wen *et al.*, 2011) o *Rhizobium rosettiformans* que fue aislada de aguas contaminadas con hexaclorociclohexano (Kaur *et al.*, 2011).

Otro ejemplo de rizobio aislado fuera del típico nódulo de leguminosas es *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> aislado de la corteza en descomposición de *Populus alba* por nuestro grupo de investigación (García-Fraile *et al.*, 2007). Asimismo, otras especies del género *Rhizobium* han dilucidado un papel importante en la mejora de plantas no leguminosas, como el tomate y el pimiento como es el caso de la cepa TPV08 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* y aislada de nódulos efectivos de *Phaseolus vulgaris* (García-Fraile *et al.*, 2012) también en nuestro grupo de investigación. Otra especie bacteriana de gran interés es la cepa ANU843 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* empleada como modelo del sistema simbiótico ANU843-*Trifolium repens* dictaminando la importancia de la celulasa simbiótica CelC2 en infección primaria (Robledo *et al.*, 2008), y en la biosíntesis de celulosa bacteriana (Robledo *et al.*, 2012). Debido a la importancia de estas cepas, todas ellas desempeñan un aspecto importante, siendo el eje conductor de la presente tesis doctoral la cepa *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

### 3.4.2. El género *Ensifer* (*Sinorhizobium*).

El género *Ensifer* fue descrito en 1988 por Chen y colaboradores. Estas bacterias son bacilos, Gran negativos, cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 1,0  $\mu\text{m}$  de ancho y 1,2 y 3,0  $\mu\text{m}$  de largo. Son móviles gracias a que presentan un flagelo polar o subpolar. De forma similar al género *Rhizobium*, las bacterias del género *Ensifer* producen una matriz polisacárida mucosa dependiente de cepa.

Las bacterias de este género suelen nodular leguminosas pertenecientes a los géneros *Medicago*, *Trigonella* y *Melilotus*. De entre las diferentes especies que conforman el género, *Ensifer meliloti* es la cepa más empleada como modelo para estudios simbióticos, siendo de un modo más concreto la cepa 1021 (Meade *et al.*, 1982). Se trata de una cepa deficiente en la producción de exopolisacáridos (Glazebrook and Walker 1989), de fácil manejo, cuyo genoma se encuentra secuenciado (Galibert *et al.*, 2001) y su planta hospedadora es *Medicago sativa* (L.).

### 3.5. Las leguminosas.

Las leguminosas pertenecen a la familia *Fabaceae* constituyen un grupo muy heterogéneo dentro de las angiospermas, con una gran biodiversidad morfológica ya que existen en la actualidad más de 18,000 especies diferentes (Sprent 2001).

Conforme a su clasificación actual, las leguminosas se dividen en tres subfamilias: *Faboideae* (*Papilionoideae*), *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae*. Dentro de las dos primeras abundan las leguminosas capaces de establecer simbiosis con los rizobios y por lo tanto de llevar a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, la subfamilia *Caesalpinoideae* no nodulación no suele ser usual (Sprent 2007).

Con respecto a sus características botánicas, destaca su corola amariposada o papilionada. Son plantas con hojas compuestas, con estípula destacadas exhibiendo muy a menudo zarcillos o filamentos. Generalmente poseen 10 estambres soldados formando un tubo. La parte reproductiva de la planta está compuesta por un carpelo y un ovario súpero.

Las leguminosas, desde un punto de vista ecológica, son de gran importancia en la sucesión ecológica del suelo tras daños medio ambientales, como incendios, desertificación o agotamiento de recursos por cultivos extensivos, ya que, al ser capaces de disponer del nitrógeno atmosférico a través de la interacción simbióticos con los rizobios, confiriendo un cierto grado de autonomía respecto al estado nutricional del suelo (Crews 1999). La alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium repens*) y algunas especies de altramuces (*Lupinus* sp.) se emplean como plantas forrajeras para la recuperación de suelos, así como abono verde en la rotación de cultivos siendo una buena alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos (Biederbeck *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista de la alimentación humana y animal, las leguminosas de grano ocupan la segunda posición tras la familia *Poaceae*, debido a la fuente de proteínas. En España, las principales leguminosas de grano que se dedican al consumo humano son judías (*Phaseolus vulgaris*), lentejas (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*). La principal productora de leguminosas en la campaña 2018/2019 conforme a los datos disponibles por MAPA, fue Castilla y la Mancha (39%), seguida de Castilla y León (30%), Andalucía (20%), Aragón (5%), otras (4%), siendo las últimas Extremadura y Galicia con un 1% cada una de ellas (Figura 14).

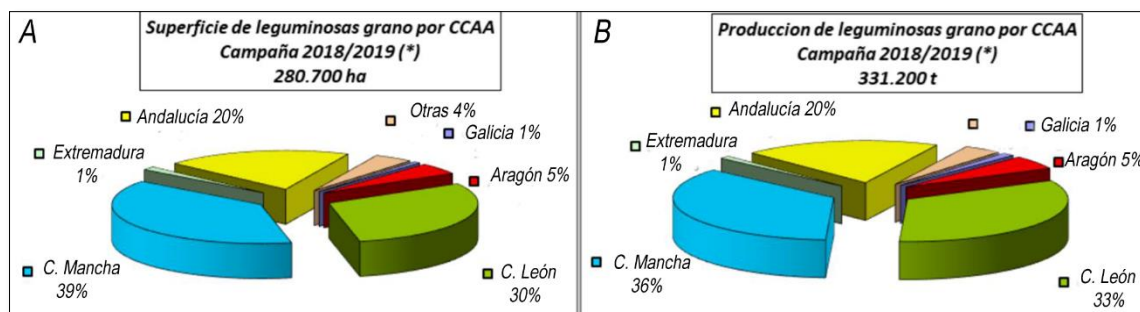


Figura 14. Distribución de la superficie y producción de leguminosas de grano en España por Comunidades Autónomas. Adaptado de la SGCHIAO a partir de los datos de los avances de superficies y producciones. Adaptado de MAPAMA.

## Introducción

### 3.5.1. *Trifolium repens* L.

El género *Trifolium* deriva del latín tre y folium y significa “tres hojas”. Además, es uno de los más abundantes de la subfamilia Papilionoideae. Generalmente se localizan en climas templados. Son planta herbáceas, perennes o anuales, y sus hojas se encuentran formando folíolos, con estípulas en la base de peciolo y al menos parcialmente soldadas. Las inflorescencias capituliformes (Figura 15)

El trébol es una planta de gran interés en la agricultura como planta forrajera mejorando las condiciones del suelo. Además, posee un alto valor cultural ya que es considerado un símbolo de buena suerte universal cuando tiene 4 hojas. De entre las diferentes especies, el trébol blanco es la leguminosa mejor adaptada para las praderas, es muy exigente con la luz y la mayor producción se obtiene en primavera y verano.

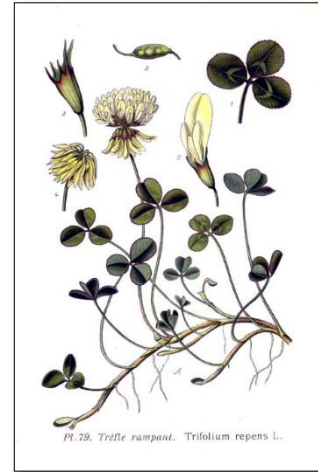


Figura 15. *Trifolium repens* L.

### 3.5.2. *Medicago sativa* L.

*Medicago sativa* L. es la planta que comúnmente se conoce como alfalfa o mielga y pertenece a la familia *Fabaceae*. Se trata de plantas herbáceas, perennes que pueden llegar alcanzar entre los 10-80 cm de altura. Las hojas son trifoliadas con el margen aserrado. Las flores presentan colores de tonalidades desde violetas a púrpuras o amarillas. Las inflorescencias son con numerosas flores en racimos, cuyos pedúnculos son más largos que las hojas adyacentes (Figura 16).



Figura 16. *Medicago sativa* L.

Se trata de una planta con un amplio rango climático, ya que tolera el calor y es resistente a la sequía. También puede soportar bajas temperaturas, tolera la salinidad, pero no el encharcamiento.

Esta planta, se utiliza en el ámbito de la agricultura como planta forrajera para el ganado, ya que tiene un elevado contenido proteico y es de alta digestibilidad.

### 3.5.3. *Phaseolus vulgaris* L.

*Phaseolus vulgaris* L. es la especie más conocida del género *Phaseolus* que recibe numerosos nombres comunes como alubia, aba, frijol habichuela, poroto, judía. Pertenece a la familia *Fabaceae*. Es originaria de sur de México, América Centra y América del Sur. Se trata de una planta de vida corta, erecta o trepadora, herbácea, de crecimiento rápido y sistema radicular pivotante. Pueden llegar alcanzar desde los 40 cm hasta los 3 metros de largo las enredaderas. Las hojas son trifoliadas, con folíolos de forma triangular. Las estípulas se encuentran en la base de los folíolos como en la base del pecíolo. Las flores se disponen en racimos, la corola pues exhibir diferentes colores como blanca, amarilla, violeta o roja (Figura 17).

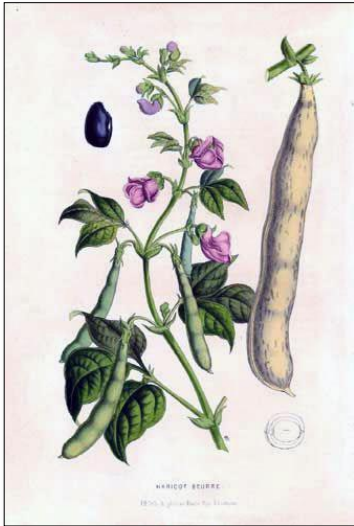


Figura 17. *Phaseolus vulgaris* L.

Se trata de uno de los cultivos más antiguos empleados por el ser humano y tiene un alto valor en proteínas y fibras. En cuanto a sus condiciones para el cultivo, admite una amplia gama de suelos, prospera en climas fríos y cálidos. El consumo de esta planta se centra en sus semillas o la vaina.

## 4. Uso de *Rhizobium* como probiótico para la mejora de la producción de cereales.

Conforme a la FAO (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>), tras la caña de azúcar, los siguientes tres primeros cultivos en términos de producción (millones de toneladas, MT) a nivel mundial son el maíz (*Zea mays*), el arroz (*Oryza sativa*) y el trigo (*Triticum aestivum*), cuya producción en 2011, fue de 883 MT, 723MT y 704 MT, respectivamente. Para el año 2050 se estima una demanda del doble de lo obtenido en 2011 (Rosegrant *et al.*, 2009). El cultivo de cereales ha sido posible gracias al uso intensivo de fertilizantes químicos. Desafortunadamente, estas prácticas agrícolas generan una seria problemática medio ambiental, económica y perjudicial para la salud humana. Por ello, la búsqueda de alternativas más sostenibles que permitan reducir la dependencia de los fertilizantes químicos, manteniendo a su vez los rendimientos óptimos es un gran desafío (Dazzo and Yanni 2006).

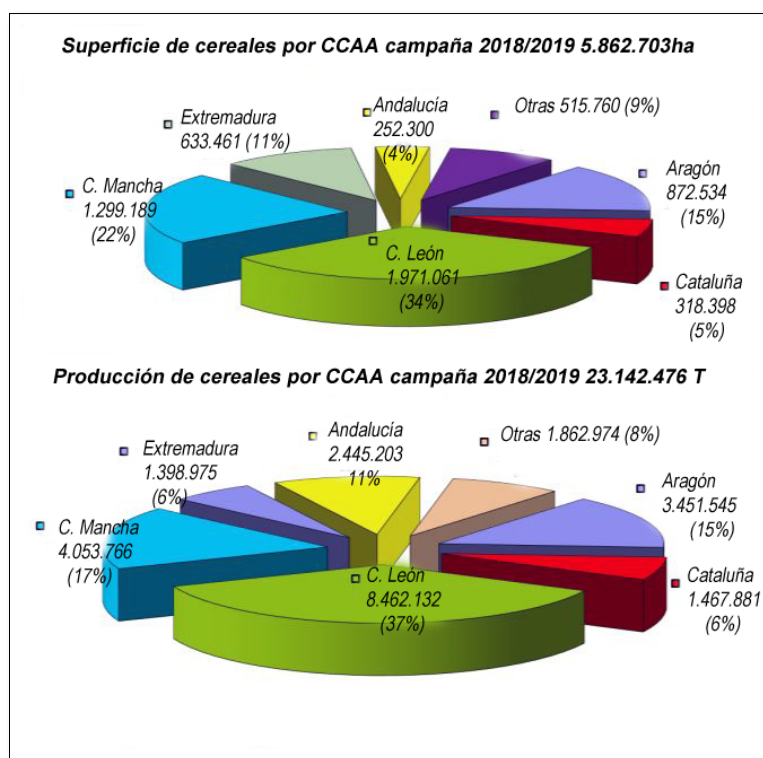
En los años 90s, el International Rice Research Institute (IRRI) puso de manifiesto la necesidad de explorar alternativas biológicas al uso de fertilizantes químicos para la producción de arroz. Estableciendo como uno de sus mandatos, la posibilidad de explorar la potencial relación natural entre rizobios y las raíces de plantas de arroz (Khush and Bennett 1992). Yanni y colaboradores decidieron analizar el mandato establecido por la IRR. Para ello, escogieron la región del Delta del Nilo donde se cultiva el arroz, y además se realizan prácticas agrícolas que incluyen sistemas de rotación con la leguminosa *Trifolium alexandrinum* L. Sus resultados pusieron de manifiesto que la cepa E11 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* era capaz de colonizar las raíces del arroz mejorando su producción (Yanni *et al.*, 1997). Unos años más tarde, estos mismos autores, determinaban que la cepa E11, además, de colonizar la superficie de las

## Introducción

raíces del arroz, era capaz de comportarse como endófito, comportamiento acuñado al complejo enzimático hidrolítico de celulasas y pectinasas detectados. Asimismo, detectaron en la cepa E11 la existencia de mecanismos promotores del crecimiento vegetal explicando de este modo el incremento observado en el estudio previo (Yanni *et al.*, 2001).

Estos estudios no han sido los únicos que han puesto de manifiesto la relevancia de las interacciones beneficiosas de *Rhizobium* con otros cultivos diferentes a las leguminosas, y de gran valor económico como son los cereales. Diversos estudios avalan mejoras en el rendimiento agrícola de *Oryza sativa* (Biswas *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2005); en *Zea mays* mejorando el rendimiento de la biomasa total obtenida entre un 20-45% (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001), y en *Triticum aestivum* llegando a incrementar un 24% en el rendimiento del grano y en el peso seco de la parte aérea (Lupwayi *et al.*, 2004).

Conforme a lo establecido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación el cultivo de cereales en España tiene una media de 6 millones de hectáreas, constituyendo el sector con mayor base y distribución territorial. La dimensión económica en el año 2018 derivado de la producción de cereales fue de 4.278 millones de euros. Las variedades de cereales más importantes a nivel nacional son el trigo blando (*Triticum aestivum*), el trigo duro (*Triticum durum*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), centeno (*Secale cereale*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), mijo (*Panicum miliaceum*) y alpiste (*Phalaris canariensis*). Según los datos públicos disponibles correspondientes al censo agrario de 2016 del INE, en España se contabilizaron 272.335 explotaciones de cereales, siendo el tamaño medio de 24,2 hectáreas ubicándose las mayores explotaciones en términos de superficie en Castilla y León (24%), Castilla la Mancha (22%), Aragón (15%). Extremadura (11%), otras (9%), Cataluña (5%) siendo en último lugar Andalucía (4%) (Figura 18).



**Figura 18.** Distribución de la superficie y producción de cereales en España por Comunidades Autónomas. Adaptado de la SGCHIAO a partir de los datos de los avances de superficies y producciones. Adaptado de MAPAMA.



#### 4.1. *Zea mays* L.

*Zea mays* L. es el nombre científico de esta especie perteneciente a la familia *Poaceae* (gramíneas) conocida vulgarmente como maíz, aba, choclo y elote. Se trata de una planta original de América tropical, el tallo puede llegar a alcanzar los 3 metro, su interior está formado por un material esponjoso y se encuentra rodeado de múltiples nudos desde donde nacen las hojas. Éstas son largas, lanceoladas, alternas, paralelinervias y de gran tamaño. Es una planta monoica ya que presenta las inflorescencias masculinas y femeninas separadas en la misma planta. Las inflorescencias masculinas es una panícula conocida vulgarmente como penacho o espigón. En cambio, la inflorescencia femenina tras la fecundación se denomina mazorca. Al ser una planta monoica, la polinización cruzada se ve favorecida (Figura 19). En cuanto a sus necesidades agronómicas, las condiciones óptimas de crecimiento son entre 20 y 30°C, con grandes necesidades de agua, aunque no tolera los encharcamientos. El maíz es uno de los principales alimentos cultivados del mundo que no sólo se destina al consumo humano, sino que también tiene una gran importancia en el sector pecuario.



Figura 19. *Zea mays* L.

#### 4.2. *Triticum aestivum* L.

*Triticum aestivum* L. es el nombre científico del trigo perteneciente a la familia *Poaceae* (gramíneas). El origen de esta planta se encuentra en una región asiática comprendida entre los ríos Tigris y Eufrates. Se trata de una planta anual y monocotiledónea que puede llegar alcanzar más de un metro de altura. Sus tallos son erectos y están huecos en su interior, siendo su crecimiento meristemático como consecuencia del estiramiento de los tejidos. Las hojas nacen de los nudos y constan de dos partes, la vaina que rodea al peciolo protegiendo la zona del meristemo o crecimiento, y el limbo que tiene forma alargada y presenta nervios paralelos. Las flores se reúnen en espigas y no presentan ni pétalos, ni sépalos. Cada flor femenina consta de un ovario con dos estigmas plumosos y pegajosos. Las flores masculinas exhiben tres estambres (Figura 20).



Figura 20. *Triticum aestivum* L.

En cuanto a sus necesidades agronómicas, la temperatura óptima de su cultivo está comprendida entre 10 y 24°C, requiere unas grandes necesidades lumínicas con exposición directa al sol. El trigo se cultiva tanto para alimentación humana como agropecuaria.

## Introducción

### 4.3. *Avena sativa* L.

*Avena sativa* L. es el nombre científico de la avena perteneciente a la familia *Poaceae* (gramíneas). El origen de esta planta es incierto, aunque se piensa que procede de las regiones carpianas del Cáucaso y también de las llanuras cercanas al Turkistán. Se trata de una planta anual pudiendo llegar a alcanzar desde los 40 cm hasta los 150 cm. Su tallo es grueso y erecto. Las hojas son alargadas, planas, que exhiben un limbo estrecho y largo de coloración oscura. Sus flores se disponen en espigas (Figura 21).

En cuanto a sus requerimientos agronómicos, son menos resistentes a las heladas que el trigo, prefiere los suelos de climas frescos y húmedos. No tolera el encharcamiento. Se trata de un cereal forrajero, con diversas formas de aprovechamiento agrícola. De manera tradicional, el grano de avena se cosecha para alimentar al ganado. Tras la recogida del grano, se pueden realizar pastoreos de los rastrojos en el campo. Además, su cultivo puede mezclarse con leguminosas como la veza, siendo habitual segar el pasto y henificar en estado de inmaduras las leguminosas.

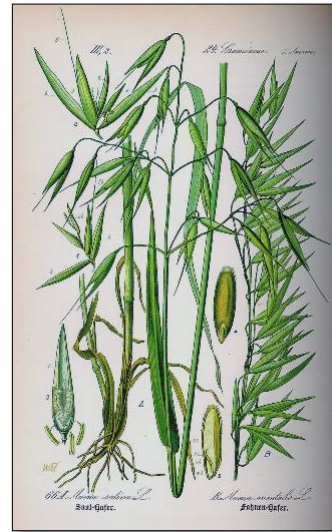


Figura 21. *Avena sativa* L.

## 5. La importancia de la celulosa bacteriana en el ámbito agrícola.

La celulosa es un biopolímero lineal constituido por unidades  $\beta$ -(1,4)-D-glucopiranosas en cadenas no ramificadas unidas entre sí por puentes de hidrógeno (Jonas and Farah 1998; Matthews *et al.*, 2006). Esta molécula es el componente principal de las paredes celulares de las plantas, constituyendo la fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza. Es insoluble en agua y presenta 6 formas cristalinas (I, II, III, IV, V, VI) que dan lugar a diferentes polimorfismos. En la naturaleza encontramos las formas I y II, mientras que el resto de ellas se obtienen a través de transformaciones químicas o térmicas (Šturcová *et al.*, 2004).

La celulosa tiene una gran importancia en el sector biotecnológico ya que se emplea en diversas industrias como son la textil, papelera, alimenticia, de explosivos, bioetanol, medicina y en la fabricación de membranas. La mayor parte de la celulosa es de origen vegetal. Sin embargo, desde su descubrimiento en el reino procariota ha adquirido una gran relevancia. A pesar de que ambas celulosas muestran una composición química idéntica, sus propiedades estructurales y físicas difieren, siendo una de las más características, el alto grado de pureza de la celulosa bacteriana, ya que a diferencia de la celulosa vegetal no está asociada a hemicelulosa y lignina (Cegelski *et al.*, 2017).

Dentro del ámbito de la agricultura, conocer la importancia y mecanismos involucrados en la producción de celulosa bacteriana, es de gran utilidad. La colonización de las raíces de la planta huésped se considera una etapa crucial en la aplicación de microorganismos beneficiosos como la biofertilizantes, fitoestimuladores, biopesticidas (Bhattacharyya and Jha 2012).

### 5.1. Biosíntesis de celulosa bacteriana.

La celulosa bacteriana es un polímero extracelular que fue descubierto por el químico británico Adrian J Brown como un componente de la película gelatinosa formada sobre el fermento del vinagre llevada a cabo por *Bacterium xylinum* (Brown 1886), convirtiéndose de este modo, en la bacteria modelo para su estudio. Durante años, ha sido reclasificada varias veces como *Acetobacter xylinum* o *Gluconobacter xylinum*, siendo la última reclasificación como *Komagataeibacter xylinus* (Yamada *et al.*, 2012). Hoy en día, la biosíntesis de celulosa se ha documentado en una gran variedad de procariotas que incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno como por ejemplo *Rhizobium leguminosarum* *bv trifoli* (Mateos *et al.*, 1995), bacterias del suelo pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*, fitopatógenos como *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya dadanteriorum*, en el productor de tumores *Agrobacterium tumefaciens* e incluso en bacterias modelos como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (Römling 2002).

Los estudios realizados sobre la biosíntesis de celulosa bacteriana han demostrado su importancia en mecanismos de exportación de polisacáridos, regulación de las respuestas de las células bacterianas al oxígeno y óxido nítrico, motilidad celular, interacciones célula-célula y como componente principal de los biofilms protegiendo a las bacterias de agentes mecánicos y químicos así como para facilitar la adhesión a superficies bióticas y abióticas (Römling and Galperin 2015).

El mecanismo general involucrado en la biosíntesis de celulosa bacteriana está esquematizado en la figura 22. Se lleva a cabo en dos etapas principalmente, siendo la primera la conversión de la fuente de carbono (glucosa) en uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa) y la segunda en la transformación del UDP-glucosa en celulosa y su exportación al medio exterior. En la primera etapa, la glucosa se transforma en glucosa -6- fosfato por acción de la enzima glucoquinasa, posteriormente la enzima fosfoglucomutasa transforma la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato. El siguiente paso es la conversión de este último en UDP-glucosa en presencia de la enzima UDPG pirofosforilasa. Finalmente, la celulosa sintasa es la responsable de la polimerización de la celulosa (Moniri *et al.*, 2017).

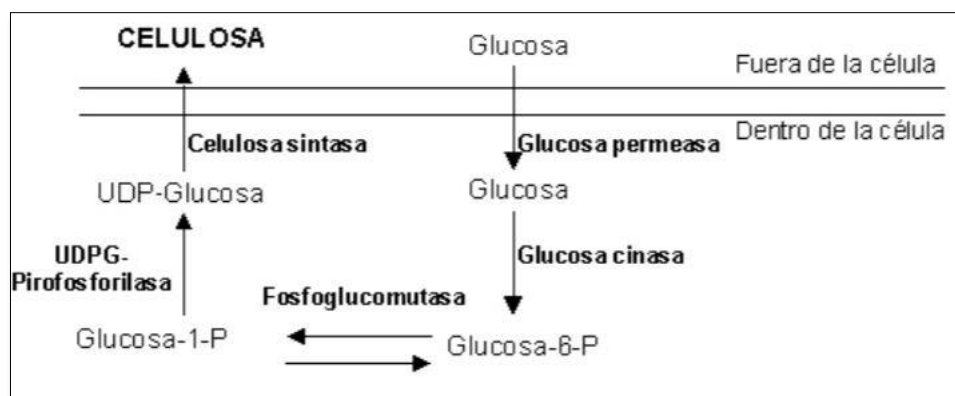


Figura 22. Esquema de la ruta de biosíntesis de la celulosa bacteriana. Adaptado de (Micaela Marcela and Membrillo Hernández 2004).

Las moléculas de celulosa se sintetizan primero en el interior de las bacterias. Sin embargo, aún no se sabe con exactitud los mecanismos responsables de esa polimerización y existe una gran controversia. Hay autores que establecen que la traslocación de las cadenas de

## Introducción

celulosa al exterior celular es debido a la existencia de un lípido intermedio (De Iannino *et al.*, 1988), mientras que otros autores determinan que la traslocación no es debida a la existencia de un lípido intermedio, sino que la polimerización se lleva a cabo por la adicción de residuos de glucosa al extremo no reductor del polímero (Brown Jr and Saxena 2000).

### 5.2. Regulación de la biosíntesis de celulosa bacteriana.

Gracias a los avances en la era de la genómica, hoy en día se tiene más información sobre las subunidades que conforman los operones involucrados en la biosíntesis de celulosa bacteriana, contribuyendo a la adquisición de un mejor conocimiento.

Los estudios realizados por Römling (2002) ponen de manifiesto, la existencia de dos genes involucrados en la biosíntesis de celulosa comunes en todas las especies; la celulosa sintasa y la proteína de unión al ácido bis-(3'-5') cíclico diguanílico (c-di-GMP). La celulosa sintasa es el primer gen del operón codificado por *bcsA* (**b**acterial **c**ellulose **s**ynthesis), también denominado *acsA* (**A**cetobacter **c**ellulose **s**ynthesis) o *celA* (**c**ellulose), y es el más conservado dentro del operón *bcs* entre las especies. En segundo lugar, está la proteína de unión al c-di-GMP codificada por *bcsB* cuyos sinónimos son *acsB* o *celB*, y esta menos conservada.

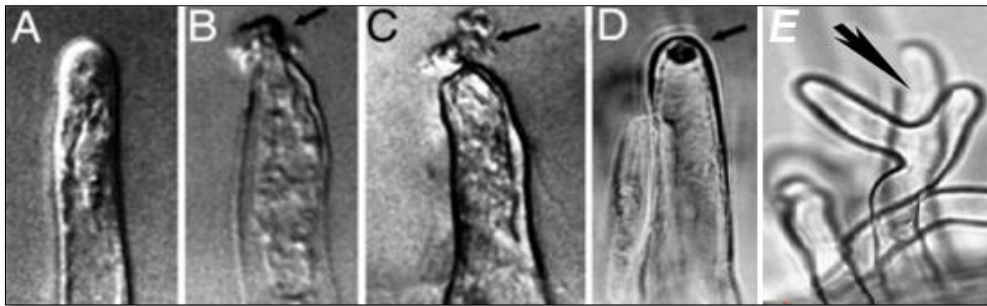
El c-di-GMP es un segundo mensajero que regula la motilidad celular, la virulencia, división celular y formación de biofilms. Los niveles de c-di-GMP libre están controlados por la acción de dos enzimas con actividad opuesta. Por un lado está la enzima diguanilato ciclasa (DGC) que cataliza la formación de c-di-GMP, y la enzima fosfodiesterasa A (PDEA) que degrada el c-di-GMP (Tal *et al.*, 1998).

En el modelo *Komagataeibacter xylinus* se ha identificado que el c-di-GMP es un activador alostérico de *bcsA* (Ross *et al.*, 1987). Sin embargo, el 90% del c-di-GMP celular se encuentra unido por la proteína de unión a c-di-GMP *bcsB* de manera reversible, una proteína de membrana asociada estructuralmente con la celulosa sintasa (Wong *et al.*, 1990; Mayer *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 2001). El equilibrio entre c-di-GMP libre y unido está regulado por la concentración de potasio intracelular (Weinhouse *et al.*, 1997). A pesar de ello, los mecanismos a nivel molecular involucrados en la biosíntesis de celulosa están sin aún sin resolver. En el caso de *Agrobacterium tumefaciens* se ha propuesto la existencia de dos intermediarios lipídicos diferentes en la biosíntesis de celulosa derivado del producto génico *celDE* (Matthysse *et al.*, 1995). Sin embargo, en el modelo *Komagataeibacter xylinus* no existen indicios de la existencia de homólogos al gen *celDE* (Römling 2002).

Años más tarde, los estudios llevados a cabo por Römling and Galperin (2015) ponen de manifiesto la existencia de una inesperada diversidad de operones de celulosa sintasa, inclusive entre bacterias taxonómicamente cercanas, poniendo de manifiesto la existencia de diferentes mecanismos de secreción. Debido a ello, estos autores establecen una clasificación de 3 clases principales, siendo cada una de ellas susceptible de dividirse en subclases. De entre ellos, se encuentra la tercera clase de operones involucrados en la biosíntesis de celulosa, que están formados por los genes *bcsA*, *bcsB* y *bcsZ*. Este último gen codifica para una celulosa (familia 8 de las glicosilhidrolasas), cuyos sinónimos son *CMC* en *Komagataeibacter xylinus* y *celC* en *Agrobacterium tumefaciens* (Römling 2002) y *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* donde se ha demostrado que se requiere para la biosíntesis de celulosa (Robledo *et al.*, 2012).

### 5.2.1. El operón *celABC* de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843.

El gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 codifica para una 1,4- $\beta$ -D glucopiranosasa (EC 3.2.1.4) denominada CelC2. Presenta especificidad de sustrato para la celulosa no cristalina, coincidiendo con la composición de los ápices de los pelos radicales y el final del canal de infección, cuyos parámetros óptimos de temperatura y pH son 37°C y 5 respectivamente. Además, esta enzima es la responsable de la degradación controlada de la punta del pelo radicular formando el denominado del fenotipo HOT (Hole on the tip) (Figura 23, B-D) en el proceso de infección de *Rhizobium leguminosatum* bv *trifolii* AU843 en *Trifolium repens*. El orificio presenta dos o tres micras de diámetro, permitiendo la entrada del microorganismo (Mateos *et al.*, 2011) (Figura 23). Asimismo, mutantes superproductores de dicha celulasa inducen un nuevo fenotipo denominado RaT (Redirections at the Tip) que comprende solamente las redirecciones en la punta del pelo radicular (Menéndez, TD, 2014) (Figura 23, E).



**Figura 23.** Actividad biológica de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 en los pelos de *Trifolium repens*. A) Tratamiento control. B) Inicio de la formación del fenotipo HoT. C) Extrusión del protoplasto y liberación a través del orificio formado. D) Orificio final formado por la celulasa CelC2 en el ápice del pelo. Adaptado de Robledo *et al.*, (2008). E) Fenotipo RaT (Menéndez, TD, 2014).

El gen *celC* está localizado cerca de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de celulosa bacteriana, ubicados en el cromosoma y formando el operón *celABC*. Un estudio reciente a puesto de manifiesto el papel de la celulosa y celulasas de *Rhizobium* en la colonización y formación de biofilms (Robledo *et al.*, 2012). Mutantes knock-out de la celulasa CelC2 en *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 mostraron una desregulación en la biosíntesis de celulosa, debido a que esté aumento de manera significativa. Asimismo, mutantes super productores de dicha celulasa, provocaron una reducción en la formación de celulosa y biofilms significativa con respecto a la cepa wt. En cuanto al proceso de infección, los estudios muestran que los mutantes knock-out de la celulasa CelC2 exhiben un defecto en la erosión de la punta del pelo radicular, así como la no formación de canales de infección. El resultado final es la formación de nódulo vacíos en su hospedadora (*Trifolium repens*) (Robledo *et al.*, 2008). Por otro lado, la aplicación exógena del enzima en las raíces de *Medicago sativa*, no muestran ningún efecto lo cual sugiere una posible especificidad (Mateos *et al.*, 2011).

Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de las celulosas y celulasas rizobianas en la interacción simbiótica. Sin embargo, poco es conocido sobre su mecanismo de regulación.

## 6. Importancia de las técnicas de secuenciación para el análisis y selección de bioinoculantes para el desarrollo de una agricultura sostenible.

Los avances en secuenciación genómica de las últimas décadas nos han brindado herramientas que nos permiten obtener millones de secuencias de ADN a una gran velocidad y de mayor tamaño que las obtenidas por los métodos tradicionales. Asimismo, estos avances permiten responder a muchas preguntas de índole científica mejorando nuestra capacidad de respuesta frente a determinados eventos (Rodríguez-Santiago and Armengol 2012).

Dentro del ámbito de la microbiología, la primera revolución en la secuenciación masiva de genomas bacterianos se puso de manifiesto con *Whole Genome Shotgun* (WGS) con proyectos dirigidos a la secuenciación de organismos modelos como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Burland *et al.*, 1993; Glaser *et al.*, 1993). Asimismo, el primer genoma secuenciado fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995).

La segunda revolución se estableció con la secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación, que permite secuenciar de miles a millones fragmentos de ADN en el mismo tiempo. En esta etapa la llegada del Analizador Genómico de Illumina (California, USA) supuso una verdadera revolución. Sin embargo, esta tecnología seguía siendo costosa. Como consecuencia de ello, nace la secuenciación de tercera generación que se basa fundamentalmente, en la eliminación de la etapa correspondiente al proceso de la PCR, tratando de realizar la secuenciación a partir de una sola secuencia de ADN. Todo ello, abarata costes y además, proporciona lecturas largas que facilitan el proceso de ensamblaje. Hoy en día, esta tecnología se encuentra en el mercado desarrollada por Pacific Bioscience (Eid *et al.*, 2009) (Figura 24).

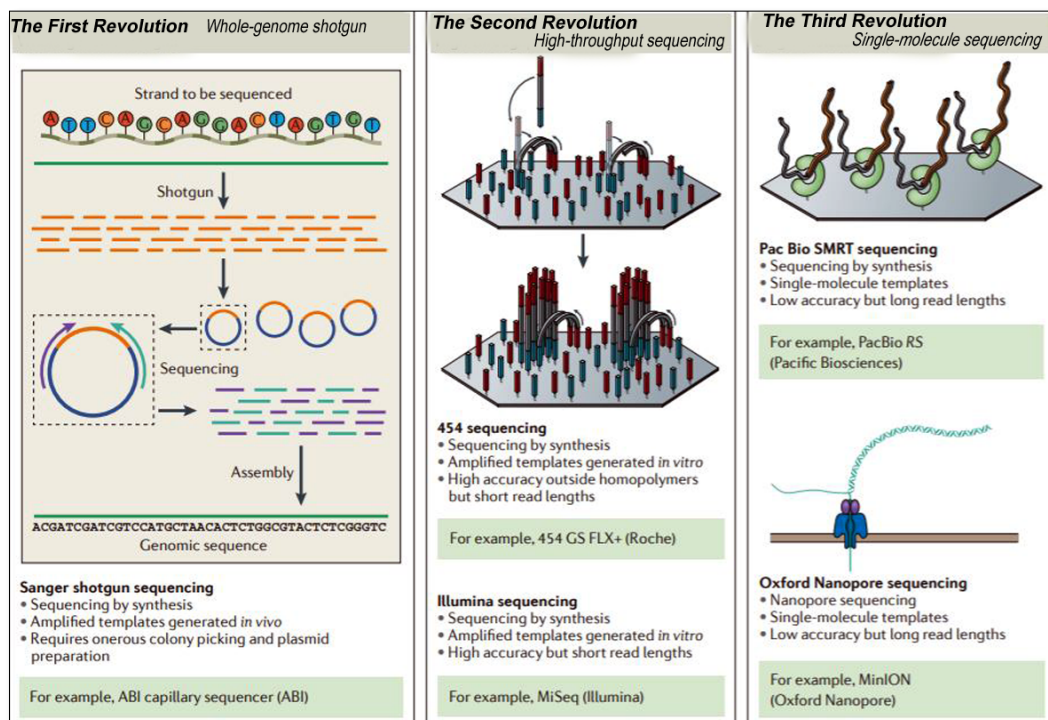


Figura 24. Revoluciones tecnológicas ocurridas en los últimos 20 años en la secuenciación de los genomas bacterianos. Adaptado de (Loman and Pallen 2015).

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la secuenciación del genoma de diferentes géneros bacterianos para una mayor comprensión, así como sus mecanismos PGPRs como por ejemplo *Pseudomonas* sp. (Duan *et al.*, 2013), *Pseudomonas fluorescens* F113 (Redondo-Nieto *et al.*, 2012), *Bacillus amyloliquefaciens* (Chen *et al.*, 2007), *Azospirillum brasilense* CBG497 (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2012), *Azospirillum amazonense* (Sant'Anna *et al.*, 2011), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Kaneko *et al.*, 2002).

En cuanto al análisis de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, hay estudios para la mejora de la comprensión de los mecanismos empleados para la supervivencia en el suelo como es el caso de la cepa 3841 de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Young *et al.*, 2006), dentro del ámbito de la taxonomía y realizar reclasificaciones, o inclusive para comprender de un modo más amplio la interacción *Rhizobium*-leguminosa (MacLean *et al.*, 2007).





# Objetivos



La agricultura del siglo XXI es un reto global que necesita un cambio hacia prácticas agrícolas sostenibles para la mejora de las condiciones ambientales y de la salud humana. Por ello, los estudios de las interacciones planta-microorganismo desde el punto de vista agrícola han despertado un gran interés en la comunidad científica desde hace años, debido a su potencial como alternativa para mitigar el uso de fertilizantes químicos.

Dentro de estas, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ha sido muy estudiada debida al proceso de la Fijación Biológica del Nitrógeno llevada a cabo en el interior de los nódulos. Además, en los últimos años diversos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de este género bacteriano para establecer una relación beneficiosa con otros cultivos de gran interés como son los cereales o plantas hortícolas, poniendo de manifiesto su aplicación como potenciales bioinoculantes de un amplio rango de hospedadores. No obstante, un buen bioinoculante debe de poseer una serie de características como son su rango de bioseguridad, su capacidad para promover el crecimiento vegetal, así como su capacidad para competir en la rizosfera. En relación a este último, la biosíntesis de celulosa constituye un mecanismo esencial para la adhesión de los microorganismos tanto patógenos como beneficiosos a la superficie radicular, siendo necesario la comprensión de los mecanismos de regulación implicados.

Por tanto, con el objetivo general de estudiar a la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* como potencial bioinoculante de un amplio rango de hospedadores, así como los posibles mecanismos de regulación en la biosíntesis de celulosa de las interacciones *Rhizobium*-leguminosa, se han establecido los siguientes objetivos concretos para este trabajo de investigación:

1. Estudio *in vitro* de los mecanismos PGPRs de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* y análisis de la presencia de genes simbióticos relacionados con la infección y nodulación.
2. Secuenciación, anotación y análisis del genoma de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*.
3. Análisis del comportamiento simbiótico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en las raíces de diferentes leguminosas como *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Phaseolus vulgaris*, así como de sus potenciales mecanismos promotores del crecimiento vegetal en inoculaciones simples y en coinoculación con un endosimbionte natural bajo condiciones controladas de cámara iluminada e invernadero.
4. Análisis de la colonización e infección de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en las raíces de cereales como *Avena sativa*, *Zea mays*, y *Triticum aestivum*, así como el estudio de sus potenciales capacidades promotoras del crecimiento vegetal en dichos cereales bajo condiciones controladas de cámara iluminada, invernadero y ensayos de campo.
5. Obtención de cepas de ALA10B2<sup>T</sup> que expresen de manera heteróloga la celulasa CelC2 de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* y la celulasa CelC de la cepa WSM419 de *Ensifer medicae* y evaluación de las propiedades simbióticas de los mutantes mediante inoculación en diferentes leguminosas y en la biosíntesis de celulosa bacteriana.

## Objetivos

6. Análisis del control y regulación del operón *ce/ABC* de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*.

# **Materiales y Métodos**



## 1. Técnicas microbiológicas.

### 1.1. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

#### 1.1.1. Cepas bacterianas de *Rhizobium cellulosilyticum*.

La mayor parte del trabajo presentado en esta tesis doctoral, se ha llevado a cabo con la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> aislada de la corteza en descomposición de *Populus alba* e identificada por nuestro grupo de investigación (García-Fraile *et al.*, 2007).

**Tabla 3:** Cepas de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> utilizadas en el estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
ALA10B2 <sup>T</sup>	Cepa silvestre. Nod <sup>-</sup> Fix <sup>w</sup>	(García-Fraile <i>et al.</i> , 2007)
ALA10B2 <sup>T</sup> _GUS	Derivada de ALA10B2 <sup>T</sup> . Contiene pGUS3; Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
ALA10B2 <sup>T</sup> _RFP	Derivada de ALA10B2 <sup>T</sup> . Contiene pBHR-mRFP (rfp). Tc <sup>r</sup>	Este trabajo.
ALA10B2 <sup>T</sup> _wsm419	Derivada de ALA10B2 <sup>T</sup> . Contiene pEMC ("celC" WSM419) Km <sup>r</sup>	Menéndez, TD, 2014
ALA10B2 <sup>T</sup> _celC_843	Derivada de ALA10B2 <sup>T</sup> . Contiene pSRK ("celC" ANU843) Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
ALA10B2 <sup>T</sup> _pSRKØ	Derivada de ALA10B2 <sup>T</sup> . Contiene pSRK "empty vector" Km <sup>r</sup>	Este trabajo.

#### 1.1.2. Cepas bacterianas de *Rhizobium leguminosarum*.

##### 1.1.2.1 *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*.

La cepa bacteriana *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 fue cedida por el grupo de interacciones planta-microorganismo, Research School of Biological Sciences, The Australian National University (Canberra, Australia). Esta cepa ha sido empleada en numerosos estudios de infección de los rizobios en leguminosas. Asimismo, nuestro grupo de investigación ha utilizado a la cepa ANU843 como modelo en la producción de biosíntesis de celulosa bacteriana. Por todo ello, tanto la cepa salvaje como sus derivadas (Tabla 4), se seleccionaron para los diferentes estudios llevados a cabo a lo largo de la memoria doctoral.

## Materiales y Métodos

Tabla 4. Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 utilizadas en el estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
ANU843	Cepa silvestre. Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	(Rolfe et al., 1980)
ANU843pBBGFP $\phi$	Derivada de ANU843. Contiene pBBGFP $\phi$ para fusiones transcripcionales, gen gfp sin promotor Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Anu843_celApBBGFP	Derivada de la ANU843. Contiene pBBcelAGFP (inserción de 185 pb celA) Km <sup>r</sup>	Este trabajo
ANU843_107pBBGFP	Derivada de ANU843. Contiene pBBcelC107GFP (inserción 146 pb celB) Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Anu843_492pBBGFP	Derivada de ANU843. Contiene pBBcelC492GFP (inserción 512 pb celB) Km <sup>r</sup>	Este trabajo
ANU843synGFP	Derivada de ANU843. Contiene synGFP (gfp) Tc <sup>r</sup>	(Robledo et al., 2011)

### 1.1.2.2. *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*.

La cepa TPV08 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* se aisló de nódulos efectivos de alubia (García-Fraile et al., 2012) por nuestro grupo de investigación. Por ello, esta y sus derivadas (Tabla 5) se emplearon durante los experimentos llevados a cabo en *Phaseolus vulgaris*.

Tabla 5. Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 empleadas en este estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
TPV08	Cepa silvestre. Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	(García-Fraile et al., 2012)
TPV08synGFP	Derivada de TPV08. Contiene synGFP(gfp); Km <sup>r</sup>	Este trabajo.

### 1.1.3. Cepas del género *Ensifer* empleada en este estudio.

Durante el desarrollo de este trabajo, también se emplearon diferentes cepas englobadas dentro del género de *Ensifer* (*Sinorhizobium*) (Tabla 6).

Tabla 6. Cepas del género *Ensifer* (*Sinorhizobium*) empleadas en este estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
1021	Derivada de SU74. Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> Sm <sup>r</sup>	(Meade et al., 1982)
WSM419	Cepa silvestre Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	(Rome et al., 1996)



**1.1.4. Cepas de *Escherichia coli*.**

Para el manejo de las cepas de *Escherichia coli* se empleó de manera rutinaria el medio LB (Tabla 7). La cepa silvestre *E.coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook *et al.*, 1989) fue la empleada para la replicación y transferencia de los plásmidos empleados para las fusiones transcripcionales, a excepción de los plásmidos synGFP y pBB107celCGFP, que fueron movilizados a través de la cepa S17.1 (Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>) (Simon *et al.*, 1983).

**1.1.5. Otras cepas pertenecientes al género *Rhizobium* empleadas en el estudio.**

En este trabajo se utilizaron diferentes cepas tipos pertenecientes al género de *Rhizobium* (Tabla 7) para el estudio comparativo de producción de celulosa y celulasas.

Tabla 7. Cepas tipo del género *Rhizobium* empleadas en la memoria doctoral.

Especie	Cepa	Referencias
<i>Rhizobium rhizogenes</i>	ATCC 11325 <sup>T</sup>	(Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>Rhizobium pisi</i>	DSM 30132 <sup>T</sup>	(Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rhizobium jaguaris</i>	CCGE 2052 <sup>T</sup>	(Rincon-Rosales <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	ATCC 19358 <sup>T</sup>	(Young <i>et al.</i> , 2001)
<i>Rhizobium multihospitium</i>	LMG 3946 <sup>T</sup>	(Han <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rhizobium vignae</i>	LMG 25447 <sup>T</sup>	(Ren <i>et al.</i> , 2011)
<i>Rhizobium endophyticum</i>	CCGE525 <sup>T</sup>	(López-López <i>et al.</i> , 2010)
<i>Rhizobium selenitireducens</i>	LMG 24075 <sup>T</sup>	(Hunter <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ATCC 10004 <sup>T</sup>	(Young 1999)
<i>Rhizobium indigoferae</i>	CCBAU 710492 <sup>T</sup>	(Zhu <i>et al.</i> , 2002)

**1.2. Medios de cultivos empleados en el estudio.**

En este trabajo, se empleó de manera rutinaria el medio YMA o medio TY para el manejo de las cepas bacterianas perteneciente al género *Rhizobium*, cuya composición se recogen en las Tablas 8 y 9. Las cepas se cultivaron a 28°C durante 2-3 días.

## Materiales y Métodos

**Tabla 8.** Composición del medio YMA para el uso rutinario de las cepas del género *Rhizobium*.

Composición Medio YMA	g/L
Manitol (Panreac)	7
Extracto levadura (Difco)	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac)	0,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Panreac)	0,2

**Tabla 9.** Composición del medio TY para el uso rutinario de las cepas del género *Rhizobium*.

Composición Medio TY	g/L
Triptona peptona (Difco)	5
Extracto levadura (Difco)	3
CaCl <sub>2</sub> (Codex)	0,5

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37°C “overnight” (o.n) empleando LB como medio de cultivo (Tabla 10).

**Tabla 10.** Composición del medio LB para el uso rutinario de las cepas de *Escherichia coli*.

Composición Medio LB	g/L
Bacto-Triptona (Difco)	10
Extracto levadura (Difco)	5
NaCl (Panreac)	10

Para preparar medio de cultivos solidos se añadió Agar (Conda) al 15% (p/v) y se estilizaron a 121°C durante 20 minutos.

Para la selección de cepas transconjugantes obtenidos por conjugación triparental o biparental se empleó Medio Mínimo sólido para *Rhizobium* (O’gara and Shanmugam 1976); un medio de cultivo definido (Tabla 11).

**Tabla 11.** Composición del Medio Mínimo.

Composición Medio Mínimo	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac)	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)	0,3

Continuación Tabla 11.

Composición Medio Mínimo	g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Panreac)	0,15
CaCl <sub>2</sub> (Codex)	0,05
NaCl (Panreac)	0,1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Prolabo)	0,1
Manitol	10

El medio mínimo se ajusta a pH 6,8 o 7 con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Tras el proceso de esterilización se añade una solución de vitaminas (1ml/L) y elementos traza (1ml/L) cuya composición se describe en las Tabla 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12. Composición de la solución de vitaminas.

Composición soluciones vitaminas	mg/L
Riblofavina	20
Ácido P-amino benzoico	20
Ácido nicotínico	20
Biotina	20
Tiamina-HCl	20
Piridoxina-HCl	20
Pantotenato cálcico	20
Inositol	120

Los ingredientes de la solución de vitaminas se disolvieron en regulador Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a una concentración de 0,05M y pH 7. A continuación, se esterilizan por filtración. Todas las vitaminas usadas son de la casa comercial Fluka.

Tabla 12. Composición de la solución de elementos traza.

Composición elementos traza	mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	145
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	125
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	59
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	5
MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	4,3
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	108
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	125

## **Materiales y Métodos**

Los ingredientes de la solución de elementos trazan se disolvieron en agua destilada y se ajustó a pH 5. A continuación, se esterilizó por filtración. Todos los reactivos son de la casa comercial Panreac.

Los cultivos de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* se cultivan en medio mínimo a 28°C durante una semana. Los medios líquidos se mantuvieron a 28°C durante 3-5 días a 180 r.p.m.

Para determinar la presencia de *E.coli* de los transconjugantes de *Rhizobium* se empleó el medio VRB (Violet Red Agar, Sharlab) (Tabla 13). Este medio de cultivo contiene lactosa como fuente de carbono y un indicador de pH denominado rojo neutro. El uso de lactosa acidifica el medio y las colonias se observan de un color purpura intenso. Una vez seleccionados los transconjugantes, obteniendo negativo para el cultivo de VRL tras 48h, se sembraron en su medio correspondiente suplementado con el antibiótico adecuado.

## **2. Técnicas bioquímicas.**

### **2.1. Detección de actividad celulolítica. Ensayo de doble capa.**

#### **2.1.1. En cultivo puro.**

Para la detección celulolítica de los cultivos puros, se empleó el método de la doble placa (Mateos *et al.*, 1992). Para ello, se empleó una solución de carboximetilcelulosa (CMC) en agua al 0,2% como sustrato. La capa inferior se preparó con el medio de cultivo adecuado en función de las cepas seleccionadas para el ensayo, si fue necesario se añadió el antibiótico adecuado para el cultivo de las cepas transconjugantes y/o transformantes. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 3-5 días. Tras ese período, se eliminó la masa celular y se realizó una tinción con Rojo Congo al 1% durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las placas se lavaron con una solución 1M de NaCl hasta observar que no quedaban restos de Rojo Congo.

#### **2.1.2. Con extractos sonicados.**

##### **2.1.2.1. Obtención de extractos sonicados.**

Para la obtención de los extractos sonicados, las cepas seleccionadas se cultivaron en 30mL de medio líquido YMB a 180 rpm durante 3 días a 28°C. Una vez obtenida masa celular en cantidad, en condiciones asépticas se pasaron cada uno de los cultivos líquidos a tubos estériles indicados para el rotor de la centrifuga JA 25.50. Se centrifugaron a 10000rpm durante 10' a 4°C. Una vez centrifugados, el sobrenadante se descartó y el pellet bacteriano se lavó con 20 mL de agua estéril. A continuación, se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente. De

nuevo se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado bacteriano en 500µL de PCA 100mM a pH seleccionado. Las muestras se dejan en hielo y a cada una de ellas se les da 5 pulsos de 10 segundos a 62 micrones, dejándolas 5 minutos en hielo entre cada pulso. Una vez sonicadas, se centrifugan a 12000rpm durante 12 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se guarda en eppendorf a -20 °C.

### 2.1.2.2. Ensayo en doble capa con extractos sonicados.

El ensayo en doble placa se llevó a cabo de manera similar al descrito en el apartado 2.1. Pero, en este caso, la capa inferior se sustituyó por agarosa al 0,7% en agua. Se inoculan 10µL de cada uno de los extractos y se incubó a 37°C “overnight”. Tras ese tiempo, se reveló empleando Rojo Congo al 1% durante 30 minutos y se lavó con NaCl 1M las veces que fueron necesarias.

## 2.2. Determinación de la producción de celulosa y la formación de biofilms.

La biosíntesis de celulosa, tanto de las cepas silvestres como de las cepas recombinantes de las cepas de *Rhizobium* utilizadas en este estudio, se evaluó mediante métodos cualitativos empleando diferentes colorantes como el Rojo Congo (Sigma®) y el Blanco de Calcoflúor (Sigma®) y ensayos indirectos de floculación. Todos los ensayos se realizaron utilizando cultivos bacterianos.

### 2.2.1. Tinción con Rojo Congo para la determinación cualitativa de la producción de celulosa.

Para evaluar la producción de celulosa bacteriana, las cepas seleccionadas se incubaron en medio de YMA suplementado con 25mg/mL de Rojo Congo (RC) (Sigma®). Este colorante es capaz de unirse a polímeros 1,4-β glucosa, por lo que se emplea para detección de celulosa. Las distintas cepas seleccionadas se inocularon en la superficie de las placas durante 3-4 días a 28°C. Tras este período, las placas fueron fotografiadas como una cámara Lumix sobre un transiluminador.

## Materiales y Métodos

### 2.2.2. Tinción con Calcoflúor para la determinación cualitativa de la producción de celulosa.

Esta tinción se llevó a cabo para la visualización microscópica de las microfibrillas de celulosa bacteriana. Este colorante es capaz de unirse a polímeros de glucosa que presenten enlaces  $\beta$ , de los cuales la celulosa es el único conocido en *Rhizobium* que se dispone en el exterior de las células formando este tipo de estructuras, ya que los  $\beta$  (1,2)-glucanos son polímeros cíclicos que no forman microfibrillas (Robledo, TD, 2010). Para ello, tras 5 días de crecimiento en placas de YMA, se tomó un asa de las distintas cepas de estudio y se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Seguidamente, se tomaron 5  $\mu$ L de esta suspensión y se colocaron de modo cuidadoso sobre un portaobjetos recubierto de Teflón (Electron microscopy science). Posteriormente, se dejaron secar toda la noche y al día siguiente se fijaron a la llama. Tras dejarlos enfriar, se incubaron durante 10 minutos en una disolución acuosa de Calcoflúor al 0,025% y se observaron al microscopio.

### 2.2.3. Determinación de la producción de celulosa y proteínas amiloides.

Los ensayos de floculación de utilizaron como método indirecto para cuantificar el grado de agregación de la cepa *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2T, así como para evaluar de un modo cualitativo la naturaleza de los agregados, se llevó a cabo un gradiente enzimático empleando celulasas, proteasas y proteinasa K comerciales, todas ellas de Sigma®. Para ello, se elaboró el siguiente protocolo.

1. Preparar medio líquido YMB (30 mL) por duplicado. A uno de los matraces añadir RC a una concentración de 25mg/mL.
2. Cultivar ambos matraces en agitación a 28° C y 180 r.p.m durante tres días.
3. Tras este período de tiempo, parar la agitación y fotografiar.
4. A continuación, dejar en reposo los matraces durante 24 horas.
5. Al día siguiente, coger 5 mL de los flóculos depositados en el fondo del matraz sin RC y centrifugar a 3500 r.p.m durante 5 minutos.
6. Tras la centrifugación, eliminar el sobrenadante y lavar los flóculos con PCA 100mM pH=5. Volver a centrifugar a 3500 r.p.m durante 5 minutos.
7. Eliminar nuevamente el sobrenadante y realizar otro lavado como en el paso anterior (6).
8. Una vez lavados, llevar a cabo el gradiente enzimático, empleando para ello una concentración de 10 U/mL, 15 U/mL y 20 U/mL de celulasa de *Trichoderma*. En el caso de la proteinasa K se emplearon las siguientes concentraciones 3 U/mL 6 U/mL 9 U/mL 12 U/mL. Las concentraciones empleadas con proteasas fueron: 1 U/mL 3 U/mL 5 U/mL 7 U/mL.
9. Incubar todas las muestras en agitación elíptica a 37° C durante 2 horas y fotografiar.

### 2.2.4. Determinación de la formación de biofilms *in vitro*.

Este experimento se realizó en placas multipocillos de PVC (Falcon 3911, Dickinson Becton, Franklin Lakes, New York) que constituye un soporte inerte para la adhesión y formación de biofilms. En este estudio se utilizó de acuerdo a la técnica descrita por (Fujishige *et al.*, 2006).

1. Realizar un pre-inóculo de las cepas seleccionadas a 28 °C y 180 rpm en medio líquido TY hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) 0,2 (aproximadamente  $10^7$  UFC/ml).
2. Seguidamente, centrifugar a 3500 rpm durante 20 minutos, tras lo cual eliminar el sobrenadante y añadir 4 ml de medio YMA sobre el precipitado para hacer una resuspensión hasta alcanzar una  $DO_{600nm}=0,2$ .
3. Inocular las placas de PVC con 100  $\mu$ l del cultivo con una  $DO_{600nm}=0,2$  de cada cepa seleccionada. En este estudio, las co-inoculaciones se prepararon a una densidad óptica  $DO_{600nm}=0,2$ . Como control negativo se utilizaron pocillos inoculados con medio YMB.
4. Incubar las distintas placas a 28 °C durante 24, 48 y 72 horas sin agitación.
5. Después, de cada tiempo de incubación, retirar el medio girando rápidamente la placa hacia abajo, con un golpe seco.
6. Añadir a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución de cristal violeta (Sigma®) al 0,3% e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Eliminar el colorante tal y como se explica en el paso 5.
8. Realizar 3 lavados consecutivos con 200  $\mu$ l de agua destilada, entre cada lavado esperar 5 minutos. Eliminar el agua del lavado como se describe en el paso 5.
9. Secar la placa durante 1 hora en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente.
10. Pasado ese período de tiempo, agregar 100  $\mu$ l a cada pocillo de una solución etanol: acetona en una proporción 4:1, homogenizando muy bien. Tras ello, realizar una espera de 10-15 minutos.
11. Por último, cuantificar mediante un lector de placas ASYS (Biochrom, Reino Unido) la absorbancia a 570nm.

Es recomendable limpiar la placa, tras cada golpe seco realizado en el cual se descarta el líquido sobrenadante, especialmente con el colorante cristal violeta. De esta manera, se evitan restos que pudieran quedar en las paredes de los pocillos y de la superficie de la placa y que puedan alterar las mediciones posteriores.

## 2.3. Análisis de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal (PGPB).

### 2.3.1.1. Producción de sideróforos.

La capacidad de producir sideróforos se evaluó utilizando el medio de cultivo M9-CAS-AGAR, que se trata de una modificación del medio utilizado por (Schwyn and Neilands 1987) ,

## Materiales y Métodos

donde se observaron halos de distintas tonalidades. La modificación consiste en la adición de un disolvente catiónico, HDTMA, que estabiliza el complejo Fe-CAS y le confiere un color azul característico (Alexander and Zuberer 1991). El método propuesto es una modificación del medio M9 en el que se incluye un indicador de color (HDTMA) y un agente quelante del hierro (EDTA). Este medio M9 CAS agar modificado se prepara partiendo de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de formas individuales y mezcladas posteriormente.

### Solución 1.

En esta solución, se mezclan 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [1mM], disueltos en HCl 10 mM, con una solución acuosa de 50ml de CAS (1,21 mg/ml) obteniendo una solución acuosa de intenso color púrpura, que se mezclará posteriormente con 40 ml de una solución acuosa de HDTMA (1,82 mg/ml). La solución resultante tendrá un color azul marino denso y se autoclava independientemente del resto. La solución se mezcla con las restantes cuando su temperatura baja hasta unos 50 °C.

### Solución 2.

En primer lugar, se prepara una solución salina mezclando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , después se añade la solución PIPES (piperazina-N, N-bis [ácido 2-ethanolsulfónico]) al medio anterior y se ajusta el pH a 6.8 (Tabla13).

Tabla 13. Composición de la solución 2 del medio M9-CAS-Agar.

Solución 2	750 ml
PIPES	30,24 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,3g
NaCl	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0 g
Agar (Conda®)	15 g

### Solución 3.

Esta solución se prepara, disolviendo en 70 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada los compuestos detallados en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición de la solución 3 para el medio M9-CAS-Agar.

Solución 3	70ml $\text{H}_2\text{O}$ destilada
Sacarosa	2,0 g
Manitol	2,0 g



Continuación Tabla 14.

Solución 3	70ml H <sub>2</sub> O destilada
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	493,0 mg
CaCl <sub>2</sub>	11,0 mg
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,17 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4 mg
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,04 mg
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,0 mg

#### Solución 4.

La solución 4 consiste, en una solución de 30 ml de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de la caseína) al 10% w/v esterilizada mediante filtración por una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU).

Una vez preparadas todas las soluciones, se esterilizan en autoclave de forma independiente. Se mezclan cuando alcanzan una temperatura de 50° C, siendo esta solución la última en añadirse.

Una vez que las placas solidificaron, se sembraron los inóculos seleccionados y se cultivaron a 28°C durante tres días. Las placas se fueron observando rutinariamente, examinando la evolución de producción de sideróforos.

#### 2.3.1.2. Producción de ácido indolacético.

La capacidad para producir o sintetizar ácido indolacético fue evaluada mediante cromatografía líquida por HPLC, empleando como detección, espectrometría de masas/masas por ionización de electrospray y con detección en modo positivo. El límite de detección se estableció en 2ng/mL. Este análisis fue realizado por el servicio de Secuenciación de Análisis elemental, Cromatografía y Masas de Nucleus de la Universidad de Salamanca.

Para poder llevar a cabo esta medición, se utilizó el medio JMM (O'hara *et al.*, 1989) y se siguieron los siguientes pasos.

1. Sembrar las cepas seleccionada en medio sólido YMA, durante 5 días a una temperatura de 28°C.
2. Tras ese periodo, preparar soluciones de los inóculos con agua destilada estéril a una densidad óptica de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Tomar 100 µl de la solución e inocular en el medio JMM modificado (vial de 2mL) durante 5 días a 28°C. Realizar tres repeticiones por cepa bacteriana.
3. Transcurrido este tiempo, recoger 1,5 mL de cada vial y centrifugar a 10.000rpm durante 1 minuto.

## Materiales y Métodos

4. A continuación, esterilizar el sobrenadante por filtración empleando filtros cuyo tamaño de poro es de 22  $\mu\text{m}$  (Millipore  $\text{\textcircled{R}}$ , Amicon, EEUU). Guardar en eppendorfs estériles y llevar a analizar.

El medio JMM se preparó de la siguiente manera:

Partimos de una solución base o medio JMM base (Tabla 15), todos los componentes se autoclavaron excepto las vitaminas que se añadieron tras el proceso de esterilización. La solución de vitaminas (Tabla 16), todos sus componentes se disolvieron en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 M (pH 7,0) y se esterilizaron por filtración empleando filtros cuyo tamaño de poro es de 22  $\mu\text{m}$  (Millipore  $\text{\textcircled{R}}$ , Amicon, EEUU). Todas las vitaminas son de la marca Fluka  $\text{\textcircled{R}}$ , y los elementos trazas se prepararon como se muestra en la Tabla 17. El medio JMM fue suplementado con L-triptófano (Sigma  $\text{\textcircled{R}}$ ) a una concentración de 0,167 g/l.

**Tabla 15.** Composición del medio JMM base.

Medio JMM base	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,006 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,004 g
NaCl	0,002 g
Elementos traza	2 $\mu\text{l}$
Solución de vitaminas	8 $\mu\text{l}$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,02 g
Glucosa	0,04 g
Manitol	0,08 g
Piruvato	0,08 g
$\text{H}_2\text{O}$	10 ml

**Tabla 16.** Composición de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	mg/L
Rivoflavina	20,0
Ácido P-amino benzoico	20,0
Ácido nicotínico	20,0
Biotina	20,0
Tiamina-HCl	20,0
Piridoxina- HCl	20,0
Pantotenato cálcico	20,0
Inositol	120

Tabla 17. Composición de la solución elementos traza.

Solución elementos trazas	mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	145,0
FeSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	125,0
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	5,0
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	4,3
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	59,0
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	108,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	125,0

Se inocularon cada uno de los medios finales con las cepas seleccionadas, y se cultivaron a 28 °C durante una semana, en completa oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se recogió el sobrenadante que se separó por centrifugación.

### 2.3.1.3. Solubilización de fosfato.

La capacidad para solubilizar fosfato inorgánico se evaluó empleando el medio Pikovskaya (Sundara Rao *et al.*, 1963; Subba Rao *et al.*, 1977) (Tabla 18) empleando fosfato bicálcico (Ca<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>) y fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). Se incubaron durante 5 días a 28 °C. Tras este periodo, se observó la presencia o ausencia de halos de solubilización.

Tabla 18. Composición del medio agar de Pikovskaya para determinar la solubilización de fosfato.

Pikovskaya Agar	g/L
Extracto de levadura	0,5
Glucosa (Panreac®)	10,0
Ca <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (Panreac®)	5,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,5
KCl (Panreac®)	0,2
MgSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,1
MnSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) (Panreac®)	0,1
FeSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,0001
Agar (Conda®)	15,0

### 3. Técnicas de Biología Molecular.

#### 3.1. Aislamiento de ácidos nucleicos.

##### 3.1.1. Extracción de ADN total.

Para la obtención de ADN rutinario, se utilizó para ello el Kit “REExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de Sigma® con alguna modificación. Una vez crecidas las cepas en sus correspondientes medios de cultivos, se recogieron células en un tubo Eppendorf® y se añadieron 100µl de la solución de extracción. A continuación, se incubaron los tubos a 95 °C durante 10 minutos para provocar la lisis celular. Después, se añadieron 100µl de la solución de dilución y se centrifugaron a 6.000 rpm durante 4 minutos en una centrifuga de mesa Sorvall Legend MiCRO17. Por último, se recogieron 100µl de la parte superior del sobrenadante y se guardaron a -20 °C.

##### 3.1.2. Extracción de ADN plasmidico (ADNp).

La extracción de ADNp se llevó a cabo empleando los siguientes kits comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante Quick Reference Protocol Card ilustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit y el kit Speedtools Plasmis DNA purification KIT (Biotools ©).

##### 3.1.3. Extracción de ADN total para la secuenciación genómica de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Con el objetivo de secuenciar el genoma de la cepa *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, se utilizó el kit “ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™” siguiendo las instrucciones. Seguidamente se cuantificó mediante el empleo de Nanodrop (Bionova) y guardándolo para su conservación -20° CC.

##### 3.1.4. Determinación de la concentración y pureza de ADN.

En el control de la calidad de las muestras de ácidos nucleicos, la concentración se calculó mediante el uso de Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen™). La pureza, se determinó empleando un espectrofotómetro (*NanoDrop® ND-100*).

Para evaluar la pureza de muestras de ADN se emplearon las relaciones A280/A260 y A260/A230. Un ADN se considera de pureza aceptable con una relación A260/A280 > 1,6, valores inferiores indican una posible contaminación con compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A280/A260 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

La relación A260/A230 se considera que el ADN es puro con valores en torno a 1.5 -2.2.

### 3.2. Clonación.

#### 3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR (acrónimo de *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica inherente e imprescindible en ingeniería genética y biología molecular. A partir de su desarrollo en 1983 por Kary Mullis, hoy en día, se puede llevar a cabo la amplificación de un gen o fragmento de ADN mediante la aplicación de un método efectivo, sensible y rápido. La PCR tiene dos objetivos básicos que son; la amplificación propiamente dicha y la detección de ADN diana mediante la aplicación de una metodología basada en tres conceptos, la desnaturalización del ADN en dos moléculas monocaterianas; la hibridación de la molécula monocateriana a un cebador y replicación. Para la amplificación del ADN *in vitro* es necesario utilizar los siguientes “reactivos”:

- Los cuatro dNTP como sustrato para las múltiples copias de ADN.
- Mg<sup>2+</sup> como cofactor de la polimerasa.
- Cebadores u oligos complementarios al ADN diana.
- Una ADN polimerasa estable.
- ADN molde.

El ADN molde o diana junto con los cebadores se someten a cambios cíclicos de temperatura. Cada ciclo consta de 3 fases: desnaturalización de la molécula de ADN, anillamiento o hibridación de los cebadores a la región o fragmento seleccionado y elongación o replicación. Estos ciclos se repiten “n” veces, se trata de una amplificación exponencial (Tabla 19).

Tabla 19. Parámetros utilizados durante los ciclos de temperatura de las amplificaciones.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (min:s)	Ciclos
Predesnaturalización	95	10:00	1
Desnaturalización	94	0:30	35
Anillamiento	de 52 a 66	0:30*/1:20	
Extensión	72	1:00/kb	
Extensión Final	72	3:00	1
“Hold”	4	Indefinidamente	∞

\*El tiempo de anillamiento vario en función del fragmento amplificado.

En el presente trabajo, esta técnica fue empleada para la amplificación tanto de ADN cromosómico como plasmídico. La polimerasa más comúnmente utilizada fue la REDEExtract-N-Amp™PCR Ready Mix™ de Sigma®. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25µL. Los reactivos y composición se detallan en la tabla 20.

## **Materiales y Métodos**

**Tabla 20.** Reactivos empleados en la PCR.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen añadido</b>
REExtract-N-Amp PCR Ready Mix	15 µL
Primer Forward (2 µM)	2.5 µL
Primer Reverse (2 µM)	2.5 µL
H <sub>2</sub> O estéril MiliQ	3 µL
DNA molde	2 µL

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

Se trata de una PCR convencional, empleando los mismos reactivos que figuran en la Tabla 20. La diferencia radica que en lugar de añadir al mix de la PCR el ADN previamente asilado, se pican directamente las colonias de la placa con un palillo estéril y se agita dentro de cada una de las muestras.

### **3.2.3. Clonación celular: tecnología del ADN recombinante.**

Esta técnica permite la amplificación del ADN aprovechando la capacidad de replicación de la propia célula. Esta técnica surge gracias al descubrimiento de las enzimas de restricción en el año 1970. Para ello, se emplean enzimas de restricción para “cortar” el ADN de un modo controlado e incorporar ese fragmento en un vector, que en última instancia se introducen en células anfitrionas, en las que se llevará al cabo el proceso de replicación.

#### **3.2.3.1. Digestión mediante el empleo de endonucleasas de restricción.**

Para llevar a cabo las diferentes digestiones, se emplearon “tijeras moleculares” o endonucleasas de restricción siguiendo las recomendaciones de temperatura y tampón de los fabricantes New England Biolabs y Fisher. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un volumen final de 50-20µL, cuya composición se detalla a continuación (Tabla 21).

**Tabla 31.** Reactivos empleados en la digestión enzimática.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>
ADNp	1 µg
Buffer o tampón de restricción (10X)	5 µL
H <sub>2</sub> O MiliQ estéril	Hasta 50 µL*
Enzima de restricción	1 µL

\*La cantidad de agua se ajustó en función de la concentración del ADN y del enzima.

Las digestiones de ADN plasmídico se llevaron a cabo durante 1h a 37 °C.

En el caso de las digestiones dobles, se realizó una digestión secuencial debido a la sensibilidad a la metilación. Por ello, se realizó una primera digestión con la enzima que presentaba sensibilización y se comprobó que el plásmido se había linearizado en un gel de agarosa. A continuación, se inactivó la reacción enzimática y se llevó a cabo la segunda digestión, con su posterior inactivación. Seguidamente, se comprobó mediante electroforesis de agarosa.

### **3.2.3.2. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.**

La acción de las ligasas se centra en reparar las hebras de ADN mediante la creación de enlaces covalentes. Por lo tanto, la ligación de las moléculas de ADN se llevó a cabo con la ADN ligasa del fago T4 de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando el correspondiente tampón 10X (20 mM Tris-HCL, pH 7,51 mM EDTA; 5mM DTT; 60 mM KCl; 50% glicerol [v/v]). Las reacciones se llevaron a cabo generalmente en un volumen de entre 5-10 µL y se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

### **3.2.3.3. Tipos de vectores empleados en este estudio.**

El vector es una molécula de ADN bicateriano, cuya misión es unirse a los diferentes insertos que se quieren clonar facilitando su entrada en la célula anfitriona. El vector de clonaje empleado ha sido el vector comercial pGEM®-T Easy (Promega, figura 25) que posee una zona denominada “multi cloning site (MCS)” dentro de la región codificante del péptido α del enzima β. Galactosidasa de *E.coli* (*lacZ*). De este modo, las colonias recombinantes se pueden seleccionar en X-gal ya que no hidrolizan el sustrato cromogénico azul y pueden verse de color blanco. Además, posee un gen de resistencia a ampicilina (*Ap<sup>r</sup>*) como marcador y una deoxy-timina 3' terminal en ambos extremos, mejorando la eficiencia de clonación de productos de PCR.

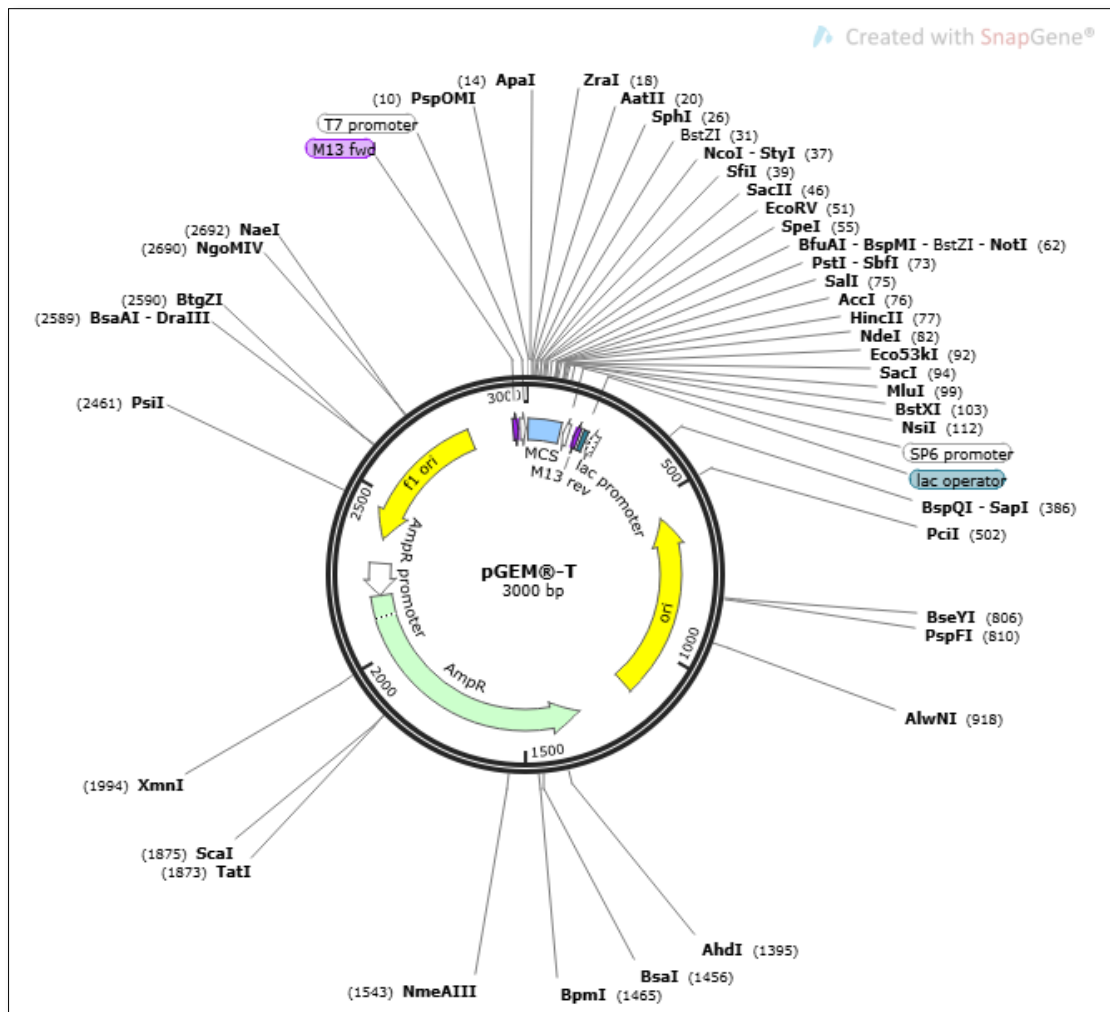


Figura 25. Mapa del vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega) se detalla el MCS y los cortes de las diferentes enzimas de restricción.

A continuación, se detallan los plásmidos que se han utilizado en la clonación de ADN para la obtención de las colonias recombinantes utilizadas en este estudio.

El vector de clonación pBBGFPØ (Figura 26) deriva del plásmido pBBR1-MCS2. Contiene *gfp* para fusiones transcripcionales y sin promotor. Presenta resistencia a Km<sup>r</sup> y fue cedido por el Dr. José Ignacio Zurdo y la Dr. Marta Robledo de la Estación Experimental del Zaidín- CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Granada



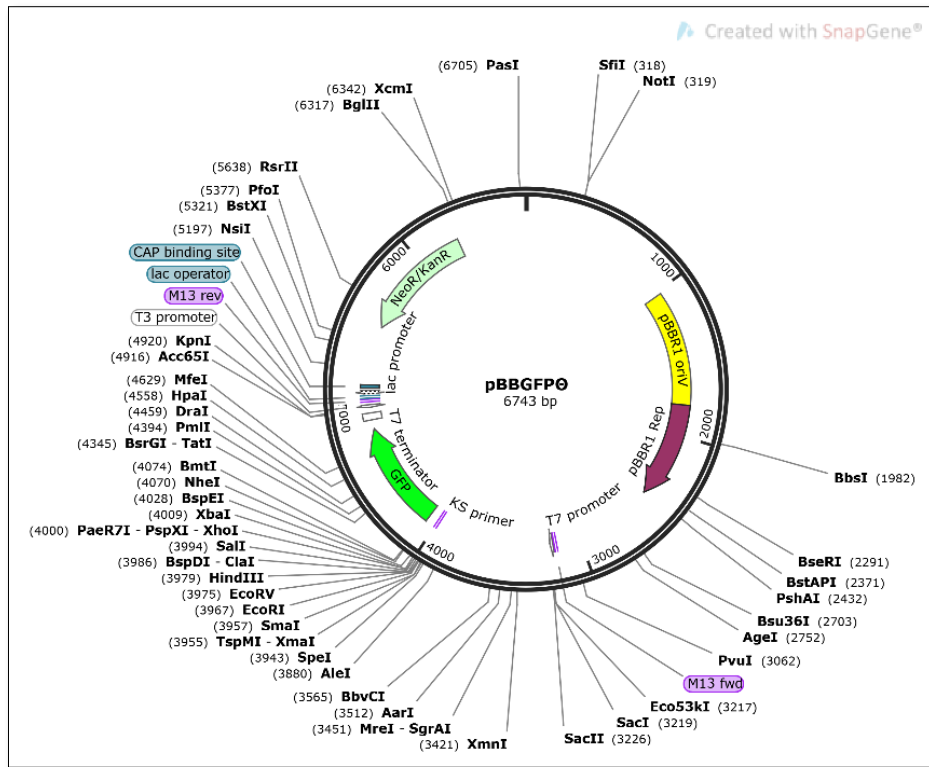


Figura 26. Mapa del vector de clonaje pBBGFP en dónde se detallan los diferentes cortes de enzimas de restricción.

El resto de los plásmidos en este estudio, se detallan a continuación en la Tabla 22.

Tabla 22. Plásmidos empleados en durante el desarrollo de la tesis doctoral.

Plásmido	Característica	Referencia
pGUS3	Derivado de pBI101 (Clontech). Contiene FT nfe::gusA. Km <sup>r</sup>	(García-Rodríguez and Toro 2000)
pRK2013	Plásmido movilizador con replicón ColE1 y genes tra y mob. Km <sup>r</sup>	(Fujishige et al., 2006)
pHBRmRFP	Derivado del pHc60, reemplazando la GFP -S65T por mRFP. Tc <sup>r</sup>	(Smit et al., 2005)
pEMC	Fragmento homólogo celC en WSM419 en pGEM-T Easy. Am <sup>r</sup>	Tesis Menéndez, 2014
pBBcelAGFP	Fragmento del promotor del operón celABC (185bp) clonado entre los sitios SpeI y XbaI en pBBGFPØ. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pBB107GFP	Fragmento de celB-celC (146bp) clonado entre los sitios SpeI y XbaI en pBBGFPØ. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pBB492GFP	Fragmento de celB-celC (512bp) clonado entre los sitios SpeI y XbaI en pBBGFPØ. Km <sup>r</sup>	Este trabajo

## **Materiales y Métodos**

### **3.2.4. Primers empleados.**

Para el diseño de los cebadores se emplearon los programas informáticos descritos en el apartado 7.1.2. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio (Tabla 23) fueron sintetizados Sigma® y por Metabion®.

## Materiales y Métodos

**Tabla 24.** Secuencias de los diferentes primers empleados en este estudio.

Primers	Secuencia	Diana	Referencia
27F	5'AGAGTTTGATCCTGGTCAG3'	Gen ribosómico 16S rRNA.	(Rivas et al., 2002).
1522R	5'AAGGAGGTGATCCANCCRCA3'		
800R	5'TACCAGGGAGTACGGCCGCA3'		(Ghyselinck et al., 2013).
C1F	5'ATCAGCCACAGCGAAGGGCA3'	Celulasa celC2 de R.leguminosarum bv trifolii ANU843.	Robledo, TD,2010.
C2R	5'CACAGACACTCCGGATGC3'		
SP6	5'GTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGC3'	Región MCS del plásmido pGEM®-T.	Promega pGEM®-T.
T7	5'TAATACGACTATAGGGCGA3'		
SRF	5'CTGATCGGCATCAGCGTCAC3'	Región MCS del plásmido pBBGFPØ.	Cedidos por el Dr. José Ignacio y la Dra. Marta Robledo
GFPR	5'GTTGGCCATGGAACAGGTAG3'		
XbalsmedwsmR	5'TCTAGACAAGCGCGGCGTCCACAAC3'	Celulasa de Ensifer medicae WSM419.	Menéndez, TD,2014
EcoRlwsmF	5'GAATTCGTACGCCGTGCTGCTCGTCTG3'		
nodCF	5'AYGTHGTYGAYGACGGTTC3'	Amplificación del gen nodC	(Laguerre et al., 2001)
nodCI	5'CGYGACAGCCANTCKCTATTG3		
XbaI celC+1047R*	5'CGATTCTAGATCACAGACACTCCGGATGCTTC3'	Amplificación del gen celC2 de R. leguminosarum bv trifolii ANU843.	Este estudio.
NdeI celC2+1F*	5'ATATCATATGAGGCGGTGGCGCGCGCTT3'		

## Materiales y Métodos

Continuación Tabla 25.

Primers	Secuencia	Diana	Referencia
XbaICelA+64R*	5'GCTCTCTAGATGATCAGCAGCATCAAGCAG3'	Región promotora aguas arriba del operón celABC.	Este estudio
SpeICelA-121F*	5'GCCGACTAGTTCCGGAGATAGAGCATGAT3'		
SpeIC2-492F*	5'ATGCACTAGTCAAGGTCAGCGGCGGTGTCTT3'	Región intergénica aguas arribas del gen celC.	Menéndez, TD,2014
SpeIC2-107F*	5'CGATACTAGTAACTGGTTGTCGACGAATA3'		
XbaICR*	5'TCTAGATGCAACCGCGACAGAGG3'		

\*Digestión de ADN con las enzimas de restricción.

### 3.3.6. Electroforesis de fragmentos de ADN en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN amplificados, así como las diferentes digestiones llevadas a cabo, se sometieron a electroforesis en geles horizontales de agarosa (SeaKem®), de diferente tamaño en función de la cubeta de Bio-Rad® utilizada. La concentración de los geles de agarosa vario entre 0,8%-2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos de ADN. La disolución de tampón utilizada en la preparación de los geles como en la electroforesis, fue TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1Mm, pH 8,0 Milipore). A continuación, se aplicó un voltaje de 60V/cm con una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad®, EE.UU). Los marcadores de peso molecular utilizados durante este estudio Genruler 100 bp y Genruler 1 kb de Thermo Scientific™.

Para la visualización de los fragmentos de ADN los geles se tiñeron en un solución con bromuro de etidio (Sigma®, EE.UU), al 0,5 µg/ml, durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de bromuro de etidio y se fotografiaron con luz U.V utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio –Rad®, EE.UU).

### 3.3.7. Purificación de los fragmentos de ADN amplificados.

En función, tanto del fragmento de ADN genómico como sí la purificación se trataba de ADN plasmídico se emplearon kits diferentes. Una vez identificada la banda amplificada perteneciente al gen ribosómico 16S se empleó el kit comercial “GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit®” de ThermoScientific. Sin embargo, los productos procedentes de las digestiones con las endonucleasas están formados por fragmentos de diferentes tamaños se emplearon los kits comerciales “Clean-Easy™ PCR Purification” y “Clean-Easy™ Agarose Purification Kit” de Canvax ya que su rango de actuación abarca desde 80bp hasta 10Kb. El filtrado obtenido de cada uno de los kits utilizados se conservó a -20C.

### 3.3.8. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de los fragmentos de interés se realizó en el servicio de secuenciación de Nucleus de la Universidad de Salamanca, empleando el kit “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready REaction Kit” y empleando para ello un equipo de secuenciación de ABI PRISM (Applied Biosystem®, EEUU). Asimismo, también se empleó el servicio de secuenciación de la compañía ©Macrogen Inc.

## Materiales y Métodos

### 3.3.9. Secuenciación y anotación del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias fueron ensambladas mediante Velvet 1.2.10 y la anotación se llevó a cabo empleando dos plataformas, siendo una de ellas el programa RAST 4.0 y la plataforma (Kanehisa *et al.*, 2016)

## 4. Métodos de transferencia genética en bacterias.

### 4.1. Transformación.

El proceso de transformación se llevó a cabo en cepas de *E.coli* DH5 $\alpha$  competentes. Para la obtención de dichas células, se llevó a cabo el siguiente protocolo.

1. Estriar en una placa de LB la cepa DH5 $\alpha$  e incubar a 37° Co.n.
2. Al día siguiente, preparar un preinoculo de 10mL de LB con una estría del cultivo obtenido en el primer paso. Incubar a 37° C en agitador "overnight" (o.n).
3. Al día siguiente, inocular un matraz con 100mL de LB previamente calentado a 37° C con 0,5-1 mL del preinoculo obtenido en el punto 2. Incubar a 37° C en agitación vigorosa (250-300 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>=0,5.
4. Una vez alcanzada la densidad óptica, poner en hielo durante 5 min. A continuación, centrifugar en rotor frío a 3000 rpm a 4° C durante 5 min.
5. Tras la centrifugación, lavar con 50 mL de dH<sub>2</sub>O estéril, resuspender en vortex frío y centrifugar en las mismas condiciones y se deja en hielo durante 5 min.
6. Seguidamente, resuspender en vortex brevemente con 100mL de TFB1 frío (en la cámara fría).
7. Dejar reposar en hielo otros 5 min.
8. Centrifugar en rotor frío a 3000 rpm a 4° C durante 5 min.
9. Resuspender suavemente en 4 mL de TFB2 frío por cada 100 mL de cultivo.
10. Dispensar en alícuotas de 0,2mL y congelar con ayuda de nitrógeno líquido cada una de las alícuotas para su mantenimiento a -80°C.

NOTA: evitar los detergentes, debido a que la cepa es muy sensible. Preparar Eppendorf®, puntas de pipetas para que estén frías previo su uso.

A continuación, se detallan la composición de las diferentes soluciones empleadas para la preparación de las células competentes (Tabla 24 y 25).

Tabla 24. Composición de la solución TFBI.

Composición TFBI 200mL	
RbCl	2.42g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.97g
Acetato K	0.59g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.29g
Glicerol	30 mL (15%)
H <sub>2</sub> O	Hasta 200mL

Una vez preparada la solución TFBI se ajusta a pH 5.8 exactamente con ácido acético 0.2M, y añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta 200mL. La esterilización se realiza por filtración.

En la siguiente tabla se recoge la composición de la solución TFBII.

Tabla 25. Composición de la solución TFBII.

Composición TFBII 100mL	
MOPS	0.21g (Ajustar pH con NaOH 1M)
RbCl	0.12g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.10g
Glicerol	15mL

De modo similar a la solución TFBI, la esterilización se llevará a cabo por filtración.

## 4.2. Conjugación.

La conjugación bacteriana es un mecanismo de transferencia genética que requiere el contacto entre células. Las diferentes cepas del género *Rhizobium* empleadas en este estudio, se obtuvieron por conjugación biparental y triparental (Tabla 26), empleando una cepa donadora y/o una cepa *helper*, respectivamente. En el primer caso, se emplea la cepa donadora de *E.coli* S17.1 y en el segundo, una cepa donadora de *E.coli* DH5 $\alpha$ , más la cepa *helper* de *E.coli* denominada pRK2013.

## Materiales y Métodos

Tabla 26. Listado de transconjugantes empleados en este estudio.

Especie bacteriana	Cepa receptora	Cepa donadora E.coli	Conjugación
Rhizobium cellulosilyticum	ALA10B2 <sup>T</sup> _GUS	S17.1 pGUS3	Biparental
	ALA10B2 <sup>T</sup> _RFP	DH5 $\alpha$ _RFP + helper	Triparental
	ALA10B2 <sup>T</sup> _wsm419	S17.1. pEMC <sup>+</sup>	Biparental
	ALA10B2 <sup>T</sup> _pJZC2	S17.1pJZC2	Biparental
Rhizobium leguminosarum bv trifolii	ANU843_492pBBGFP	DH5 $\alpha$ _492pBBGFP + helper	Triparental
	ANU843_celApBBGFP	DH5 $\alpha$ _celApBBGFP + helper	Triparental
Rhizobium leguminosarum bv trifolii	ANU843_pBBGFP $\emptyset$	S17.1 pBBGFP $\emptyset$	Biparental
	ANU843_107pBBGFP	DH5 $\alpha$ _107pBBGFP + helper	Triparental
	ANU843_synGFP	S17.1 synGFP	Biparental
Rhizobium leguminosarum bv phaseolii	TPV08_synGFP	S17.1 synGFP	Biparental

## 5. Ensayos *in planta*.

### 5.1. Desinfección y germinación de las semillas.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se emplearon semillas de diferentes especies vegetales de leguminosas y cereales. Asimismo, la desinfección de las semillas se llevó a cabo en condiciones asépticas y empleando material esterilizado. Los protocolos de desinfección se describen a continuación.

#### 5.1.1. *Phaseolus vulgaris*.

Se emplearon alubias de Morasverdes (*Phaseolus vulgaris*), una leguminosa autóctona de la Comarca de Yeltes (Salamanca).

1. Cubrir de las semillas con una solución de hipoclorito sódico durante 5 minutos.
2. Decantar la lejía.
3. Realizar 5 lavados con agua estéril.



Una vez terminado el proceso, se procedió a germinar las semillas en placas de agar-agua al 1% (Tabla 27). Se sellan las placas con parafilm y se incubó a 28°C en oscuridad durante 3 días hasta observar la germinación de las mismas.

Tabla 27. Composición del medio Agar-agua.

Medio Agar-agua	g/l
Agar (Conda®)	20g
Agua destilada	1L

### 5.1.2. *Trifolium repens L.*

Se utilizaron semillas de trébol blanco enano de la variedad Huia de la comercial Batlle©. El protocolo empleado para la desinfección de las semillas fue el propuesto por Vincent (1970).

1. Cubrir las semillas con una solución de etanol al 70% (p/v) durante 30s.
2. Decantar el etanol.
3. Añadir una solución de HgCl<sub>2</sub> (Panreac®) al 2,5% (p/v) durante 5 minutos.
4. Decantar el HgCl<sub>2</sub>.
5. Realizar al menos 5 lavados con agua estéril.
6. Mantener en imbibición durante 2-3 horas.

A continuación, las semillas se extendieron por placas de agar-agua (Tabla 27), se invirtieron y se mantuvieron a 28°C en oscuridad durante 24-48 horas, hasta la observación de la germinación de las plántulas.

### 5.1.3. *Medicago sativa L.*

Se utilizaron semillas de alfalfa de la comercial Batlle©. El protocolo empleado para la desinfección de las semillas fue el propuesto por Vincent (1970).

1. Cubrir las semillas con una solución de etanol al 70% (p/v) durante 30s.
2. Decantar el etanol.
3. Añadir una solución de HgCl<sub>2</sub> (Panreac®) al 2,5% (p/v) durante 5 minutos.
4. Decantar el HgCl<sub>2</sub>.
5. Realizar al menos 5 lavados con agua estéril.
6. Mantener en imbibición durante 2-3 horas.

A continuación, las semillas se extendieron por placas de agar-agua (Tabla 27), se invirtieron y se mantuvieron a 28°C en oscuridad durante 24-48 horas, hasta la observación de la germinación de las plántulas.

## **Materiales y Métodos**

### **5.1.4. *Zea mays*.**

Se utilizaron semillas de Pioneer P0023 ciclo 300 (DuPont®) enano de cada comercial Batlle®. El protocolo empleado para la desinfección de las semillas fue el propuesto por (Arruda *et al.*, 2013) con alguna modificación.

A continuación, las semillas se extendieron por placas de agar-agua (Tabla 27), se invirtieron y se mantuvieron a 28°C en oscuridad durante 24-48 horas, hasta la observación de la germinación de las plántulas.

### **5.1.5. *Triticum aestivum* L.**

Se emplearon semillas de trigo blando de invierno cedidos por agricultores. El protocolo empleado para la desinfección de las semillas se realizó el siguiente protocolo.

1. Cubrir las semillas con una solución de etanol al 70% (p/v) durante 30s.
2. Decantar el etanol.
3. Añadir hipoclorito sódico durante 10 minutos.
4. Decantar el hipoclorito sódico.
5. Realizar al menos 5 lavados con agua estéril.
6. Mantener en imbibición durante 2-3 horas.

A continuación, las semillas se extendieron por placas de agar-agua (Tabla 27), se invirtieron y se mantuvieron a 28°C en oscuridad durante 24-48 horas, hasta la observación de la germinación de las plántulas.

### **5.1.3. *Avena sativa* L.**

Se emplearon semillas de trigo blando de invierno cedidos por agricultores. El protocolo empleado para la desinfección de las semillas se realizó el siguiente protocolo.

1. Cubrir las semillas con una solución de etanol al 70% (p/v) durante 30s.
2. Decantar el etanol.
3. Añadir hipoclorito sódico durante 10 minutos.
4. Decantar el hipoclorito sódico.
5. Realizar al menos 5 lavados con agua estéril.
6. Mantener en imbibición durante 2-3 horas.

A continuación, las semillas se extendieron por placas de agar-agua (Tabla 27), se invirtieron y se mantuvieron a 28°C en oscuridad durante 24-48 horas, hasta la observación de la germinación de las plántulas.

## 5.2. Ensayos de colonización e infección en cultivo hidróponico.

### 5.2.1. *Trifolium repens* L y *Medicago sativa* L.

Para evaluar las capacidades simbióticas *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> se realizaron ensayos en sistemas hidropónicos según el método descrito por (Vincent 1970) con algunas modificaciones. En primer lugar, se llevó a cabo la desinfección en superficie de las semillas según lo descrito en el punto 5.1. Se emplearon tubos de 20 ml con medio de enraizamiento de Fähræus modificado sin nitrógeno (Tabla 28) y con papel de filtro de 15 x 1, 5 cm estériles. Con la ayuda de un asa de siembra estéril y desechable se colocó 1 semilla estéril germinada por tubo. Seguidamente, se sellaron con algodón hidrófobo, y se llevaron a la cámara iluminada tras cubrir las 2/3 partes de la parte inferior de los tubos para dar sombra a las raíces, imitando las condiciones naturales de crecimiento. Se utilizaron 12 plantas por tratamiento.

Tabla 28. Composición del medio de Fähræus modificado.

Reactivos	Cantidad en g/L (1X)	Cantidad en g/L (10X)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0,12	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,1	1,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0,15	1,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Codex)	1mL	10mL
Citrato férrico(Panreac®)*	1mL	10mL
Solución de oligoelemento (tabla X) *	1mL	10mL

\*Estos reactivos se preparan de manera independiente y se añaden después de autoclavarse.

Tabla 29. Composición de la solución de oligoelementos

Reactivos	Cantidad para 200mL (1mg/mL)
MnSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Panreac®)	200mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (Panreac®)	200mg
ZnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (Panreac®)	200mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Panreac®)	200mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (Panreac®)	200mg

Tras la germinación. Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos.

1. Control sin inocular y sin nitrógeno.
2. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> Wt.
3. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_RFP.

## Materiales y Métodos

Los tratamientos empleados para evaluar los efectos derivados de las expresiones heterólogas de las celulasas CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y CelC de *Ensifer medicae* WSM419. Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos.

1. Control sin inocular y sin nitrógeno.
2. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.
3. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2.
4. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_wsm419.
5. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_EV.

Una vez seleccionadas las cepas se crecieron en medio YMA; en caso necesario con sus correspondientes antibióticos, y se mantuvieron a 28°C durante 5 días. Pasado ese tiempo, las cepas se resuspendieron en un volumen de 20 mL de Fähræus modificado. Seguidamente, se midió mediante espectrofotometría la densidad óptica (D.O). En el caso de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> la D.O<sub>600</sub> óptima para su uso como inoculante es de 0,1. Finalmente, los tubos fueron trasladados a la cámara iluminada durante un período de tiempo de 40 días a una temperatura de 24°C con un fotoperiodo 16/8 y una humedad relativa del 60%.

### 5.2.2. *Phaseolus vulgaris* L.

Debido al porte de *Phaseolus vulgaris*, los cultivos monóxenicos se llevaron a cabo en matraces de Erlenmeyer de 500 mL, empleando medio de Fähræus modificado (Tabla 28 y 29) al que se le añadió agar en una concentración de 20g/L. Con el objetivo de determinar comportamiento de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en presencia del endosimbionte TPV08 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* en las raíces de *Phaseolus vulgaris*. Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos en función de los diferentes experimentos llevados a cabo. Todos ellos contaron con control sin inocular y sin nitrógeno. En el caso de las inoculaciones simples de las respectivas cepas empleadas, se cultivaron en medio YMA en presencia de sus correspondiente antibiótico cuando fue necesario y se crecieron hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub> = 0,5 en el caso de las cepas derivas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08, y hasta una D.O<sub>600</sub>=0,1 en el caso de las cepas derivadas de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

A diferencia del apartado anterior (apartado 5.2.1.), una vez desinfectadas en superficie las semillas se colocaron una por cada matraz, sin previa germinación. Pasados 10 días, se llevó a cabo la inoculación simple y coinoculaciones del mismo modo que el descrito en el apartado 5.2.1. Se utilizaron 6 plantas por tratamientos y se dejaron en cámara iluminada a una temperatura de 24°C con un fotoperiodo 16/8 y una humedad relativa del 60% durante 30 días.

### 5.3. Inoculación de semillas en placa de cereales.

Para evaluar la capacidad de colonización de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> durante los primeros estadios del desarrollo vegetal de los cereales *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *Avena sativa* se llevó a cabo un ensayo de inoculación de las semillas en placa de Agar-Agua (Tabla 27). Se realizaron los siguientes tratamientos.

1. Control sin inocular.
2. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.
3. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> \_RFP.

Las semillas se desinfectaron en superficie siguiendo la metodología descrita previamente para cada uno de los cereales. Una vez preparado el medio de Agar-agua, se corta la parte superior del medio, con el fin de dejar una cámara de aire para la parte aérea de la planta y colocar papel de filtro (Resma) previamente esterilizado. Colocar 3 semillas previamente germinadas e inocular con 600 µL de la suspensión bacteriana. A continuación, colocar otro papel encima de las semillas inoculadas. Por último, sellar las placas con parafilm y mantener en vertical en la cámara iluminada, a una temperatura de 24°C, un fotoperiodo de 16/8 y una humedad relativa del 60%. A los 7 y 15 días post inoculación se realizaron fotografías.

### 5.4. Ensayo *in vivo* en invernadero.

Estos ensayos se desarrollaron dentro del Servicio de Invernadero del Parque Científico de la Universidad de Salamanca (PC-USAL), situado dentro de las instalaciones del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

#### 5.4.1. *Phaseolus vulgaris* L.

Los tratamientos que se emplearon se describen a continuación.

1. Control sin inocular.
2. Tratamiento inoculado con *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 wt.
3. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.
4. Tratamiento con coinoculación 1:1 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.

Se prepararon preinóculos de cada una de las cepas seleccionadas en matraces Erlenmeyer de 150mL con 30mL de YMB y se incubaron durante 24 horas a 180 rpm y 28°C. A continuación, se traspasaron, cada una de las cepas a un matraz Erlenmeyer de 1L con 300mL de YMB y se cultivaron a 180 rpm y 28°C durante 3 días. Seguidamente se midió la D.O de igual manera que lo descrito en el apartado 4.2.2. A los diez días tras la germinación, se llevó a cabo la inoculación de cada uno de los tratamientos con 50mL del inóculo correspondiente. Se dejaron en el invernadero durante 3 meses bajo las siguientes condiciones: humedad del 45%, rango de temperatura comprendida entre 20°C como mínima y 28°C como temperatura máxima, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, riego cuando fuera necesario y no se aplicó ningún tipo de

## Materiales y Métodos

fertilizante. Se emplearon macetas de 5L con 6 plantas con tratamiento y se realizaron 3 repeticiones separadas en el tiempo. Durante el desarrollo del experimento se observó y analizó de modo rutinario las características fenotípicas.

### 5.4.2. *Trifolium repens* L.

Los tratamientos empleados fueron los siguientes:

1. Control sin inocular.
2. Tratamiento inoculado con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 wt.
3. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.
4. Tratamiento con coinoculación 1:1 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.

Los inóculos bacterianos se prepararon del mismo modo que los descrito en el apartado 5.2.1. Las semillas se germinaron según lo descrito en el apartado 5.1.2. En este caso, como endosimbionte y al igual que el resto de ensayos realizados con *Trifolium repens* L, se empleó la cepa de *R.leguminosarum* bv *trifolii* ANU843. Como sustrato se utilizó vermiculita estéril y se emplearon 35 plantas por tratamiento en alveolos de 160mL de capacidad. A los 7 días post-germinación se inocularon con 1mL/planta de las suspensiones bacterianas. Se dejaron en el invernadero durante 3 meses y bajo las siguientes condiciones: humedad del 45%, rango de temperatura comprendida entre 20°C como mínima y 28°C como temperatura máxima, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, no se aplicó ningún tipo de fertilizante y se regó con una solución de Färaheus (Tabla 28).

### 5.4.3. *Medicago sativa* L.

Los tratamientos empleados fueron los siguientes:

1. Control sin inocular.
2. Tratamiento inoculado con *Ensifer meliloti* 1021 wt.
3. Tratamiento inoculado con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.
4. Tratamiento con coinoculación 1:1 de *Ensifer meliloti* 1021 y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt.

Los inóculos bacterianos se prepararon del mismo modo que los descrito en el apartado 5.2.1. Las semillas se germinaron según lo descrito en el apartado 5.1.3. En este caso, como endosimbionte y al igual que el resto de los ensayos realizados con *Medicago sativa* L, se empleó la cepa de *Ensifer meliloti* 1021. Como sustrato se utilizó vermiculita estéril y se emplearon 35 plantas por tratamiento en alvéolos de 160mL de capacidad. A los 7 días post-germinación se inocularon con 1mL/planta de las suspensiones bacterianas. Se dejaron en el invernadero durante 3 meses y bajo las siguientes condiciones: humedad del 45%, rango de temperatura comprendida entre 20°C como mínima y 28°C como temperatura máxima, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, no se aplicó ningún tipo de fertilizante y se regó con una solución de Färaheus (Tabla 28).

### 5.4.4. *Zea mays*.

Estos ensayos se realizaron para evaluar el papel de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en la promoción del desarrollo de las plantas de maíz. Para ello, se empleó como sustrato suelo de la vega del río Tormes, ya que es un tipo de suelo que se usará en los ensayos de producción. Se realizaron los siguientes tratamientos.

1. Control sin inocular.
2. Tratamiento inoculado con la cepa *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Las semillas se desinfectaron en superficie tal y cómo esta descrito en el apartado 5.1.4. Asimismo, las inoculaciones se prepararon acorde con los descrito en el apartado 5.2.1. En este caso, se utilizaron 12 macetas por tratamiento de 5 L de capacidad. A los 7 días post-germinación se inocularon con 1mL/planta de las suspensiones bacterianas y se regaron a demanda con agua.

### 5.4.5. *Triticum aestivum* y *Avena sativa*.

Estos ensayos se realizaron para evaluar el papel de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en la promoción del desarrollo de las plantas de trigo y avena. Para ello, se empleó como sustrato suelo del municipio abulense Cisla, ya que es un tipo de suelo agrícola empleado para el cultivo de estos cereales. Se realizaron los siguientes tratamientos para cada uno de los cereales y de manera independiente.

3. Control sin inocular.
4. Tratamiento inoculado con la cepa *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Las semillas se desinfectaron en superficie tal y cómo esta descrito en el apartado 5.1.5 y 5.1.6. Asimismo, las inoculaciones se prepararon acorde con los descrito en el apartado 5.2.1. En este caso, se utilizaron 6 macetas de 8 plantas cada una de ellas por tratamiento en macetas de 5 L de capacidad. A los 7 días post-germinación se inocularon con 1mL/planta de las suspensiones bacterianas y se regaron a demanda con agua.

## 5.5. Ensayos en plantas de *Zea mays* en campo.

Debido a que las condiciones del invernadero no nos permitieron llegar a producción con las plantas de maíz, se realizó un ensayo de campo para evaluar el potencial incremento de la producción de las mazorcas de maíz. Este experimento se realizó de manera conjunta con los ensayos descritos Celador, TD, 2017. Este ensayo se realizó en el municipio de Pino de Tormes (Salamanca). Se utilizaron dos parcelas de 378m<sup>2</sup>, una fertilizada y otra sin fertilizar. Cada una de ellas se dividió en 15 parcelas de 6 m<sup>2</sup> cada una, dejando un espacio de 2m entre cada una de las subparcelas. Se realizaron tres repeticiones con cada tratamiento. Las semillas se desinfectaron según la metodología descrita en el punto 5.1.4. La siembra se realizó con una sembradora y el riego se realizó por aspersión por Pivot. En el campo fertilizado se añadió previo a la inoculación, 1Kg/Ha de fertilizante Entec® 20+10+10 (20N, 10P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10K<sub>2</sub>O). El agricultor sembró los maíces y cuando estaban germinados (15 días aproximadamente) se procedió a la inoculación.

## **Materiales y Métodos**

Los inóculos se prepararon de igual manera que los descrito en el apartado 5.3.1, con la excepción de que se prepararon soluciones bacterianas en 10L, ya que cada subparcela se inóculo con 1.6L de la suspensión bacteriana.

### **5.6. Parámetros analizados de los ensayos *in planta*.**

#### **5.6.1. Medición de clorofila.**

En aquellos ensayos en los que se decidió evaluar la clorofila como parámetro, esta se evaluó con el aparato Chlorophyll meter SPA-02 PLUS (Konica Minolta). Se trata de un aparato portátil que permite medir el índice de verdor, el cual está directamente relacionado con la cantidad de clorofila en las plantas. La medición permite evaluar indirectamente la cantidad de clorofila en la hoja de un modo no destructivo por medio de la luz transmitida a través de la hoja a dos longitudes de onda  $\lambda=650\text{nm}$  y  $\lambda=940\text{nm}$ .

#### **5.6.2. Análisis iónico.**

Este estudio se llevó a cabo para evaluar la potencial mejora en la producción de la alubia. Por cada tratamiento se seleccionaron 9 alubias. Se trituraron en grupos de 3 en tres. De cada uno de los tratamientos se enviaron 1,34g al Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura de Murcia (CEBAS-CSIC). Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento para todos los elementos.

#### **5.6.3. Procesado de los nódulos.**

Las raíces de las plantas se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier resto de vermiculita. En primer lugar, se llevó a cabo un recuento de los nódulos obtenidos en cada tratamiento y se fotografiaron. A continuación, los nódulos seleccionados se recogieron en un Eppendorf® con glutaraldehído al 4% como paso previo para la realización de cortes histológicos descritos en el apartado 6.1. Los nódulos destinados para su observación al microscopio electrónico se procesaron según la metodología descrita en el apartado 7.1.4. El resto de los nódulos se procesaron el mismo día de la recogida, para su observación al microscopio óptico y de fluorescencia.

#### **5.6.4. Medida del grado de competitividad.**

Para determinar el grado de competitividad se marcó a la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* con el plásmido pGUS3 (García-Rodríguez and Toro 2000) (ALA10B2<sup>T</sup>\_GUS), para estudiar su grado de competitividad en presencia de un endosimbionte compatible. Una vez



dados por finalizado el experimento, las raíces se cortaron y se dejaron en agua durante 15 minutos. A continuación, se sumergieron en una solución de revelado (Tabla 30) durante 18 h y 37°C.

Tabla 30. Composición de la solución de revelado (GUS).

Solución de revelado (GUS)	Concentración
Ácido 5-bromo-4-clor-3-indol-β-glucurónico	1mM
Tampón NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH7	200mg
SDS	1%

Al día siguiente se realizó el recuento del número de nódulos que mostraron tinción total o parcialmente azulada en cada uno de los tratamientos.

## 6. Técnicas histológicas.

### 6.1. Cortes histológicos de nódulos. Azul de Toluidina.

Los cortes histológicos de los nódulos, así como la tinción de estos con Azul de Toluidina fue realizado por el Servicio de Patología Diagnóstico/ Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca. Allí, los nódulos sufrieron una secuencial deshidratación con diferentes soluciones acuosas de etanol de variable concentración, seguido de una aclaración con Xilol mediante un procesador Thermo Shandon Excelsior.

Con el fin de obtener cortes lo suficientemente finos para su posterior visualización al microscopio, los nódulos fueron incluidos en parafina que se dejó solidificar a temperatura ambiente. Para ello se utilizó un dispensador Tissue-Tek TEC de Sakura®. Posteriormente, se fijaron en un portamuestra y se realizaron secciones de 2µm de grosor con la ayuda de un micrótopo MICROM HM 310. Los cortes obtenidos se colocaron sobre un portaobjetos a los que previamente se les había añadido albúmina. La parafina se eliminó con un tratamiento a base de Xilol y la muestra se rehidrató con una serie de soluciones con graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución de agua.

La tinción se realizó aplicando el colorante Azul de Toluidina al 0,01% (p/v) manteniendo los tejidos nodulares inmersos durante 1 minuto. Se retiró el colorante y se lavó con agua y se colocó el cubreobjetos fijado con resina. Finalmente, se observaron con la lupa estereoscópica y el microscopio óptico y fueron fotografiadas.

## **7. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.**

### **7.1. Preparación de muestras para su observación.**

#### **7.1.1. Frotis bacteriano.**

Esta técnica se empleó para corroborar que, las cepas seleccionadas habían incorporado como material genético plásmidos codificantes para proteínas fluorescentes. Para ello, se realizaron los siguientes pasos.

1. Añadir una gota de agua destilada y esterilizada sobre un portaobjetos seco y limpio.
2. Con la ayuda del asa de siembra, recoger en condiciones asépticas, una colonia de la cepa seleccionada y realizar una extensión.
3. Cubrir con el cubreobjetos.
4. Observar al microscopio y fotografiar.

#### **7.1.2. Preparación de raíces para su observación.**

Para observar el comportamiento de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en el proceso simbiótico, las raíces se observaron al microscopio. Para ello, las raíces se prepararon conforme a lo descrito seguidamente.

1. Añadir una gota de agua destilada y esterilizada sobre un portaobjetos seco y limpio
2. Colocar un trozo de raíz, previamente cortado con la ayuda de un bisturí estéril.
3. Seguidamente, añadir agua hasta cubrir totalmente la raíz colocando de manera cuidadosa el cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
4. Observar al microscopio y fotografiar.

#### **7.1.3. Cortes transversales de raíces y nódulos.**

Se realizaron cortes transversales de las raíces inoculadas, así como de nódulos para su observación al microscopio. Para ello, se siguieron los siguientes pasos.

1. Con la ayuda de un bisturí estéril, se cortaron aproximadamente 2 cm de raíz. En el caso de los nódulos, se cortaron los nódulos junto con aproximadamente 1 cm de raíz. Asimismo, también se cortaron unos 2 cm de Médula de Saúco (Ventus®) de manera longitudinal y perpendicularmente a la base.
2. Con la ayuda de unas pinzas, se colocó la muestra en el interior de la médula de saúco y se tapó con la otra mitad.
3. Realizar cortes en paralelo a la base de la médula de saúco lo más fino posible con la ayuda de una hoja de cuchilla.
4. Recoger el trozo de raíz o de nódulo que queda entre ambas partes de la médula de saúco y colocar en un portaobjetos (al que previamente se le añadió agua destilada estéril).

5. Cubrir la muestra con un cubreobjetos.
6. Observar y fotografiar.

#### **7.1.4. Preparación de muestras para microscopía electrónica.**

En este caso, los nódulos que presentaron un resultado positivo de actividad  $\beta$  glucuronidasa se seleccionaron para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, los nódulos se procesaron mediante el siguiente protocolo.

1. Una vez cortados las muestras, éstas se recogen un tubo Eppendorf® al que se le añadió una solución de fijación (glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato) hasta cubrir en su totalidad los nódulos.
2. Realizar el vacío a las muestras durante 2 horas empleando un desecador conectado a una bomba de vacío. (Si fuera necesario, tras este paso, se pueden dejar las muestras a 4 °C y continuar al día siguiente)
3. Retirar la solución de fijación y realizar 5 lavados con tampón fosfato 0.2M pH7.4 (Tabla 31), cada 30 minutos.
4. Al finalizar el último lavado, entregar las muestras el Servicio de microscopia sumergidas en el último lavado.
5. Postfijación en tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0,1M pH7, 4 con sacarosa y  $\text{CaCl}_2$  al 1% durante una hora aproximadamente a 4 °C.
6. Realizar una serie de lavados (3-5) en tampón de lavado o agua destilada.
7. Deshidratar empleando acetonas: 30X10, 50x10, 70x10.
8. Contrastar en bloque con Acetato de Uranilo al 2% en acetona al 70% o.n (“*over night*”).
9. Deshidratar 90x20, 100x20, acetona seca 2x30 y óxido de propileno 2x15.
10. Inclusión en resina, 30 minutos en óxido de propileno+resina (3:1), 30 en óxido de propileno+resina (1:1), 30 en óxido de propileno+resina (1:3) y pasar a resina pura durante toda la noche.
11. Pasar a resina pura 1h a 60 °C.
12. Pasar a resina pura 30 minutos a 60 °C.
13. Pasar las muestras a las cápsulas y dejar toda la noche.
14. Polimerizar durante 48 h a 60 °C.
15. Cortar las muestras en semifino y posteriormente en ultrafino con un Ultramicrotomo (Leica EM UC7), dónde se incluyen en una rejilla para poder visualizar los cortes al microscopio electrónico.

**Tabla31.** Composición del tampón fosfato.

<b>Reactivos</b>	<b>g/L</b>
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Panreac®)	5.56g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Panreac®)	14.34g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	200mL

\*Añadimos 19.0 mL de la Solución A y 81 mL de la Solución B y enrasamos a un volumen de 200mL con agua destilada. Ajustamos el pH si es necesario.

### **7.2. Tipos de microscopía empleada.**

#### **7.2.1. Microscopía óptica.**

Con el objetivo de monitorizar a *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en los primeros estadios del proceso simbiótico se utilizó el microscopio Nikon Eclipse 80i, tanto en campo claro como en luz polarizada e interferencia de fases. Los cortes histológicos teñidos con Azul de Toluidina también se observaron mediante este microscopio. Las fotografías se realizaron gracias a una cámara Nikon acoplada al microscopio.

#### **7.2.2. Microscopia de fluorescencia.**

El estudio para monitorizar a *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> tanto en inoculaciones simples como en coinoculaciones con las cepas transconjugadas con los plásmidos synGFP y pHBRmRFP se llevó a cabo empleando el microscopio Nikon Eclipse 80i. Este microscopio tiene una cámara halógena de xenón-mercurio que emite luz ultravioleta. Además, lleva acoplado una serie de filtros para polarizar la radiación y así poder modificar la longitud onda que incide en la muestra.

Las bacterias teñidas con Calcoflúor se observaron a través de esta técnica empleando un filtro a 420 nm.

#### **7.2.3. Microscopía confocal.**

La observación de las bacterias marcadas con proteínas fluorescentes durante la interacción planta-microorganismo se realizó mediante microscopia confocal láser de fluorescencia con un microscopio TSL Leica SP5 de Zeis ubicado en el Centro de Investigación del Cáncer (CIC).

#### **7.2.4. Microscopía electrónica de transmisión.**

Los estudios de microscopía electrónica (TEM) se realizaron a través del Servicio de Microscopía de Nucleus de la Universidad de Salamanca y las muestras se prepararon según lo descrito en el apartado 6.1.4.

## 8. Softwares y bases de datos utilizados.

### 8.2. Análisis de las secuencias de ADN.

La visualización y edición de los cromotogramas generados en la secuenciación nucleotídica, así como el alineamiento de éstas, se empleó el software BioEdit® (versión 7.2.5) (Hall 1999).

#### 8.2.1. Análisis comparativo *in silico* de las secuencias nucleotídicas.

Una vez alineadas las secuencias de ADN, éstas se compararon en la base de datos empleando la herramienta bioinformática BLAST (the *Basic Local Alignment and Search Tool*) del servidor de Internet del National Center for Biotechnology Information NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se utilizó el programa Blastn (Standard Nucleotide BLAST) que compara secuencias nucleotídicas con las depositadas en las bases de datos, proporcionando un listado de aquellas que presentan un mayor homología (Pearson 2014).

#### 8.2.2. Edición de plásmidos y diseño de primers.

El análisis de las estrategias de clonación y la edición de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el programa Clone Manager Suite 6. Los oligonucleótidos se diseñaron empleando el programa Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012).

#### 8.2.3. Análisis del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

El ensamblaje de las secuencias obtenidas se utilizó la herramienta Velvet (Zerbino and Birney 2008). Una vez ensambladas, se utilizaron los programas de anotación RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Overbeek *et al.*, 2014) y BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016). Una vez localizadas las secuencias, éstas se compararon empleando la misma metodología que la descrita en el apartado 7.1.1. En el caso de las secuencias proteicas, se empleó la herramienta de BLASTp de del servidor de Internet del National Center for Biotechnology Information NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Por otro lado, la búsqueda de enzimas activas en carbohidratos (CAZY) se llevó a cabo gracias al servidor web dbCAN (Yin *et al.*, 2012). La búsqueda de dominios y motivos proteicos se llevó a cabo mediante el empleo de tres herramientas bioinformáticas complementarias MotifScan ([https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)), CCD search (Marchler-Bauer *et al.*, 2017) e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

## **Materiales y Métodos**

### **8.3. Visualización de imágenes.**

Los geles de agarosa se visualizaron y fotografiaron utilizando el equipo Gel Dod 2000 equipado con el programa informático Quantity One® (Bio-Rad). El resto de las imágenes fueron tomadas con una cámara Nikon y se editaron con el programa Adobe Photoshop®. En cuanto a las imágenes del microscopio confocal se editaron y se superpusieron con el programa Leica Suite.

### **8.4. Análisis Estadístico.**

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza y se calcularon las diferencias significativas mediante el test de Fisher utilizando el programa Statview (Abacus Corporation).

### **8.5. Gestor bibliográfico.**

Para la edición de la bibliografía se utilizó el programa informático Mendeley

# Capítulo I

**Caracterización *in vitro* del potencial PGPB y simbiótico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum***





La selección de un buen biofertilizante bacteriano se fundamenta en sus habilidades para interactuar con la planta huésped, a través de sus capacidades para colonizar la superficie radicular y en su caso infectar, así como para promover el crecimiento vegetal. Por lo tanto, uno de los pasos previos a la selección, es realizar una aproximación *in vitro*. Este capítulo está dedicado al estudio *in vitro* de los potenciales mecanismos PGPB, así como propiedades simbióticas inherentes del género *Rhizobium* y relacionadas con la colonización, infección y nodulación por parte de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

## 1. Estudio de los potenciales mecanismos PGPB *in vitro*.

### 1.1. Producción de ácido indolacético IAA.

La producción de IAA bacteriano se ha detectado en numerosos géneros, estimándose que el 80% de las bacterias aisladas de la rizosfera son capaces de sintetizar IAA (Bernardelli *et al.*, 2001). El ácido indolacético (IAA) es una fitohormona con capacidad no sólo de estimular el crecimiento de las raíces y/o fomentar el desarrollo de raíces secundarias (Dimpka *et al.*, 2009), sino también se ha descrito su papel como señalizador celular (Spaepen *et al.*, 2007). Dada la importancia en el ámbito de la agricultura del empleo de biofertilizantes capaces de producir IAA, se decidió evaluar la capacidad de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Por ello, la detección se midió de modo cuantitativo mediante el empleo de la técnica de espectrofotometría de masas HPLC. Los resultados obtenidos, nos mostraron una producción de 295 µg/mL indicando que es un gran productor de IAA:

Esta capacidad para producir IAA se ha documentado en otras especies del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Tabla 32). Algunas de estas especies se han aislados de nódulos de *Cajanus cajan* como *Rhizobium* sp con una producción de 99,7 µg/ml (Datta and Basu 2000) y *Rhizobium* sp P2 con una producción de 142,5 µg/ml (Kumar Ghosh *et al.*, 2013).

La producción de IAA por rizobacterias se ha relacionado con un incremento de esta fitohormona en las inmediaciones de las raíces de *Oryza sativa* tras la inoculación con diferentes rizobios como *R. leguminosarum* bv *trifolii* E11, *Rhizobium* sp. IRBG74 y *Bradyrhizobium* sp. IRBG271 mejorando la producción de arroz (Biswas *et al.*, 2000). Otros estudios avalan que, la síntesis de auxinas bacterianas puede mejorar la interacción entre *Rhizobium* y las plantas leguminosas, ya que puede desempeñar un papel como molécula señalizadora para el desarrollo de nódulos determinados (Pii *et al.*, 2007).

Cabe destacar que, la producción de IAA en las especies descritas anteriormente, se determinó añadiendo triptófano al medio, al igual que en el caso de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> indicándonos que la producción de dicha fitohormona obtenida en este estudio es dependiente de triptófano. Las potenciales rutas metabólicas empleadas para su producción se abordarán en el capítulo III.

Tabla 32. Concentración de IAA producida por diferentes especies promotoras del crecimiento vegetal.

Microorganismo	Concentración de IAA	Referencia
<i>Rhizobium</i> sp	99,7 µg/ml	(Datta and Basu 2000)
<i>Rhizobium</i> sp P2	142,5 µg/ml	(Kumar Ghosh <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> SN10	25 µg/ml	(Biswas Bhattacharjee <i>et al.</i> ,2012)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	0,91 µg/ml	(Boiero <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	2,1 µg/ml	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5080	3,8 µg/ml	
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup>	295 µg/mL	Trabajo presente

## 1.2. Producción de sideróforos.

El hierro es un elemento indispensable para el desarrollo de microorganismos, plantas y animales ya que desempeña un papel crucial como cofactor de diferentes enzimas (Sayyed *et al.*, 2013). En condiciones de baja disponibilidad, tanto los microorganismos como las plantas han desarrollado la estrategia de producir sideróforos, moléculas quelantes de hierro (Saharan and Nehra 2011). El uso de bacterias PGPB productoras de sideróforos ha despertado un gran interés en el ámbito de la agricultura debido a su potencial multifuncional tanto en la promoción del desarrollo vegetal (Sayyed *et al.*, 2004) como en la supresión de enfermedades (Compant *et al.*, 2005). Por ello, se evaluó la capacidad *in vitro* de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> como bacteria productora de sideróforos. Además, se emplearon otras especies pertenecientes a la familia de los *Rhizobiaceae* empleadas en la presente tesis doctoral.

Los resultados, nos mostraron que todas las cepas empleadas a excepción de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 fueron capaces de crecer en dicho medio. Esto puede ser debido a que algunos de los componentes del medio de cultivo CAS-M9-Agar inhiban su crecimiento. No obstante, en el resto de microorganismo empleados se puede observar en mayor o menor medida la aparición de un halo anaranjado alrededor de las colonias indicando una producción positiva de sideróforos *in vitro* (Figura 27).

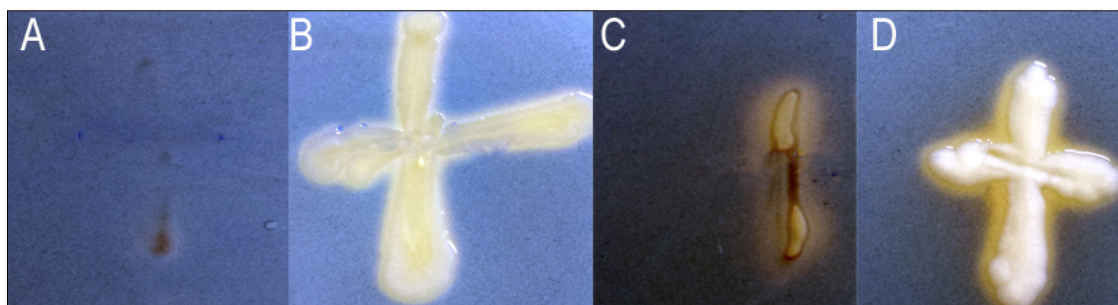
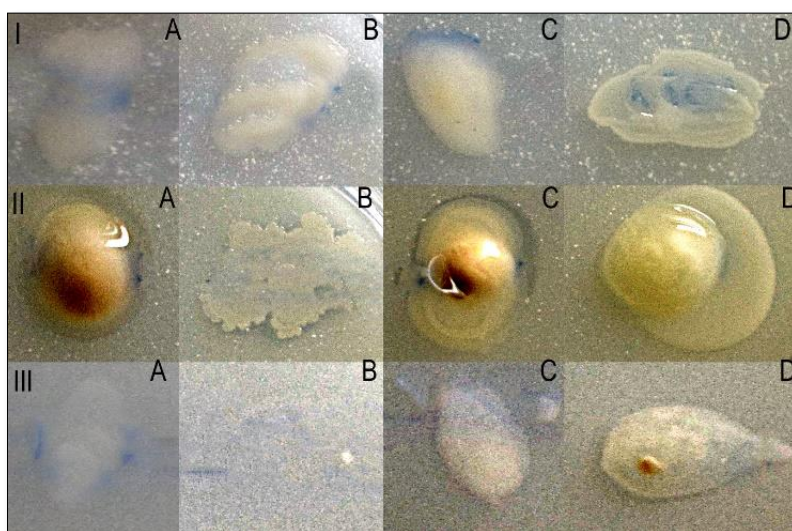


Figura 27. Crecimiento de las cepas seleccionadas en medio M9-CAS Agar en las que se observa la producción y ausencia de sideróforos. A, Ausencia de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843. B, Producción débil de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. C Mayor producción por la cepa TPV08 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. D. Mayor producción por la cepa 1021 *Ensifer meliloti*.

Esta característica PGPB se ha descrito en numerosos microorganismos, entre los que se encuentran diferentes especies de rizobios tales como *Ensifer meliloti*, *R.leguminosarum* bv *viciae*, *R.leguminosarum* bv *phaseoli* y *R.leguminosarum* bv *trifolii* determinándose mediante identificación química la producción de sideróforos del tipo hidroxomato (Carson *et al.*, 2000). En este estudio no pudimos concluir el tipo de sideróforo, ya que se trata de una prueba cualitativa basada en la ausencia y/o presencia de halo alrededor de las colonias. La cepa ALA10B2<sup>T</sup> presentó una menor producción comparada con las cepas de *Rhizobium* que presentaron una producción mayor.

### 1.3. Solubilización de fosfato.

El fósforo es el segundo nutriente más importante para las plantas tras el nitrógeno, encontrándose en el suelo como sales minerales o incorporado a compuestos orgánicos, estando la mayoría en formas insolubles (Miller *et al.*, 2009). Debido a esta problemática, así como al uso excesivo de fertilizantes por parte de los agricultores, la búsqueda de microorganismos PSB es fundamental para el desarrollo de un buen biofertilizante bacteriano. Debido a que recientemente se ha publicado que, la solubilización de fosfato varía mucho en función del sustrato que se emplee (Bashan *et al.*, 2013), se decidió evaluar el potencial de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> con diferentes fuentes de fosfato inorgánico como fosfato bicálcico ( $\text{Ca}_2\text{PO}_3$ ), fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$ ) e hidroxiapatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . Además de la cepa objeto de estudio de la presente tesis doctoral, también se emplearon otras cepas endosimbiontes de los géneros *Rhizobium* y *Ensifer*. Los resultados pusieron de manifiesto que todas las cepas empleadas sólo fueron capaces de solubilizar fosfato en la forma bicálcica (Figura 28).



**Figura 28.** Crecimiento de las cepas seleccionadas empleando como medio base Pikovskaya con diferentes fuentes de Pi. I. Fosfato tricálcico, II. Fosfato bicálcico, III. Hidroxiapatita. A, *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, B, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, C, *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 y D, *Ensifer meliloti* 1021.

Nuestro resultados concuerdan con estudios publicados, en los que se determina que especies bacterianas como *Mesorhizobium mediterraneum* UPM-CA142<sup>T</sup>, *M. ciceri* USDA 3383<sup>T</sup>, *M. tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* son capaces de solubilizar

fosfato en la forma bicálcica (Rivas *et al.*, 2006). Otras especies del género *Rhizobium* también han sido descritas como solubilizadoras de fosfato (Chabot *et al.*, 1996; Saghir Khan *et al.*, 2007).

A pesar de que diversos estudios emplean fosfato tricálcico (TCP de las siglas en inglés “*tricalcium phosphate*”) para el aislamiento de bacterias PSB (Yu *et al.*, 2011b), existe controversia, ya que otros estudios plantean el uso de diferentes Pi tanto para el aislamiento como para evaluar la capacidad de las potenciales PSB (Bashan *et al.*, 2013). Nuestras cepas no fueron capaces de solubilizar fosfato en forma tricálcica, al igual que en forma de hidroxiapatita. Esta última, es una forma muy insoluble y por lo tanto difícil de asimilar. Se ha documentado la capacidad de *Pantoea agglomerans* (Jung *et al.*, 2002) de solubilizar hidroxiapatita, pero no hemos encontrado ningún artículo sobre esta capacidad en bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*.

## 2. Estudio de la biosíntesis de celulosa.

La celulosa es el biopolímero más abundante en el planeta que hasta hace unos años, cuya producción se pensaba que era excluyente de las plantas. Sin embargo, hoy en día, esta capacidad se ha documentado en otros organismos diferentes, como en hongos (Mrudula and Murugammal 2011), bacterias (Rö Mling and Galperin 2015) e incluso dentro de un grupo de animales, los urocardos (Wada *et al.*, 1994).

La biosíntesis bacteriana de celulosa está documentada, principalmente en bacterias Gram negativas, y su producción está ampliamente distribuida entre las bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* (Robledo *et al.*, 2008). Se ha descrito que, durante el desarrollo simbiótico entre *Rhizobium*-leguminosas, la bacteria se ancla a la superficie radicular mediante la secreción de diferentes polisacáridos superficiales rizobianos, siendo uno de los más importantes la formación de microfibrillas de celulosa (Dazzo *et al.*, 1984; Smit *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 1995).

Debido a la importancia que desempeña la celulosa en dicha interacción simbiótica, se decidió evaluar la capacidad de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> empleando diferentes técnicas.

### 2.1. Tinción con Rojo Congo.

Una de las técnicas más empleadas para el análisis cualitativo de la producción de celulosa en bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, es el uso del colorante Rojo Congo (Zevenhuizen *et al.*, 1986). Este colorante tiene afinidad por los enlaces  $\beta$  1,4 como son los enlaces del biopolímero de celulosa.

Debido a que la capacidad para sintetizar celulosa varía entre especies bacterianas del mismo género (Kneen and Larue 1983), se decidió emplear la escala cualitativa descrita por Robledo *et al.*, (2012) en la que establecieron diferentes grados de producción de celulosa en función de su color, siendo débiles (w) aquellas colonias que presentan una coloración blanquecina, aquellas colonias que presentaban una coloración rosácea pálida se determinó como positivas débiles (+), las colonias con una coloración rosácea son consideradas positivas (++), siendo grandes productoras de celulosa, aquellas que presentaban una coloración rojiza (+++). A

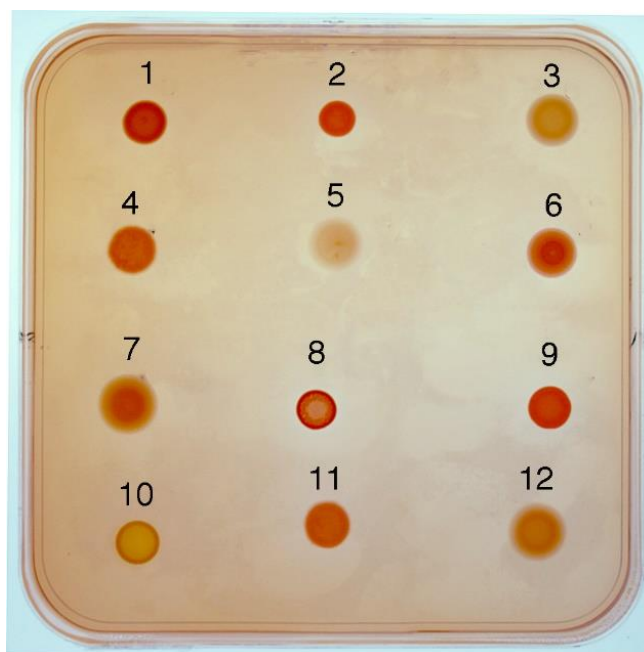
pesar de que se ha descrito que el Rojo Congo puede unirse a otro tipo moléculas que presenten enlaces  $\beta$  1,4 , se ha demostrado que en el caso de *Rhizobium*, la tinción con este colorante se relaciona con la producción de celulosa (Kneen and Larue 1983).

Los resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad en la producción de celulosa entre diferentes especies bacterias pertenecientes al mismo género (Tabla 33), corroborando los estudios descritos por Zevenhuizen *et al.*, (1986).

**Tabla 33.** Producción de celulosa por distintas especies tipo del género *Rhizobium* en relación con la escala colorimétrica propuesta por Robledo *et al.*, 2012. Los valores corresponden a una coloración rojiza intensa (+++) hasta una coloración blanquecina (w).

Microorganismo	Producción de celulosa
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC113225 <sup>T</sup>	+++
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup>	+++
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> TPV08	w
<i>Rhizobium pisi</i> DSM30132 <sup>T</sup>	++
<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE2052 <sup>T</sup>	w
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC19358 <sup>T</sup>	++
<i>Rhizobium multihospitium</i> LMG3946 <sup>T</sup>	+
<i>Rhizobium vignae</i> LMG25447 <sup>T</sup>	++
<i>Rhizobium endophyticum</i> CCGE525 <sup>T</sup>	+++
<i>Rhizobium selenitireducens</i> LMG24075 <sup>T</sup>	+
<i>Rhizobium leguminosarum</i> ATCC10004 <sup>T</sup>	++
<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU710492 <sup>T</sup>	+

Como podemos observar en la imagen (Figura 29) la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> es un gran potencial productor de celulosa *in vitro* debido a la coloración roja intensa que exhibía en comparación con el resto de las cepas empleadas en este estudio.

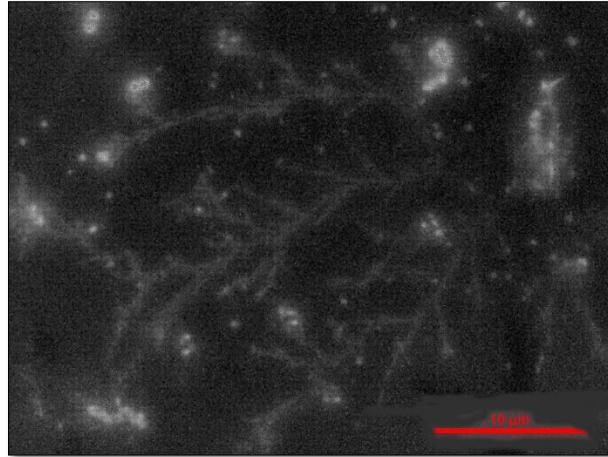


**Figura 29.** Colonias bacterianas crecidas en medio de YMA suplementado con Rojo Congo. 1. *R. rhizogenes* ATCC113225<sup>T</sup> (+++), 2. *R. cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> (+++), 3. *R. leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 (w), 4. *R. pisi* DSM30132<sup>T</sup> (++) , 5. *R. jaguaris* CCGE2052<sup>T</sup> (w), 6. *R. radiobacter* ATCC19358<sup>T</sup> (++) , 7. *R. multihospitium* LMG3946<sup>T</sup> (++) , 8. *R. vignae* LMG25447<sup>T</sup> (++) , 9. *R. endophyticum* CCGE525<sup>T</sup> (+++), 10. *R. selenitireducens* LMG24075<sup>T</sup> (+), 11. *R. leguminosarum* ATCC10004<sup>T</sup> (++) , 12. *R. indigoferae* CCBAU710492<sup>T</sup> (+) (Diez-Mendez *et al.*, 2015).

## 2.2. Tinción con calcoflúor.

De manera complementaria al estudio anterior, se realizó una tinción con Blanco de Calcoflúor (SIGMA) de una suspensión de la cepa de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Este colorante presenta una gran afinidad por los enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 presentes en polisacáridos como la quitina o la celulosa, siendo de gran utilidad para la tinción de paredes fúngicas y vegetales (Flores-Félix *et al.*, 2015a). Este fluorocromo es fluorescente cuando es excitado a luz ultravioleta de onda larga en un rango comprendido entre 300-412nm, presentando un pico de absorbancia a 347nm. Además, se ha empleado como marcador biológico no tóxico para la detección de celulosa en microorganismos (Hageage y Harrington, 1984).

Durante la observación con el microscopio de fluorescencia (Figura 30), pudimos observar fluorescencia tanto en las microfibrillas que forma, como en el interior de las propias células. Además, estos resultados, evidencian los datos obtenidos tras la tinción con Rojo Congo (ver apartado 2.1.) con la producción de exopolisacáridos de enlace tipo  $\beta$  por parte de nuestra cepa objeto de estudio.



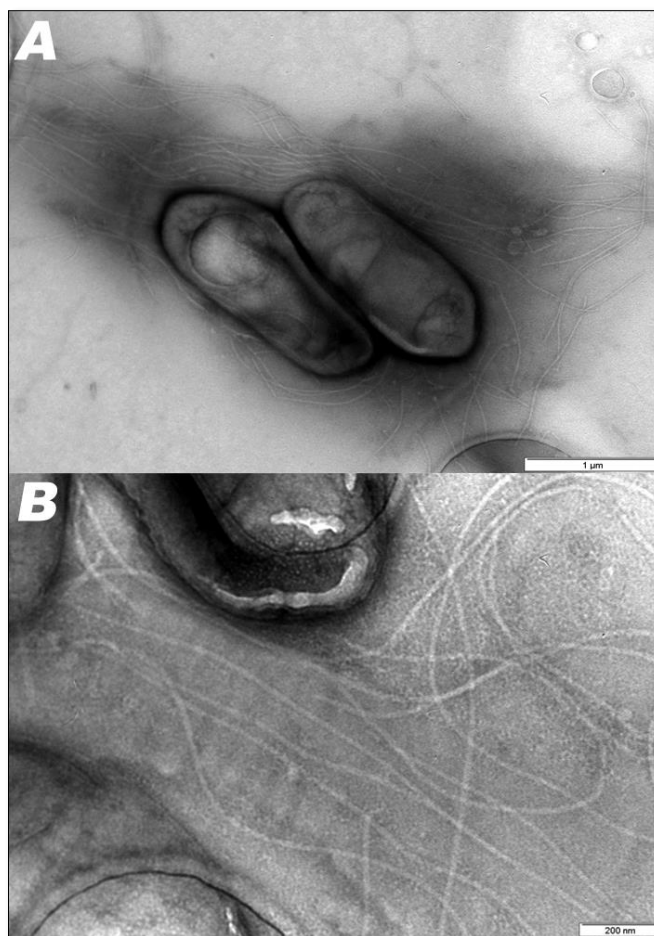
**Figura 30.** Fotografía realizada con el microscopio de fluorescencia en el que se puede observar la tinción con Blanco de Calcoflúor de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Esta técnica se ha empleado en otras cepas de rizobios como es el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 en donde también se observó fluorescencia en el interior de las células como en las microfibrillas externas de celulosa (Robledo *et al.*, 2012). Por lo tanto, podríamos decir que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> produce un tipo de exopolisacárido similar al producido por la cepa ANU843.

### 2.3. Microscopía de transmisión.

Los paneles A y B de la Figura 31 muestran microfibrillas exopolisacáridicas sintetizadas por la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* gracias al uso de la microscopía de transmisión. Estas microfotografías fueron cedidas por el Dr. Pedro F. Mateos.

En la figura se puede apreciar de modo general células rizobianas rodeadas de microfibrillas exopolisacáridicas (Figura 31, A). Asimismo, los aumentos microscópicos nos indican que no se trata de flagelos (Figura 31, B).



**Figura 31.** Microfotografías de transmisión de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en donde se pueden observar microfibrillas exopolisacáridica. A) Vista general de las células rodeadas de microfibrillas. B) Detalle de las microfibrillas.

Los resultados observados, se encuentran en concordancia con la producción de exopolisacáridos por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*.

#### 2.4. Determinación de la naturaleza exopolisacáridica.

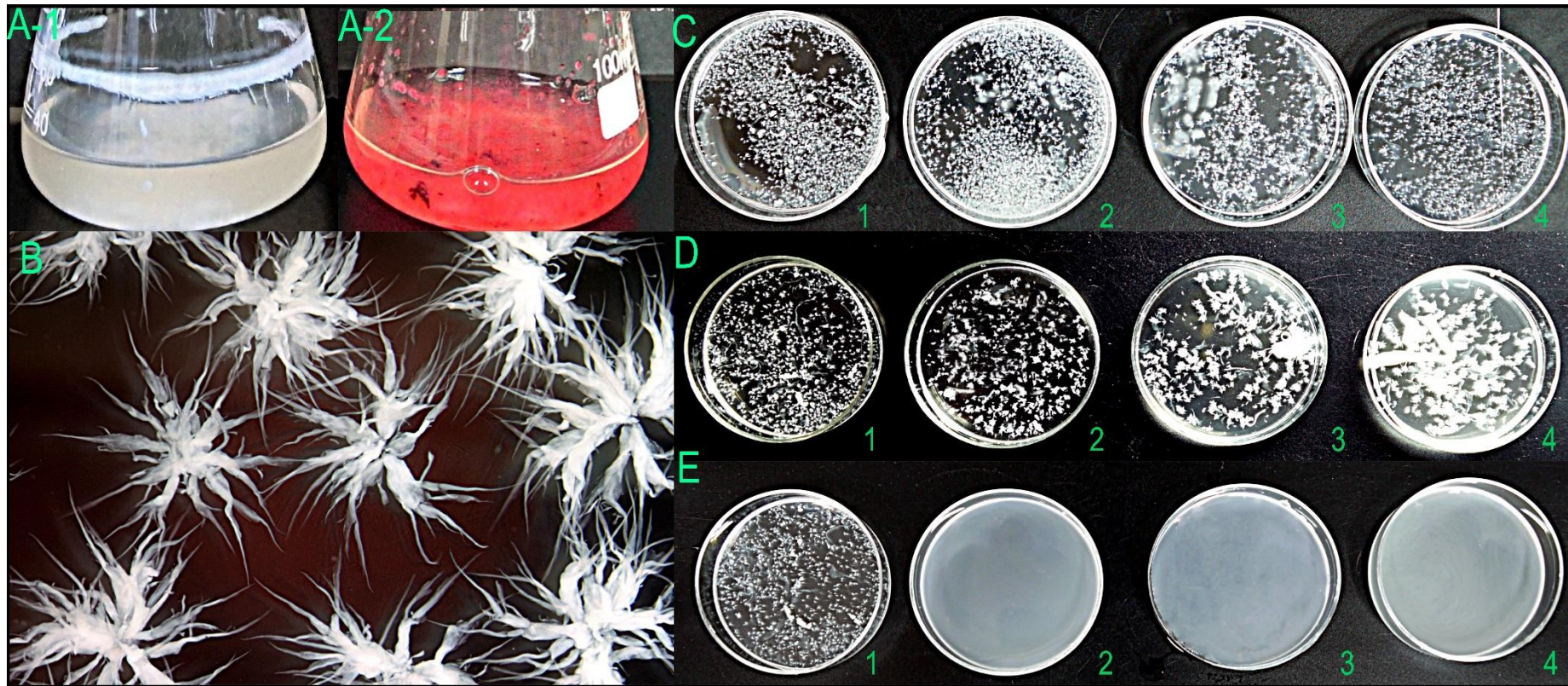
Los resultados obtenidos de las pruebas descritas en el apartado 2.1 y 2.2, nos pusieron de manifiesto que la cepa *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, es capaz de producir exopolisacáridos de enlace  $\beta$ . Por ello, y para determinar su naturaleza, decidimos realizar un ensayo de floculación, al que se trató posteriormente mediante un ensayo enzimático.

En primer lugar, la cepa ALA10B2<sup>T</sup> se creció por duplicado en medio YMB suplementado con Rojo Congo y en medio YMB sin Rojo Congo durante 5 días a 180 rpm y 28 °C. Tras este período, observamos la formación de flóculos depositados en el fondo, así como un anillo homogéneo en el interior del matraz (Figura 32-A-1. A-2). De un modo más detallado, observamos que la morfología de los flóculos simulaba una forma estrella tridimensional (Figura 32, B). Seguidamente, se realizó el ensayo enzimático con diferentes enzimas.

Para determinar si la matriz exopolisacáridica exhibía una composición proteica parcial o en su totalidad, los flóculos se trataron con una mezcla de proteasas y proteinasa K, y se incubaron



a 37 °C durante 2 horas con diferentes concentraciones según los descrito en el apartado 2.2.3 de Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que, los flóculos bacterianos tratados con ambas enzimas, no se disgregaron tras ese período de tiempo (Figura 32, C.1-4/ D.1-4), lo que nos indica que la matriz no tiene naturaleza proteica. De manera paralela, se realizó otro ensayo enzimático empleando celulasas para evaluar si la matriz del exopolisacárido era de composición celulósica. Estudios previos llevados a cabo por Robledo et al 2008, determinaron la eficacia de 10 U/mL de celulasas de *Trichoderma viridae* para la disgregación de los flóculos producidos por *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843. Por lo tanto, empleamos como punto partida esa concentración, siendo el máximo 20 U/mL. Los resultados (Figura 32, D1-4) muestran que los flóculos producidos se disgregaron en presencia de todas las concentraciones empleadas de celulasas, determinando que la composición del exopolisacárido es celulosa.



**Figura 32.** Ensayo de floculación realizado con la cepa ALA10B2T de *Rhizobium cellulosilyticum*. A.1, Crecimiento en YMB tras 5 días de incubación. A.2, Crecimiento en YMB suplementado con Rojo Congo tras 5 días de incubación. B, Detalle morfológico de los flóculos obtenidos. C.1-4, Tratamiento de los flóculos obtenidos con mezcla de proteasas. C.1, Flóculos sin tratar. C.2, Flóculos tratados con 3 U/mL, C.3, Flóculos tratados con 5 U/mL. C.4, Flóculos tratados con 7 U/mL. D.1-4, Tratamiento de los flóculos obtenidos con proteinasa K. D.1, Flóculos sin tratar. D.2, Flóculos tratados con 3 U/mL. D.3, Flóculos tratados con 6 U/mL. D.4, Flóculos tratados con 9 U/mL. E.1-4 Tratamiento de los flóculos obtenidos con celulasas de *Trichoderma viridae*. E.1, Flóculos tratados con 10 U/mL. E.2, Flóculos tratados con 15 U/mL. E.3, Flóculos tratados con 20 U/mL.

## 2.5. Estudio de la formación de biofilms *in vitro*.

La habilidad para formar biofilms es un atributo universal en las bacterias ofreciendo una serie de ventajas para la supervivencia como son la colonización de sustratos tanto abióticos como bióticos, barrera protectora, fuente de nutrientes, resistencia a estrés ambientales y antibióticos. Estas biopelículas son comunidades multicelulares unidas por una matriz extracelular autoproducida (López *et al.*, 2010).

Los rizobios son capaces de formar estos agregados adhiriéndose a la superficie y pelos radiculares del hospedador, así como a partículas presentes en la rizosfera evitando ser desplazados a otro tipo de nicho (Nancy A. Fujishige *et al.*, 2006). Los mecanismos implicados en la formación de biofilms varían en función de las características de los microorganismos y de las condiciones ambientales (López *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha descrito la implicación de la celulosa en la formación de biofilms de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (Da Re and Ghigo 2006; Serra *et al.*, 2013), *Salmonella enteritidis* (Solano *et al.*, 2002) y *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 (Robledo *et al.*, 2008).

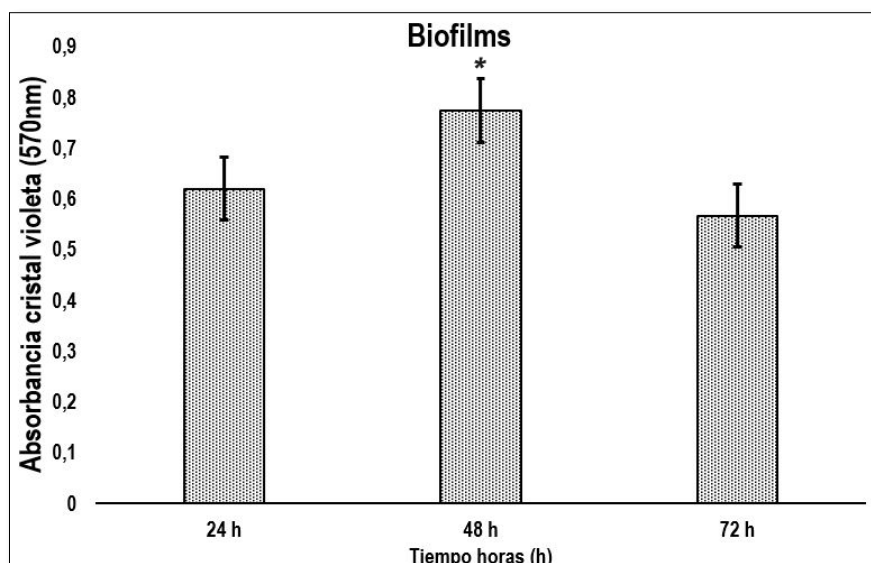
Debido a la importancia de los biofilms, se decidió evaluar la capacidad de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en superficies abióticas. Su capacidad para colonizar y formar biofilms *in planta* se abordará en los capítulos III y IV.

### 2.5.1. Ensayos en placas de microtitulación de PVC.

Los ensayos relacionados con la formación de biofilms se llevaron a cabo siguiendo la metodología establecida por Fujishige empleando placas de microtitulación de poliestireno para establecer estimaciones cuantitativas (Fujishige *et al.*, 2006).

En esta técnica se empleó el colorante cristal violeta que se utiliza para teñir bacterias, tanto las que se encuentran adheridas de manera irreversible, cómo aquellas que se encuentren en suspensión. Cuanto más intensa sea la coloración, más cantidad de bacterias han conseguido anclarse y por lo tanto formar biofilms.

Los resultados muestran una clara tendencia positiva de la producción de biofilms siendo su máxima formación a las 48h, reduciéndose a las 72 horas (Gráfica 1). Estos datos difieren con otros llevados a cabo con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 (Robledo *et al.*, 2012) y *Rhizobium laguerreae* (Jiménez-Gómez *et al.*, 2018), en los que se observa, una tendencia positiva y creciente durante la formación del biofilm, obteniendo la máxima producción a las 72 horas tras la inoculación. En nuestro caso, la disminución en la formación de biofilm, puede ser debida a que *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> es un gran productor de celulosa como se ha descrito en los apartados 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 de este capítulo, y por consiguiente, esa gran producción puede provocar una disminución del biofilm tal y como se ha observado en mutantes superproductores de celulosa (Robledo *et al.*, 2012).

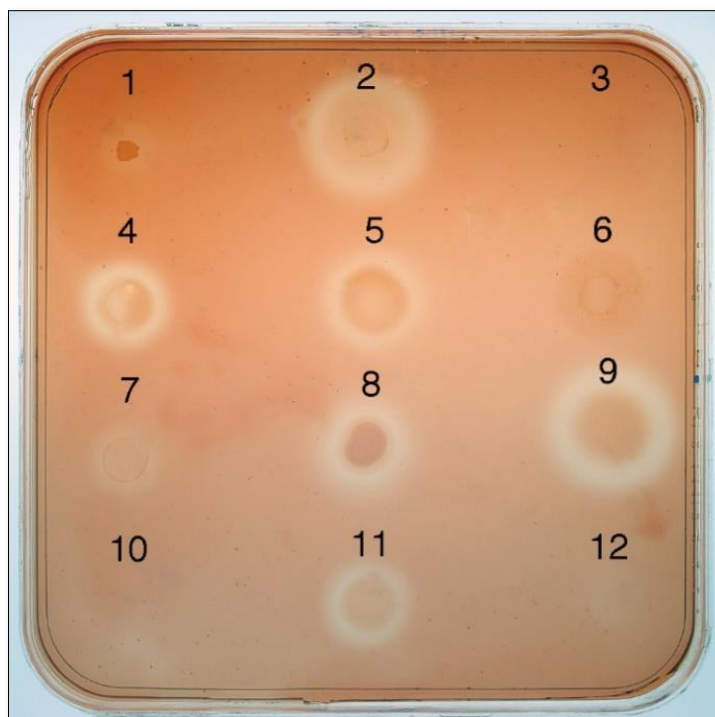


**Gráfica 1.** Resultados obtenidos de las absorbancias medias para la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> a las 24h, 48h y 72h de crecimiento en medio TY a 28°C. Tanto las medidas como las barras de error corresponden a 12 medidas tomadas por cada uno de los tiempos establecidos.

### 3. Caracterización de la actividad celulolítica.

#### 3.1. Ensayo de colonias.

Debido a la importancia de las celulasas simbióticas del género *Rhizobium*, se decidió comparar la capacidad celulolítica de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> con otras cepas del mismo género. Para ello, se empleó la metodología descrita en materiales y métodos, y se emplearon las mismas cepas tipo utilizadas en el apartado 2.1 de este capítulo. Los resultados nos mostraron que, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> exhibía una gran actividad celulolítica (Figura 33, 2). A pesar de que esta metodología es cualitativa, sí se puede observar que el halo celulolítico alrededor de la colonia nos indica una gran actividad celulolítica respecto al resto de las colonias empleadas en este estudio (Figura 33).



**Figura 33.** Ensayo de actividad carboximeltilcelulásica de las colonias seleccionadas. 1. *R.rhizogenes* ATCC113225<sup>T</sup> (+), 2. *R. cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> (+++), 3. *R.leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 (w), 4. *R.pisi* DSM30132<sup>T</sup> (++) , 5. *R.jaguaris* CCGE2052<sup>T</sup> (++) , 6. *R.radiobacter* ATCC19358<sup>T</sup> (w), 7. *R.multihospitium* LMG3946<sup>T</sup> (w), 8. *R.vignae* LMG25447<sup>T</sup> (++) , 9. *R.endophyticum* CCGE525<sup>T</sup> (+++), 10. *R. selenitireducens* LMG24075<sup>T</sup> (w), 11. *R.leguminosarum* ATCC10004<sup>T</sup> (+), 12. *R.indigoferae* CCBAU710492<sup>T</sup>(w) (Diez-Mendez *et al.*, 2015).

Por otro lado, la especie de *Rhizobium endophyticum* (Figura 33, 9) presentaba un gran halo de actividad hidrolítica similar al de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. Esto nos podría estar indicando que, a pesar de la gran actividad celulolítica mostrada por la cepa ALA10B2<sup>T</sup> no quiere decir que actúe como un patógeno cuando es inoculada en planta, ya que como ocurre con *Rhizobium endophyticum* fue aislada de nódulos efectivos de *Phaseolus vulgaris* (López-López *et al.*, 2010). Además, resulta lógico pensar en el potencial celulolítico de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup>, ya que la madera en estado de descomposición o putrefacción constituye un gran reservorio para el aislamiento de microorganismos celulolíticos de interés biotecnológico (Clausen 1996; Li *et al.*, 2011; Ghio *et al.*, 2012).

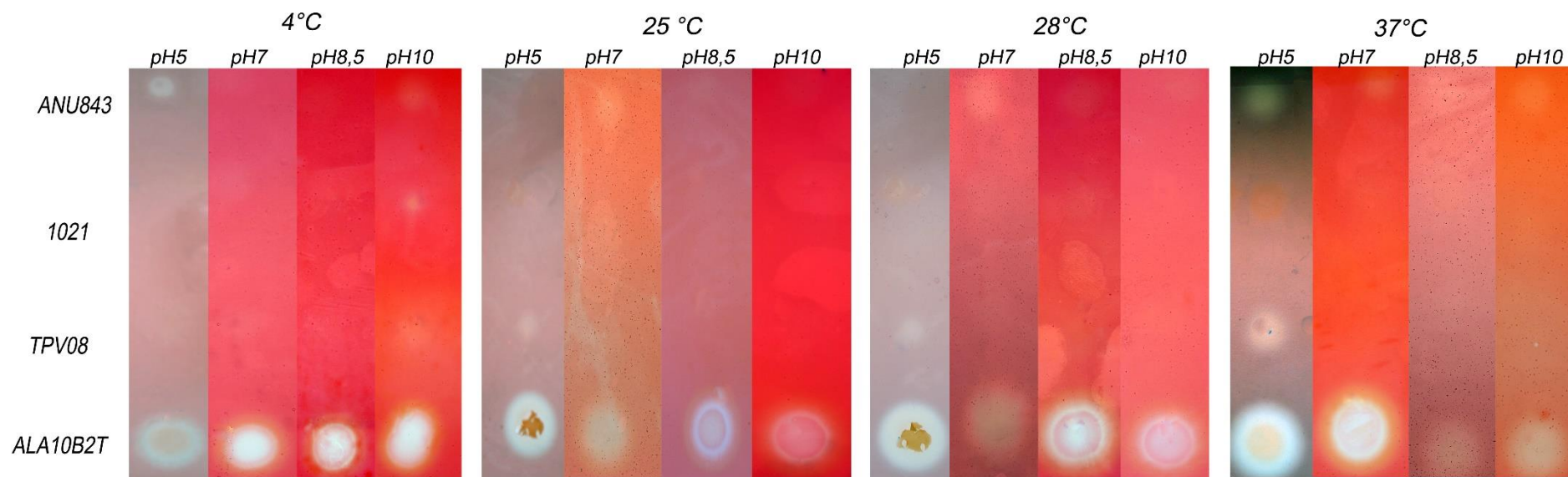
### 3.2. Ensayo de difusión en placa a distintas temperaturas y pHs.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos a diferentes pHs y temperaturas con estratos sonicados de la cepa de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> con el objetivo de determinar la temperatura y pH óptimos de la actividad enzimática. A modo de comparación, se emplearon las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 y *Ensifer medicae* 1021, ya que estas cepas se han empleado a lo largo de la presente tesis doctoral.

Respecto a la actividad celulásica, la cepa de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> presentó una gran actividad enzimática en todas las temperaturas y pHs analizados, salvo en los parámetros de pHs básico (8,5 y 10) a una temperatura de 37°C, y pH7 a una temperatura de

28°C, donde se observa un halo hidrolítico más tenue que en el resto de los parámetros analizados (Figura 34). Estos resultados distan de los observados en las cepas complementarias seleccionadas, observándose actividad enzimática a pH5 y a una temperatura de 37°C en el caso de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08, y pH5 y temperatura 4°C también en el caso de la cepa ANU843. En este caso, se ha descrito que *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 presenta en su genoma dos isoenzimas que codifican para dos celulasas denominadas C1 y C2, siendo esta última la responsable de la interacción simbiótica con su planta hospedadora *Trifolium repens* y cuya actividad enzimática óptima se ha determinado a pH5 y 37°C (Robledo *et al.*, 2011).

Los datos observados con la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, nos ponen de manifiesto la posible existencia de varias isoenzimas en el genoma, lo cual podría explicar el gran potencial hidrolítico que exhibe dicha cepa. No obstante, las características genotípicas se abordarán en el capítulo II de un modo más amplio y profundo mediante el análisis *in silico* del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> determinado la existencia de 3 isoenzimas.

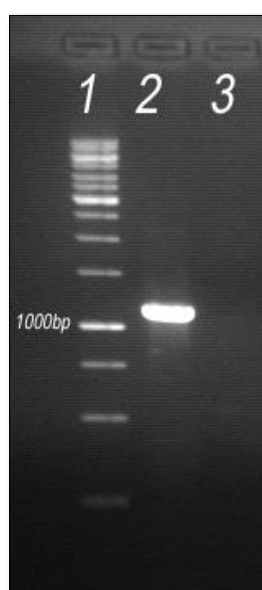


**Figura 34.** Detección de actividad celulolítica a diferentes pHs y temperaturas mediante difusión radial en placa de extractos celulares obtenidos por sonicación de las cepas silvestres de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, *Ensifer meliloti* 1021, *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2T.

### 3.3. Estudio genético de la presencia de la celulasa celC2 en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

El siguiente paso que nos planteamos tras observar el potencial celulolítico de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, fue determinar mediante amplificación de PCR convencional la existencia del gen *celC2* ya que está descrito como marcador taxonómico para las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* (Robledo *et al.*, 2011). Como control positivo empleamos la cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843.

Los datos obtenidos nos muestran que, en el control positivo obtuvimos una banda de más de 1000 bp correspondiéndose con el tamaño del gen *celC2*, mientras que en el caso de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> no se observó la amplificación de ninguna banda (Figura 35).



**Figura 35.** Amplificación por PCR convencional del gen *celC2*. 1. Marcador molecular Gennuler 1kb. 2, *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843. 3, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

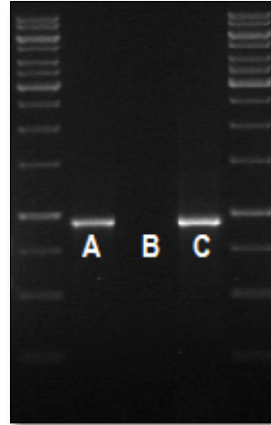
Estos resultados nos indican que, el potencial celulolítico de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> observados en los estudios *in vitro* es debido a la presencia de celulassas diferentes a las celulassa simbióticas pertenecientes a las especies bacterianas del género *Rhizobium*.

### 4. Amplificación del gen *nodC* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Otra peculiaridad inherente a las bacterias del género *Rhizobium*, es su capacidad para inducir nódulos en plantas leguminosas. Para evaluar si *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> posee genes relacionados con la dicha habilidad, se decidió realizar una amplificación del gen *nodC*, empleando como controles positivos la cepa TPV08 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* y la cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843.



Tras la amplificación observamos que, las cepas de control positivo presentaron una banda de unos 500 bp aproximadamente correspondientes a la amplificación del gen *nodC*, mientras que en el caso de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> no se observó ninguna banda (Figura 36).



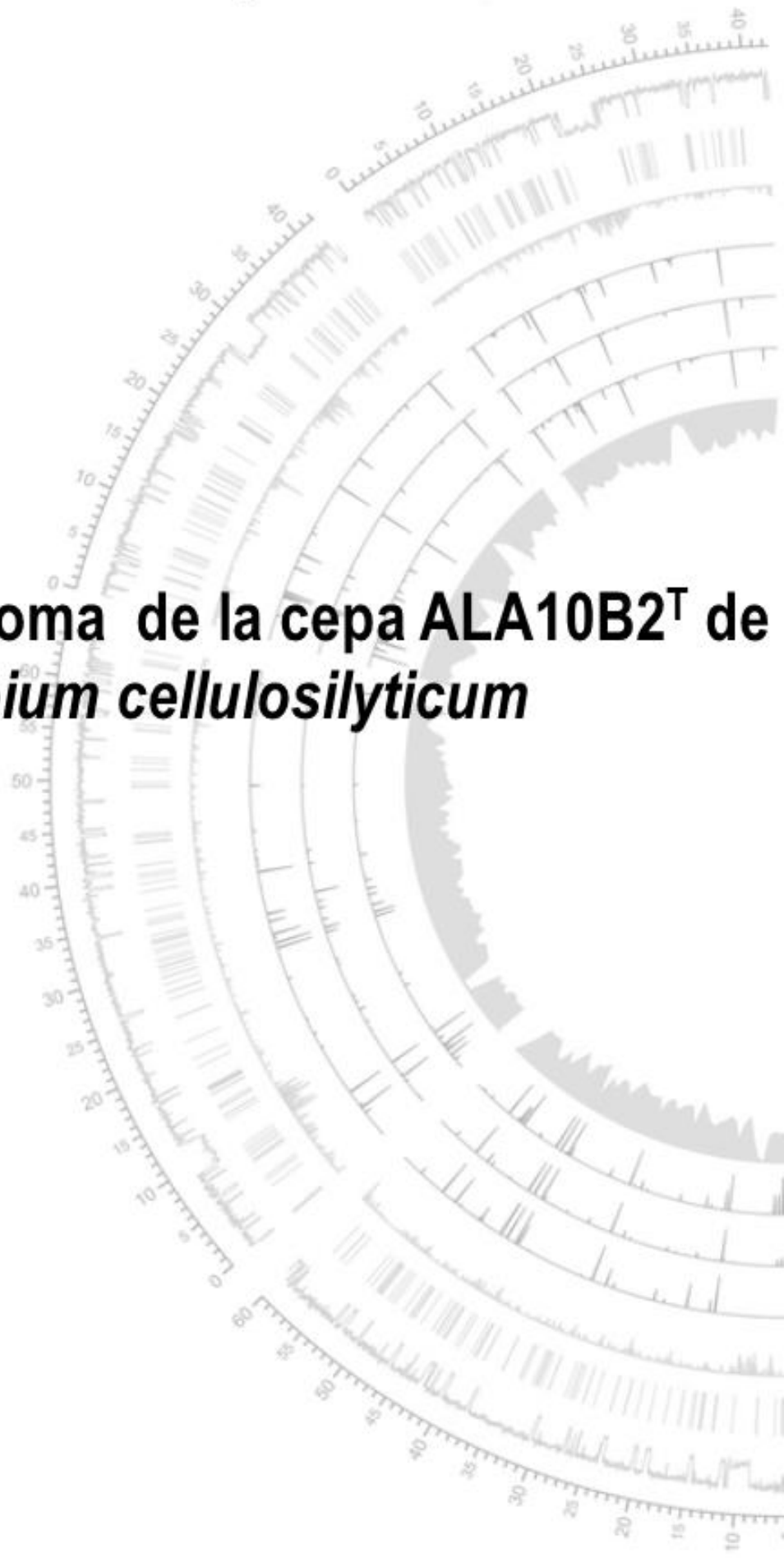
**Figura 36.** Amplificación por PCR convencional del gen *nodC* en las cepas seleccionadas. A, *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843. B, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. C, *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08.

El gen *nodC* codifica para una N-acetilglucosamiltransferasa que está directamente relacionada con la síntesis de factores de nodulación. Además, se ha demostrado que el estudio filogenético de dicho gen se emplea para el estudio de las distintas biovariedades dentro del género *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 2001). A pesar de su importancia durante el desarrollo simbiótico, se han descrito especies de *Rhizobium* aisladas de nichos diferentes al típico nódulo de leguminosas, que no presenta dicha habilidad como *Rhizobium petrolearium* (Zhang *et al.*, 2012). Estos datos nos podrían estar indicando que la ausencia de genes nodulación o de parte de ellos, debido a la adaptación a nuevos nichos o ambientes, dónde los genes simbióticos no son necesarios para su supervivencia, ya que García Fraile *et al.*, (2007) describieron la presencia del gen *nodD* un activador transcripcional.



# Capítulo II

**Estudio del genoma de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de  
*Rhizobium cellulosilyticum***





Gracias al desarrollo de la bioinformática, hoy en día, disponemos de una gran multitud de herramientas y recursos que nos han permitido explorar de un modo más profundo y detallado las singularidades génicas de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Este capítulo está dedicado al análisis *in silico* de los potenciales genes relacionados con su capacidad como bacteria PGPR, así como genes implicados en la colonización, infección y nodulación.

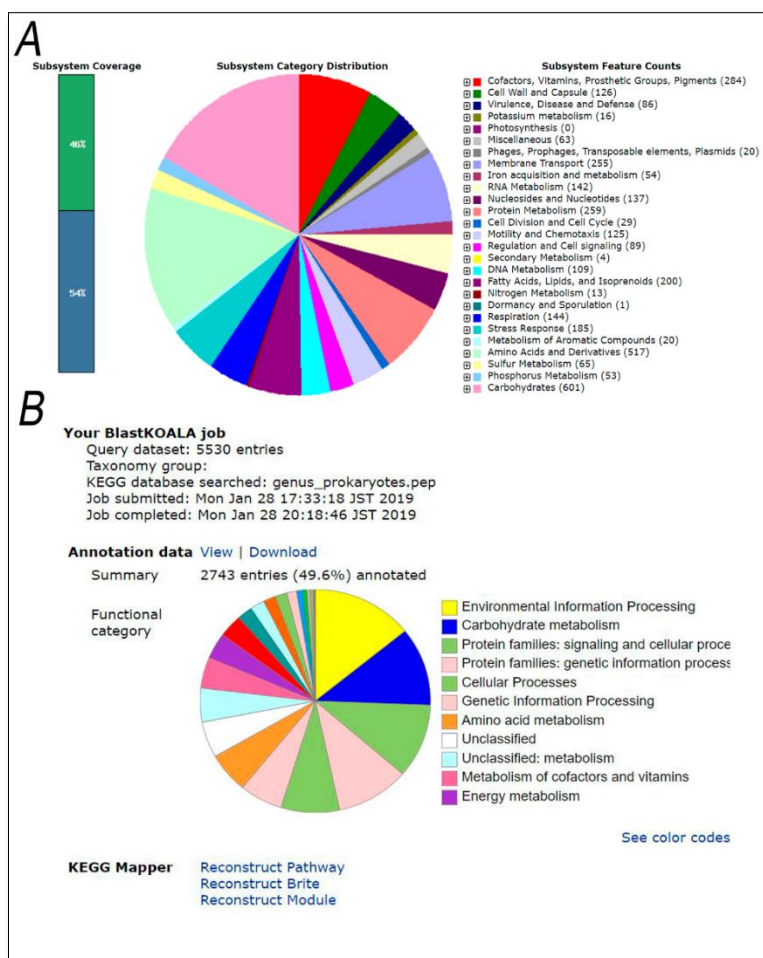
## 1. Descripción general del genoma.

El genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> tiene 5.764.075 pares de bases repartidos en 37 contigs y un contenido G+C del 58.9% (Tabla 34).

**Tabla 34.** Características generales que se obtuvieron del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Características	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup>
Tamaño (bp)	5.764.075
Número de contigs	37
Contenido G+C (%)	58.9
Número de CDSs	5530
rRNAs	61

Uno de los grandes desafíos de la era genómica es la anotación de los genes con el fin de poder asignar una función biológica a una determinada secuencia de ADN. Por ello, la anotación debe ser lo más exacta posible. En nuestro análisis *in silico*, decidimos emplear dos plataformas para la anotación de las secuencias nucleotídicas. Una de ellas fue la plataforma RAST que emplea, como base de datos SEED viewer, proporcionando una representación gráfica de las funciones predichas, clasificando a los genes en grupos funcionales o subsistemas. En la (Figura 36, A) se puede observar que, el 46% de los genes fueron asignados a un determinado subsistema, mientras que el 54% restante no fue clasificado dentro de ninguno. En referencia a la plataforma BlastKOALA también proporciona una representación gráfica de las anotaciones realizadas llevadas a cabo. En nuestro caso, el 49,6% de los genes fueron asignados dentro de alguna categoría predicha por BlastKOALA (Figura 36, B). Ambas herramientas de anotación realizan sus búsquedas en bases de datos no redundantes, empleando diferentes algoritmos. BlastKOALA proporciona información sobre la presencia de genes ortólogos asignándoles un código KO en función de su propia base de datos de KEGG (Kanehisa *et al.*, 2016). Mientras que la herramienta RAST proporciona más información sobre la presencia de genes no codificantes (Overbeek *et al.*, 2014).



**Figura 36.** Diagramas obtenidos tras la anotación automática. A, mediante RAST del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Las barras ubicadas en el lado izquierdo representan los genes asignados dentro de un subsistema (color verde) y los no asignados (color azul). El diagrama representa diferentes categorías de las anotaciones realizadas (representado en diferentes colores) B, mediante BlastKOALA, el diagrama dividido en diferentes colores, cada uno de ellos se engloba en una categoría conforma a la leyenda.

Estos resultados, nos ponen de manifiesto que, no todos los genes secuenciados se han anotado de manera automática. Por ello, para evitar la pérdida de información, así como obtener una mayor información que nos permita comprender el comportamiento de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, la búsqueda y anotación de genes de interés para la presente tesis doctoral se realizó de manera manual.

## 2. Análisis del potencial CAZome.

Los carbohidratos junto con los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, constituyen uno de los biopolímeros más abundantes dentro de una célula (Zhang *et al.*, 2018). La síntesis de azúcares o carbohidratos, así como la degradación de estos, es llevada a cabo por la acción de diferentes enzimas, denominadas enzimas activas de carbohidratos CAZy (por sus siglas en inglés “*Carbohydrate Active Enzyme*”), englobadas dentro de la clasificación denominada CAZy. Esta

base de datos divide a este tipo de enzimas en 6 clases (Tabla 35) diferentes y se puede consultar de manera online (<http://www.cazy.org/Welcome-to-the-Carbohydrate-Active.html>).

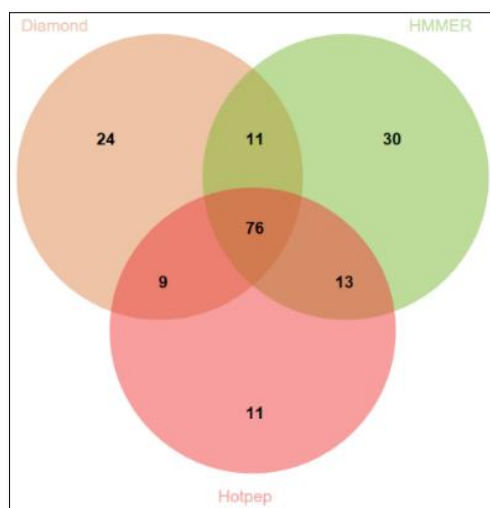
**Tabla 35.** Clasificación de las diferentes enzimas activas de carbohidratos de la base de datos (CAZy).

CAZyme	Función
(GTs): glucosiltransferasas	Involucradas en la transferencia de residuos de glucosa.
(GHs): glicosil hidrolasas	Catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono.
(PLs): liasas de polisacáridos	Escinden cadenas de polisacáridos que contiene ácido urónico a través de un mecanismo de eliminación $\beta$ para generar un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor.
(CEs): esterasas de carbohidratos	Catalizan la hidrólisis de ésteres. Debido a que los ésteres están formados por un ácido más un alcohol, se consideran dos tipos de sustratos, aquellos en los que el azúcar se comporta como ácido y en los que se comporta como alcohol.
(AAs): enzimas auxiliares	Enzimas ligninolíticas involucradas en la descomposición de la lignina.
(CBM): módulos de unión a carbohidratos	Secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima activa de carbohidratos con un pliegue discreto que tiene actividad de unión a carbohidratos.

Con el objetivo de analizar las putativas CAZymes (denominadas en su conjunto CAZome) de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, se empleó el servidor de anotación y base de datos dbCAN2 (de su siglas en inglés “ DataBase for automated Carbohydrate-active enzyme ANotation”) fundada por el Centro de Ciencias Bioenergéticas de DOE (BioEnergy Science Center of the DOE) (Yin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018) disponible de manera online (<http://cys.bios.niu.edu/dbCAN2/index.php>). Este servidor emplea 3 herramientas diferentes que son:

- HMMER la búsqueda se realiza enfrentado las secuencias con la base de datos dbCAN.
- DIAMOND blast la búsqueda se realiza frente a la base de datos de CAZy.
- Hotpep que realiza la búsqueda en la base de datos PPR (de sus siglas en inglés “Peptide Pattern Recognition”).

Una vez realizada la búsqueda, el servidor nos proporciona un diagrama de Ven en el que se pueden observar datos coincidentes entre las tres herramientas (Figura 37).



**Figura 37.** Diagrama de Venn en el que se muestran los datos obtenidos por cada una de las herramientas empleadas, así como los datos coincidentes entre ellas.

Sólo aquellos datos que coincidían o eran comunes en al menos dos herramientas bioinformáticas, se tomaron en cuenta para un análisis más detallado (Zhang *et al.*, 2018). En la Figura 38 se pueden observar de una manera resumida, los datos obtenidos tras el análisis bioinformático llevado a cabo con el servidor dbCAN2. Los resultados nos pusieron de manifiesto, que las CAZymes más abundantes fueron la familia de las GHs con un total del 41,2%, seguido de la familia d GTs correspondiéndose al 40,7% del CAZome, seguidas de la familia CMBs con un 7,4%, las familias de las AAs con un 4,6%, CEs con una representación del 3,6% respectivamente, y finalmente la familia PLs con un 1,8% del total de las enzimas estudiadas.

Otra de las herramientas que disponemos en CAZy, es la consulta del CAZome de virus, arqueas, eucariotas y procariotas. En nuestro estudio, consultamos el referente a bacterias y más concretamente a las especies bacterianas del género *Rhizobium* y *Neorhizobium*. En el genoma de ALA10B2<sup>T</sup> se predijeron 6 CBMs y 44 GHs, CAZymes involucradas con la hidrólisis de enlaces glucosídicos, y módulos de unión a carbohidratos que son muy importantes para la degradación de los polisacáridos complejos que conforman la pared celular vegetal (Lynd *et al.*, 2005). Los resultados anotados en RAST fueron 2 GH relacionadas con la familia 25 y de función desconocida. En el caso de BlastKOALA el número de glicosil hidrolasas anotadas fue de 38 con sus respectivas funciones y código KO.

Los datos obtenidos de dbCAN2 mostraron que los CBMs correspondientes a la familia 48 y 50, son módulos de unión para diferentes amilasas y a quitinas o peptidoglicano, respectivamente, y que parecen estar ampliamente distribuidos entre las especies del género *Rhizobium* y *Neorhizobium*. Sin embargo, la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, además de presentar estas dos familias, también presentó familias relacionadas con módulos de unión a xilanasas. En cuanto a las GHs anotadas, se observó que ninguna de ellas pertenecía a la familia 8, a la que pertenece la celulasa simbiótica CelC2 (Robledo *et al.*, 2008). No obstante, se predijeron otras celulasas como las pertenecientes a la familia GH5 y GH25 relacionadas como putativas celulasas hidrolasas de las especies bacterianas *Ensifer meliloti* 1021, *Mesorhizobium loti* MAFF33099 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Robledo *et al.*, 2008). La familia de las GHs 16 está relacionada con la formación de la fracción de bajo peso molecular del succinoglicano en



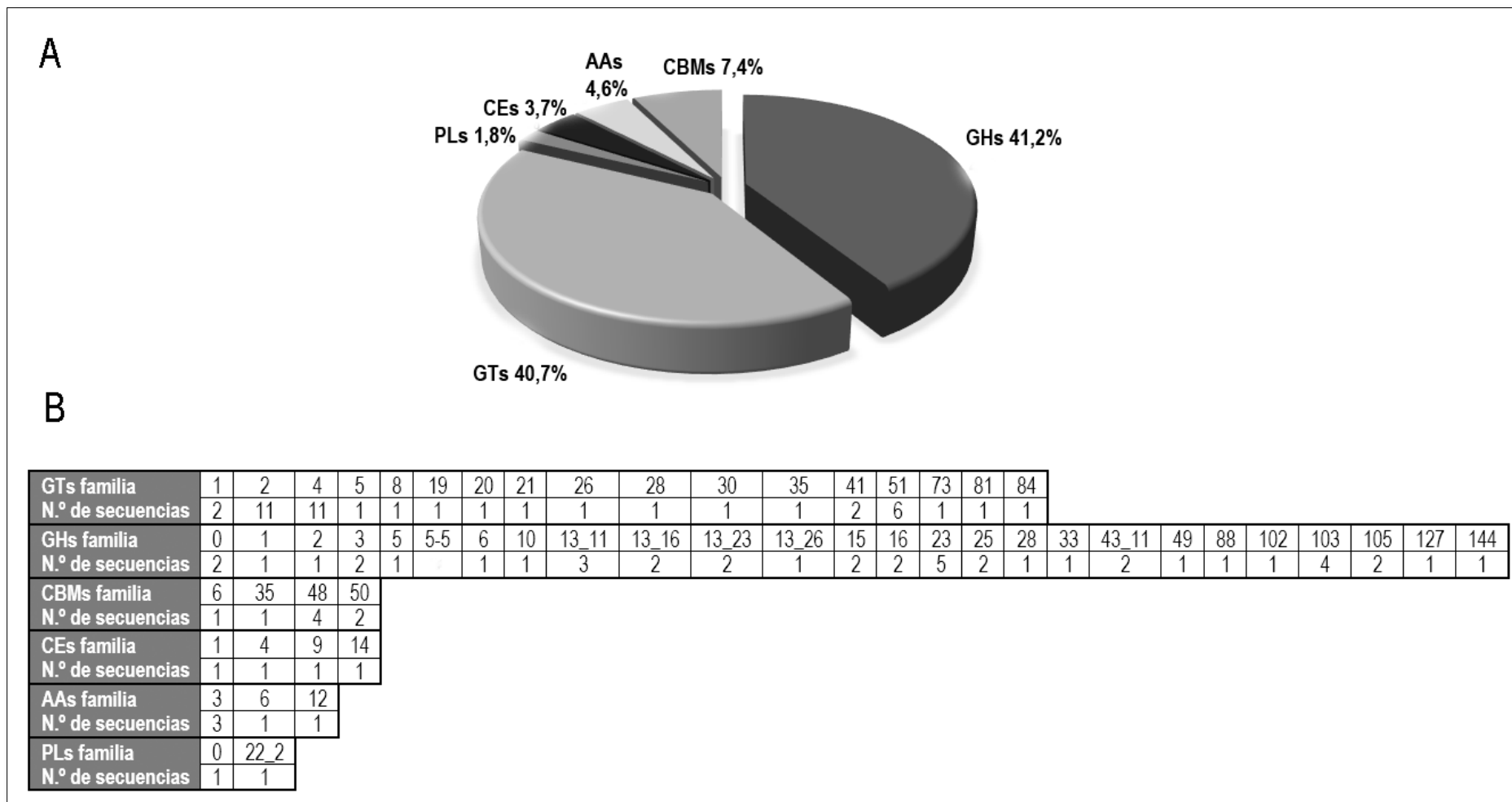
*Rhizobium* sp. strain NGR234 (Staehelin *et al.*, 2006). En cuanto al resto de GHs predichas, todas ellas parecen ser comunes dentro de las especies del género *Rhizobium* y presentan actividades tales como  $\beta$ -galactosidase, quitinasas, lisozima, poligalactorunasa, etc.

Por otra parte, se predijeron 5 AAs, relacionadas con actividad oxidorreductasa (AAs-3), 1-4 benzoquinone reductasa (AAs-6) y glucosa deshidrogenasa (AAs-12). A pesar de que, este tipo de enzimas auxiliares no se han descrito en los CAZome del género *Rhizobium* y *Neorhizobium* disponibles en CAZy, sí se han encontrado en la literatura rizobacterias con actividad glucosa deshidrogenasa y oxidorreductasa (Iyer *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2017). En cuanto a las plataformas de anotación automática empleadas, no se encontraron genes o proteínas catalogadas como enzimas auxiliares.

En cuanto, a la predicción de esterasas de carbohidratos (CEs), las familias predichas en la cepa ALA10B2<sup>T</sup> son comunes a los CAZomes existentes en la plataforma de CAZy. Asimismo, las liasas de polisacáridos (LPs) de la familia 22-2 también son comunes, aunque entre cepas de la misma especie difieren por ausencia y presencia como ocurre en el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* CB782 y *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* WSM1689, respectivamente. Del mismo modo que el caso anterior, en cuanto a las plataformas de anotación automática empleadas, no se encontraron genes o proteínas catalogadas como esterasas de carbohidratos y liasas de polisacáridos.

Otra de las familias más abundantes fueron aquellas CAZymes predichas con función glicosil transferasa, en total se predijeron 44 tipos. Los resultados anotados en RAST fueron 13 GTs pertenecientes a la familia 1 y 2 siendo el número respectivamente 8 y 2 genes, y el resto sin una familia definida. En el caso de BlastKOALA se anotaron 28 enzimas distintas cada una de ellas relacionada con una determinada actividad enzimática como la formación de celulosa, succinoglucano, almidón sintasa, etc. Las GTs más abundantes en la cepa de ALA10B2<sup>T</sup> fueron aquellas pertenecientes a la familia 2. Estas enzimas están relacionadas con la transferencia de azúcares de nucleótido-difosfato a sustratos como polisacáridos y lípidos estando englobadas como celulosa sintasa (E.C.2.4.1.12), quitina sintasa (E.C.2.4.1.16), N-acetilgalactosaminiltransferasa (E.C.2.4.1.-), etc. No obstante, el análisis correspondiente a las enzimas relacionadas con la formación de celulosa bacteriana y/o polisacáridos necesarios para la colonización bacteriana se abordará de un modo más amplio en el apartado 3.6.

Cabe destacar que, hasta la fecha, no hay ningún genoma disponible de la especie bacteriana *Rhizobium cellulosilyticum* y más específicamente de la cepa tipo ALA10B2<sup>T</sup>. Por ello, es necesario emplear diferentes herramientas bioinformáticas para poder obtener una información o visión más amplia y específica del genoma de esta cepa. Es por ello, que este trabajo aporta nueva información sobre las interacciones de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> con las plantas estudiadas en esta tesis doctoral.



**Figura 38.** Resultados obtenidos del servidor dbCAN. A) representación gráfica de las diferentes CAzymes predichas. B) Número de secuencias asignadas a cada categoría de Cazyme. GTs (glucosiltransferasas), GHs (Glicosilhidrolasas), PLs (liasas de polisacáridos), CEs (esterasas de carbohidratos), AAs (enzimas auxiliares), CBM (módulos de unión a carbohidratos).

### 3. Minería de genes promotores del crecimiento vegetal y simbióticos.

Para evaluar el potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal, se realizó una minería de genes relacionados con los mecanismos inherentes a dichas bacterias. Además, se realizó un análisis de los dominios y motivos proteicos empleando 3 herramientas bioinformáticas distintas que fueron InterProScan, el servidor del NCBI The CD (de sus siglas en inglés “Conserved Domain”) y el servidor Motif Scan. A continuación, se detallan en subapartados aquellos genes encontrados en la anotación del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> relacionados con los mecanismos directo e indirectos inherentes a este tipo de bacterias.

#### 3.1. Búsqueda de genes relacionados con la regulación del crecimiento vegetal.

Los reguladores del crecimiento vegetal también denominados hormonas vegetales, son moléculas fitoestimuladoras sintetizadas por las plantas capaces de modular y/o alterar procesos bioquímicos, fisiológicos e incluso morfológicos de las plantas. Estos reguladores son fitohormonas como etileno, giberelinas, citoquinonas, ácido abscísico y auxinas (Singh 2018).

Las bacterias PGPR incrementan el desarrollo vegetal a través de la síntesis de este tipo de fitohormonas, denominándose fitohormonas producidas por bacterias, o mediante la modulación de los niveles de éstas (Glick 2012; Nehra and Choudhary 2015). A pesar de las numerosas publicaciones que existen sobre esta capacidad, muchos de sus mecanismos de síntesis están aún siendo estudiados a nivel genético.

El etileno, es una hormona vegetal involucrada en la maduración de los frutos y abscisión de las hojas (Vejan *et al.*, 2016). Sin embargo, altas concentraciones de etileno bajo diferentes estreses ambientales como la salinidad, contribuyen a la senescencia prematura, así como a la inhibición de la elongación radicular como la fijación biológica del nitrógeno durante el desarrollo simbiótico (Dobbelaere *et al.*, 2003; Lohar *et al.*, 2009). Algunas bacterias PGPRs son capaces de disminuir la concentración de etileno gracias a la expresión del gen *acdS* que codifica para una desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o ACC desaminasa cuyo substrato es el precursor del etileno. El efecto de esta enzima en el desarrollo vegetal, ha sido ampliamente documentado (Glick *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 2013; Maheshwari *et al.*, 2015; Heydarian *et al.*, 2018). Las predicciones automáticas de ambas plataformas no predijeron la presencia de este gen en el borrador del genoma de ALA10B2<sup>T</sup>, coincidiendo con los resultados obtenidos en el capítulo I.

Las giberelinas (GA) están relacionadas con la inducción floral, desarrollo de las flores y frutos, siendo su efecto fisiológico más importante el alargamiento de los brotes (Bottini *et al.*, 2004). La biosíntesis bacteriana de GA no está muy estudiada, pero desde hace décadas se ha aceptado debido a la presencia de un operón o cluster de genes compuesto por el gen IDS que codifica para una isopreno sintasa junto con una o varias diterpeno ciclasas (CYPs) (Nett *et al.*, 2017). A pesar de que, este putativo operón se ha encontrado en bacterias pertenecientes al orden de los rizobiales como *Bradyrhizobium japonicum* (Méndez *et al.*, 2014), *Ensifer fredii* NGR234,

*Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 y *Rhizobium etli* CFN42 (Hershey *et al.*, 2014), no se ha localizado en el borrador del genoma de ALA10B2<sup>T</sup>.

Otras hormonas vegetales, son las citoquinonas que están involucradas en la estimulación y división celular de la planta, diferenciación vascular e inducción de la proliferación de pelos radiculares, pero inhiben la formación de la raíz lateral y el alargamiento primario de la raíz (Aloni *et al.*, 2006). La producción de dihidrozeatina, una clase de citoquinona isoprenoide, se ha documentado por bacterias PGPR tales como *Pseudomonas fluorescens* (García de Salamone *et al.*, 2001) y *Bacillus subtilis* (Liu *et al.*, 2013). Del mismo modo que en los casos anteriores, no se ha localizado la presencia de genes en el borrador genómico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>.

El ácido abscísico (ABA) está relacionado con la respuesta vegetal a diferentes estreses ambientales tales como la sequía, frío, salinidad (Zeevaart and Creelman 1988; Peña-Cortés *et al.*, 1989; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000; Nambara and Marion-Poll 2005). La síntesis de ABA por bacterias PGPR está muy poco documentada, se ha propuesto que su síntesis es un producto derivado del catabolismo de carotenoides (Cohen *et al.*, 2015). Tampoco se han localizado genes relacionados con esta vía metabólica que pudieran estar relacionados con la síntesis de ABA en ALA10B2<sup>T</sup>.

Por otra parte, el ácido indolacético (IAA) es una fitohormona dentro de la clase de las auxinas sintetizada por plantas, hongos y bacterias (Li *et al.*, 2018). El IAA está involucrado en el desarrollo vegetal, ya que tiene una gran influencia en la división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo, respuesta defensiva y formación del xilema y de la raíz (Leveau and Lindow 2005; Santner *et al.*, 2009).

La biosíntesis bacteriana de este tipo de fitohormona, se ha descrito tanto en bacterias promotoras del crecimiento vegetal como en bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium* sp y *Pseudomonas savastoni* pv *savastoni* causantes de tumores y agallas respectivamente, causando retrasos en el crecimiento, susceptibilidad a enfermedades e incluso la muerte (Parsons *et al.*, 2015). De un modo más detallado, se han descrito 5 vías metabólicas presentes en bacterias que son dependientes de triptófano (Figura 39). Estas vías son, la ruta de la triptamina (TAM) presente en bacterias y plantas (Jiao Nimaichand *et al.*, 2018), la ruta de la oxidasa de cadena lateral de triptófano (TSO) identificada solamente en *Pseudomonas fluorescens* CHAo (Oberhansli *et al.*, 1991), ruta del Indol-3-acético (IAN) principalmente estudiada en plantas, aunque se han descrito en algunas bacterias (Spaepen *et al.*, 2007a), la ruta del indol-3-acetamida (IAM) y la ruta del indol-3-piruvato (IPA), siendo estas dos últimas las más comunes en bacterias y las más estudiadas a nivel genético (Lin and Xu 2013).

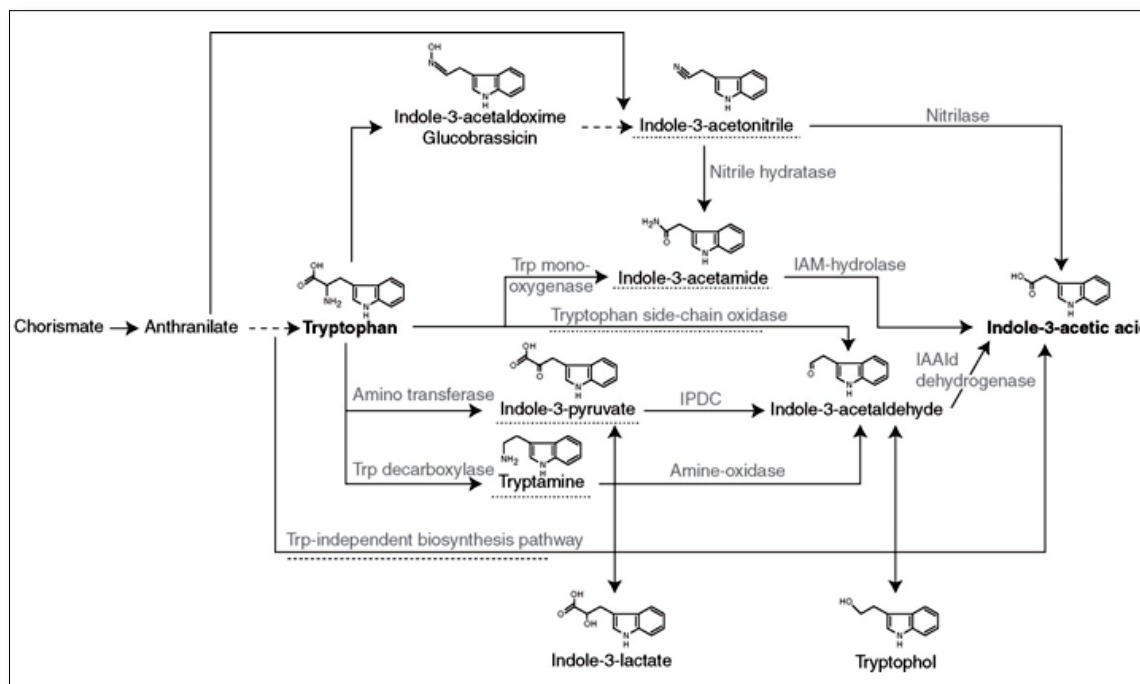


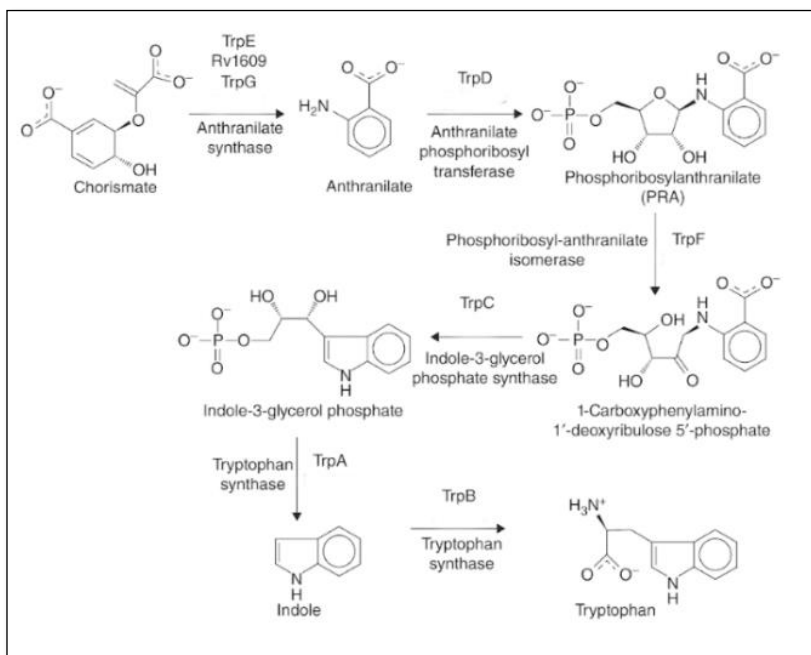
Figura 39. Esquemas de las rutas metabólicas de producción de IAA en bacterias. Adaptada de (Li *et al.*, 2018)

La ruta IAM es la vía metabólica más común en bacterias fitopatógenas, cuya virulencia está relacionada con la alta producción de esta fitohormona (Jameson 2000; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). En esta ruta, el triptófano se convierte en IAA mediante la acción de los genes *iaaM* e *iaaH* que codifican para una triptófano-2-monooxigenasa y un indol acetamida hidrolasa, respectivamente. Ambos genes se han descrito en patógenos como *Ralstonia solanaceum* (Salanoubat *et al.*, 2002), *Erwinia chrysanthemi* 3937 (Yang *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios recientes, han identificado éstas en endófitos bacterianos como *Streptomyces* sp. En-1 (Lin and Xu 2013). Como resultado del análisis genómico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, no encontramos ninguno de los genes relacionados con este tipo de ruta metabólica.

En cuanto a la ruta del indol-3-piruvato (IPyA) es la más común en la biosíntesis de IAA en plantas y se ha identificado en bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas agglomerans*, cianobacterias y bacterias PGPR pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Spaepen and Vanderleyden 2011). Esta conversión metabólica se realiza en 3 etapas; la primera reacción es llevada a cabo por una aminotransferasa que transforma el triptófano en indol-3-pirúvico, seguido de la descarboxilación de este por la enzima IPDC, la última etapa se caracteriza por una oxidación llevada a cabo por la enzima IAAld deshidrogenasa.

Cabe destacar que en el borrador genómico de ALA10B2<sup>T</sup> no hemos encontrado ningún gen involucrado en la ruta IPA. Sin embargo, durante el análisis *in silico* encontramos un gen regulador denominado *rpoN* que codifica para un factor  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa (Tabla 36). Esta subunidad juega un papel crucial en la regulación de la expresión génica mediante el reconocimiento de promotores específicos e iniciando la transcripción (Leang *et al.*, 2009). Asimismo, se ha descrito su importancia en la regulación de genes relacionados con la asimilación de nitrógeno en *Escherichia coli*, la biosíntesis de flagelos en *Pseudomonas aeruginosa*, el metabolismo del carbono en *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes*, así como en la biosíntesis de IAA en *Azospirillum* mediante la ruta IPA (Broek *et al.*, 2005; Spaepen and Vanderleyden 2011).

Además, se realizó una búsqueda de genes relacionados con la síntesis de triptófano, encontrándose un conjunto o cluster de genes (Tabla 36). El triptófano es un aminoácido proteinogénico, precursor de un largo número de moléculas de origen bacteriano (Alkhalaf and Ryan 2015), siendo una de ellas la producción de IAA (Merino *et al.*, 2008; Lambrecht and Downs 2013; Li *et al.*, 2018). En la biosíntesis de triptófano intervienen diferentes genes pertenecientes al operón *Trp* (Figura 40). En el genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> se predijeron 6 genes involucrados en dicha ruta y en ambas plataformas de anotación automática.



**Figura 40.** Esquema de las diferentes etapas involucradas en la biosíntesis de triptófano en bacterias. Adaptada de (Spaepen *et al.* 2007a).

Es importante destacar, que el borrador genómico del que disponemos no es un borrador completo ni cerrado. Por ello, la falta de datos genómicos no podemos concluir la no presencia de los genes no encontrados. No obstante, en el caso de la producción de IAA, podemos determinar que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* es capaz de sintetizar IAA, muy probablemente a través de la ruta dependiente de triptófano IPA, no sólo por las evidencias *in silico* encontradas en este capítulo, sino también por los datos obtenidos en el capítulo I (sección 1).

**Tabla 36.** Análisis de los genes implicados en la producción de ácido indolacético anotadas *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma		Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
190493	192031	RNA polymerase sigma-54 factor <i>rpoN</i>	RNA polymerase sigma-54 factor RpoN (K03092)	RNA polymerase sigma-54 factor core binding domain (IPR007046)	Sigma-54 factorsfamily profile	RNA polimerase sigma-54 factor (PRK05932)
179624	180442	Indole-3-glycerol phosphate synthase (EC 4.1.1.48)	Indole-3-glycerol phosphate synthase [EC:4.1.1.48] <i>trpC</i> (K01609)	Indole-3-glycerol phosphate synthase (EC 4.1.1.48) (IPR013798)	TrpC Indole-3-glycerol phosphate synthase	Indole-3-glycerol phosphate synthase TrpC (PRK00278)
589700	587511	Anthranilate synthase, amidotransferase component (EC 4.1.3.27)	Anthranilate synthase [EC:4.1.3.27] <i>trpEG</i> (K13503)	Anthranilate synthase, N terminal (IPR006805)	Anthranilate synthase	Anthranilate synthase (PRK13566)
178603	179619	Anthranilate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18)	TrpD; anthranilate phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.18] (K00766)	GT3 (IPR00312)	GT3	Anthranilate phosphoribosyltransferase TrpD (PRK00188)
45996	45340	Phosphoribosylanthranilate isomerase (EC 5.3.1.24)	TrpF; phosphoribosylanthranilate isomerase [EC:5.3.1.24] (K01817)	N-(5' phosphoribosyl) anthranilate isomerase <i>trpF</i> (IPR001240)	N-(5' phosphoribosyl) anthranilate isomerase <i>trpF</i>	Phosphoribosylanthranilate isomerase (PRK01222)
44093	43266	Tryptophan synthase alpha chain (EC 4.2.1.20)	TrpA; tryptophan synthase alpha chain [EC:4.2.1.20] (K01695)	Tryptophan synthase alpha chain (IPR002028)	Tryptophan synthase alpha chain <i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain TrpA (PRK1311)
45328	44108	Tryptophan synthase beta chain (EC 4.2.1.20)	TrpB; tryptophan synthase beta chain [EC:4.2.1.20] (K01696)	Tryptophan synthase beta chain (IPR02326)	Tryptophan synthase beta chain	Tryptophan synthase subunit beta (PRK04346)

### 3.2. Búsqueda de genes relacionados con la producción de sideróforos.

El hierro (Fe) es un elemento esencial para el crecimiento de la mayoría de los organismos vivos, ya que actúa como cofactor de numerosas reacciones enzimáticas como síntesis de ADN y ARN, transferencia de electrones y en el metabolismo del oxígeno (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). A pesar de que el hierro es el cuarto metal más abundante en el suelo, su solubilidad es muy baja a pH fisiológico y ambientes aeróbicos, ya que la presencia de oxígeno, oxida rápidamente el hierro (II) a oxihidróxidos férricos insolubles (Schalk and Guillon 2013). Bajo estas circunstancias, en las que la disponibilidad del hierro es muy baja, tanto las plantas como los microorganismos han desarrollado estrategias para solventar este problema gracias a la producción de sideróforos (Ahmed and Holmström 2014a).

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que no sólo contribuyen al desarrollo de los microorganismos y plantas, sino que además de capturar el hierro disponible, forman complejos con otros elementos esenciales (Mo, Mn, Co y Ni) haciéndoles biodisponibles (Bellenger *et al.*, 2008; Braud *et al.*, 2009b, a). La explotación biotecnológica más importante de los sideróforos que producen las bacterias PGPR en la región de la rizosfera donde proporcionan nutrición de hierro a la planta, sirve de primera barrera para microorganismos patógenos y ayuda a eliminar metales tóxicos del suelo, es decir que, estos sideróforos actúan como agentes de biocontrol, lo que se traduce en una mayor producción agrícola (Sayyed *et al.*, 2013).

Un factor clave para regular la disponibilidad intracelular del hierro, es la acción de varios sistemas de absorción de hierro. Existen muchos sistemas de transporte de hierro bacteriano para satisfacer las demandas de hierro (Lau *et al.*, 2016). Los sideróforos bacterianos pueden ser catecolatos (enterobactina), carboxilatos (como la rizobactina) e hidroxamatos (ferroxamina) (Winkelmann 2017). Sin embargo, hay otros sideróforos que contienen una mezcla de los principales grupos funcionales, siendo un ejemplo de ello la pioverdina (Cornelis 2010).

Los sistemas automáticos de anotación RAST y BlastKOALA identificaron 11 genes diferentes relacionados con el metabolismo y el transporte del hierro (Tabla 37). La cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* presentó homología con genes relacionados en el mecanismo de transportadores dependientes de TonB. Este sistema, es el mecanismo de transporte más común en bacterias Gram-negativas para el hierro férrico (Fe<sup>3+</sup>) (Sajeed Ali and Vidhale 2013). Una vez que, el sideróforo se une al receptor de la membrana externa denominado complejo TonB-ExbB-ExbD ubicado en la membrana citoplasmática, la captación posterior se realiza a través de un sistema transportador de casete de unión a ATP (ABC) (Ahmed and Holmström 2014b) también identificados en el genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Por otro lado, se ha identificado dentro del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, genes relacionados con el cluster génico de captación de hidroxamato férrico (*Fhu*). Este sistema está bien documentado en *Escherichia coli*, donde la región *Fhu* está compuesta por cuatro genes *FhuA*, *FhuB*, *FhuC* y *FhuD* (Braun and Braun 2002; Ouyang and Isaacson 2006). Además, se ha descrito la presencia de este operón tanto en bacterias patógenas tales como *Yersinia pestis* (Forman *et al.*, 2019), *Edwardsiella ictaluri* (Hossam Abdelhamed, Jingjun Lu 2016), así como en cepas bacterianas pertenecientes al orden de los Rhizobiales como *Rhizobium leguminosarum* (Stevens *et al.*, 1999) y *Mesorhizobium* R88R (Carlton *et al.*, 2007).



**Tabla 37.** Análisis de los genes implicados en la producción de sideróforos anotadas *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma		Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
311127	313313	<i>TonB</i> -dependent siderophore receptor	TC.FEV.OM1; outer-membrane receptor for ferric coprogen and ferric-rhodotorulic acid (K16088)	TonB-dependent transporters are bacterial outer membrane proteins that bind and transport ferric chelates (IPR003538)	TonB-dependent receptor	TroA-like domain. These proteins have been shown to function in the ABC transport of ferric siderophores (cl0062)
502655	503608	Iron siderophore sensor protein	FecR; transmembrane sensor (K07165)	A transmembrane signal transduction protein involved in Fe <sup>2+</sup> dicitrate sensing (IPR032623)	FecR protein	FecR family protein (COG3712)
65812	66624	Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), ATP-binding protein <i>fhuC</i>	ABC.FEV.A; iron complex transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.34] (K02013)	ABC transporters belong to the ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily, which uses the hydrolysis of ATP to energise diverse biological systems. (IPR017871)	ATP binding cassette, ABC transporter-type domain profile	ATPasses (cl28181)
66637	67521	Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), periplasmic substrate binding protein <i>fhuD</i>	ABC.FEV.S; iron complex transport system substrate-binding protein (K02016)	Transportadores de casete de unión de ATP (ABC)	Iron siderophore periplasmic-binding domain profile	TroA-like domain. These proteins have been shown to function in the ABC transport of ferric siderophores (cl0062)
67518	69485	Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), permease component <i>fhuB</i>	ABC.FEV.P; iron complex transport system permease protein (K02015)	FecC and FecD are components of of the fec operon, a Periplasmic-Binding-Protein (PBP)-dependent transport system for ferric dicitrate (IPR000522)	FecCD transport family	Iron ABC transporter permease (PRK10577)

Continuación Tabla 37.

Posición del genoma		Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
86458	85031	Ferric hydroxamate outer membrane receptor <i>fhuA</i>	Iron complex outer membrane receptor protein (K02014)	Subunit of the TonB-dependent receptors (IPR012910)	Plug TonB dependent receptor	Fiu superfamily (cl25796)
63645	65762	Ferrichrome-iron receptor	leuC; 3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit [EC:4.2.1.33 4.2.1.35] (K02014)	TonB protein interacts with outer membrane receptor proteins (IPR000531)	Ton B dependent receptor	Fiu Superfamily (cl25796)
308803	307784	Putative siderophore transport system permease protein	ABC.FEV.P; iron complex transport system permease protein (K02015)	FecC and FecD are components of of the fec operon, a Periplasmic-Binding-Protein (PBP)-dependent transport system for ferric dicitrate in <i>Escherichia coli</i> (IPR000522)	FecCD transport family	FecCD transport family (pfam01032)
196253	197032	ABC-type Fe <sup>3+</sup> -siderophore transport system, ATPase component	ABC.FEV.A; iron complex transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.34] (K02013)	ABC transporters belong to the ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily, which uses the hydrolysis of ATP to energise diverse biological systems. (IPR017871)	ABC transportador	ABC transporter ATP-binding protein (COG1120)
437569	438828	<i>motA/tolQ/exbB</i> proton channel family protein	ExbB; biopolymer transport protein ExbB (K03561)	TonB complex uses the proton gradient across the inner bacterial membrane to transport large molecules across the outer bacterial membrane. (IPR002898)	ExbB proton channel family (TIGR02797)	TonB. System Energizer ExbB
438833	439348	Biopolymer transport protein <i>ExbD/TolR</i>	ExbD; biopolymer transport protein ExbD (K03559)	This group of proteins are membrane bound transport proteins essential for ferric ion uptake in bacteria (IPR003400)	ExbD transport protein (cl00537)	Biopolymer transport protein ExbD/TolR

Conforme a los datos obtenidos tras el análisis *in silico* podemos deducir que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> presenta dos mecanismos de transporte del hierro relacionados con la producción de sideróforos.

### 3.3. Búsqueda de genes relacionados con la síntesis de compuestos volátiles.

Otro mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal, es la síntesis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), ya que se ha documentado su papel como agente inductor de la resistencia sistémica frente a enfermedades en *Arabidopsis thaliana* por *Paenibacillus polymyxa* (Lee *et al.*, 2012); estimular el crecimiento de las plantas como por ejemplo del tomate por *Bacillus subtilis* SYST2 (Tahir *et al.*, 2017a), así como su potencial para controlar la proliferación de microorganismos patógenos como *Ralstonia solanocentrum* (Tahir *et al.*, 2017b).

Los compuestos volátiles más estudiados son la acetoina (Zhang *et al.*, 2007) y el 2-3butanodiol, el cual se ha descrito como inductor de defensa en *Arabidopsis* (Ryu *et al.*, 2003a). El compuesto volátil 2,3-butanodiol se ha identificado en numerosas especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Aerobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Yi *et al.*, 2016). Mientras que, la acetoina es el último intermedio de síntesis para el 2,3-butanodiol (Syu 2001). Ambos compuestos proporcionan efectos beneficiosos para las plantas, como la promoción del crecimiento y la inducción de la resistencia sistémica en plantas modelo y cultivos en condiciones *in vitro* e *in situ* (Ryu *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2006; Hahm *et al.*, 2012). Los programas de anotación automática RAST y BlastKOALA identificaron 2 genes diferentes que codifican para una 2,3-butanodiol deshidrogenasa (Tabla 38). Cabe destacar que este es el primer estudio en el que se identifica este tipo de compuesto en bacterias del género *Rhizobium*. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> para inducir reacciones de defensa en las plantas.

**Tabla 38.** Análisis de los genes implicados en la producción de compuesto volátiles *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma	Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
662111 661056	2,3-butanediol dehydrogenase, R-alcohol forming, (R)- and (S)-acetoin-specific (EC 1.1.1.4)	BDH; (R,R)-butanediol dehydrogenase / meso-butanediol dehydrogenase / diacetyl reductase [EC:1.1.1.4 1.1.1.- 1.1.1.303] (K0004)	Enzymes that biosynthesise a variety of secondary metabolites using various combinations of dehydratase (IPR020843)	Zinc binding dehydrogenase	2-3-butanediol dehydrogenasae (cd08233)

Continuación Tabla 38.

Posición del genoma	Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
296553 295480	2,3-butanediol dehydrogenase, R-alcohol forming, (R)- and (S)-acetoin-specific (EC 1.1.1.4)	BDH; (R,R)-butanediol dehydrogenase / meso-butanol dehydrogenase / diacetyl reductase [EC:1.1.1.4 1.1.1.- 1.1.1.303] (K0004)	Enzymes that biosynthesise a variety of secondary metabolites using various combinations of dehydratase (IPR020843)	Zinc binding dehydrogenase	2-3-butanediol dehydrogenasae (cd08233)

### 3.4. Búsqueda de genes relacionados con la solubilización de fosfatos.

El fósforo (P) es el segundo macronutriente más importante, tras el nitrógeno para el desarrollo de las plantas. A pesar de la existencia de P en el suelos, este se encuentra en formas no absorbibles por las plantas, ya que estas lo asimilan en dos formas iónicas solubles que son la monobásica ( $H_2PO_4^-$ ) y la dibásica ( $HPO_4^{2-}$ ) (Kumar Jha and Saraf 2015). Los microorganismos solubilizadores de fosfato desempeñan un papel importante en el ámbito de la agricultura, ya que son capaces de emplear como fuente de carbono el fosforo orgánico e inorgánico, haciéndolo más soluble y viable para las plantas.

Debido a que la capacidad para solubilizar fosfato es una característica muy importante para la selección de bioinoculantes, se decidió evaluar las posibles rutas metabólicas presentes en ALA10B2T. Tras la búsqueda llevada a cabo con ambos programas de anotación automática, se identificaron 17 genes, todos ellos relacionados con la captación y solubilización del fosfato inorgánico (Pi) (Tabla 39). Por el contrario, no se predijeron genes relacionados con la liberación de ácidos orgánicos para la captación de P orgánico.

La principal forma asimilable de fósforo para las bacterias es el anión ortofosfato ( $PO_4^{3-}$ ), más conocido como fosfato inorgánico (Pi). La regulación del manejo de Pi en bacterias esta mediado por el regulador PHO que se caracterizó por primera vez en *Escherichia coli* (Wanner and Chang 1987). Este regulador a su vez, esta mediado por un sistema de transducción de señales (TCS) de dos componentes denominado PhoBR. PhoR es un sensor quinasa cuya actividad responde a la disponibilidad de fosfato. Cuando se activa, PhoR fosforila el regulador PhoB, que a su vez activa un programa de expresión génica para adaptar a las bacterias al estado limitado del fosfato (Devine 2018).

El transportador *pst*, relacionado con la adquisición de fosfato inorgánico, es uno de los miembros más conservados del regulón PHO (Baek and Lee 2006). El complejo Pst es un transportador ABC que está formado por cuatro proteínas, PstsS es una proteína de unión a fosfato inorgánico ubicada en el periplasma, PstC y PstA son proteínas integrales de membrana que

median la traslocación del fosfato inorgánico a través de la membrana interna, y PstB es un dímero que se une a ATP (Spira *et al.*, 2010). En cuanto al quinto gen *phoU*, su función es desconocida, aunque parece estar relacionado con la modulación de los niveles de proteínas de Pst (Rice *et al.*, 2009). Este operón se ha identificado en diferentes especies bacterianas tales como *Streptomyces lividans* (Diaz *et al.*, 2005), *Streptomyces coelicolor* (Fernández-Martínez *et al.*, 2012), *Bacillus subtilis* (Devine 2018), *Ensifer meliloti* (Yuan *et al.*, 2006), *Rhizobium zea* CRZM18R<sup>T</sup> y *Rhizobium leucaenae* CRZM52R (TD Celador Lera, 2017), así como en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Por otra parte, se ha descrito que, el principal mecanismo de solubilización de fosfato mineral en bacterias Gram-negativas es la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico (Miller *et al.*, 2008). Esta reacción oxidativa es catalizada por la enzima extracelular glucosa deshidrogenasa (GHD) (E.C.1.1.99.17), la cual necesita como coenzima la pirroloquinolina quinona (PQQ) (Sashidhar and Podile 2010). La enzima GHD está presente en numerosos generos bacterianos como *Rhizobium*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Gluconobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* (Sashidhar and Podile 2010), lo cual indica que esta enzima es común a la mayoría de las bacterias. Del mismo modo se identificó en la cepa ALA0B2<sup>T</sup> durante el estudio *in silico*. Sin embargo, no encontramos ningún gen codificante para el cofactor PQQ. Nuestros resultados concuerdan con lo consultado en la bibliografía, ya que hay cepas en las que se ha descrito la habilidad de sintetizar tanto la enzima GHD como el conjunto génico *pqq* siendo el caso de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (Oteino *et al.*, 2015), y otras incapaces de sintetizarlo como es el caso de *Rhizobium tropici* y *Ensifer meliloti* (Bernardelli *et al.*, 2001).

Los fosfonatos son compuestos organofosforados que presenta un enlace característico carbón -fosfóro (C-P). Estos compuestos son biogénicos, pero la liberación en cantidades ingestas en forma de herbicidas al medio ambiente supone un grave problema medio ambiental (Kononova and Nesmeyanova 2002). Muchas bacterias son capaces de emplear estos compuestos como fuente de carbono y fosforo (Quinn *et al.*, 2007). Hay tres tipos de enzimas involucradas en la degradación de estos compuestos que son, hidrolasas de fosfonato, el mecanismo oxidativo del metabolismo y el complejo de liasa C-P, siendo este último el que hemos identificado en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

La actividad de la C-P liasa en bacterias está regida por el operón *phnCDEFGHIJKLMNOP*, bajo condiciones limitantes de fosfato, este operón está regulado aguas arriba por el sistema de dos componentes *PhoR/PhoB* (Hove-Jensen *et al.*, 2014). Los productos génicos PhnC, PhnD y PhnE son transportadores de membrana, mientras que PhnG, PhnH, PhnI, PhnJ, PhnK, PhnL y PhnM son proteínas forman el conjunto catalítico para la actividad C-P liasa. Por último, las proteínas PhnN, PhnO y PhnP están relacionadas con el metabolismo de los productos intermedios (Kamat and Raushel 2013). Este operón también ha sido identificado en el genoma de ALA10B2<sup>T</sup>.

Los resultados obtenidos tras el análisis *in silico*, nos muestran que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> tiene el potencial genético involucrado en la solubilización de fosfato. Estos resultados, junto las pruebas fenotípicas descritas en el capítulo I, demuestran que las vías génicas son activas y funcionales.

**Tabla 39.** Análisis de los genes implicados en la solubilización de fosfatos *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2T mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma		Anotación RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
95112	94429	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein <i>phoB</i>	<i>phoB</i> ; two-component system, OmpR family, phosphate regulon response regulator PhoB (K01077)	PhoB-type DNA binding domain (IPR001867)	Response regulator receiver domain	YesN super family (cl26036)
95885	95142	Phosphate transport system regulatory protein <i>phoU</i>	<i>phoU</i> ; phosphate transport system protein (K02039)	PhoU domain (IPR026022)	PhoU domain	Phosphate uptake regulator PhoU (TIGR02135)
96718	95903	Phosphate transport ATP-binding protein <i>pstB</i> (TC 3.A.1.7.1)	<i>pstB</i> ; phosphate transport system ATP-binding protein [EC:7.3.2.1] (K02036)	ABC transporter-like (IPR003439)	ATP binding cassette, ABC transporter-type domain profile.	Phosphate ABC transporterATp-binding protein (PRK14235)
98047	96731	Phosphate transport system permease protein <i>pstA</i> (TC 3.A.1.7.1)	<i>pstA</i> ; phosphate transport system permease protein (K02038)	ABC transporter type 1, transmembrane domain MetI-like (IPR000515)	Binding protein dependent transport system inner membrane component	PstA ABC-type phosphate transport system (COG0581)
99528	98044	Phosphate transport system permease protein <i>pstC</i> (TC 3.A.1.7.1)	<i>pstC</i> ; phosphate transport system permease protein (K02037)	ABC transporter phosphate permease, is found the high-affinity inorganic phosphate transporter PstC from some bacterial species (IPR022182)	Binding protein dependent transport system inner membrane component	PstC ABC-type phosphate transport system (COG0573)
100727	99693	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein <i>pstS</i> (TC 3.A.1.7.1)	<i>pstS</i> ; phosphate transport system substrate-binding protein (K02040)	Members of the periplasmic binding domain superfamily (PBP) (IPR024370)	No encontrado	Periplasmic Binding protein (cl21456)
102101	100920	Phosphate regulon sensor protein <i>phoR</i> (EC 2.7.13.3)	<i>phoR</i> ; two-component system, OmpR family, phosphate regulon sensor histidine kinase PhoR [EC:2.7.13.3] (K07636)	PhoR; two-component system, OmpR family, phosphate regulon sensor histidine kinase PhoR (EC: <a href="#">2.7.13.3</a> )	Histidine kinase profile	BaeS superfamily signal transduction histidine kinase (cl27674)

Continuación Tabla 39.

Posición del genoma		Anotación RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
377131	376391	Transcriptional regulator <i>phnF</i>	<i>phnF</i> ; GntR family transcriptional regulator, phosphonate transport system regulatory protein (K02043)	<i>Bacterial regulatory proteins, gntR family</i> (IPR000524)	Transcription regulator HTH, GntR	DNA binding transcriptional regulator, GntR family (cl28325)
377215	377685	<i>phnG</i> protein	alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnG [EC:2.7.8.37] (K06166)	Phosphonate metabolism protein PhnG involved in e.coli for the uptake and breakdown of phosphonates (IPR009609)	Phosphonate metabolism protein PhnG	Phosphonate metabolism protein PhnG (pfam06754)
377685	378284	PhnH protein	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnH [EC:2.7.8.37] (K06165)	PhnH which is required for the transfer of the ribose triphosphate moiety from ATP to methyl phosphonate(IPR008772)	Bacterial phosphonate metabolism protein (PhnH)	Carbon-phosphorus lyase subunit PhnH
378304	379419	PhnI protein	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI [EC:2.7.8.37] (K06164)	phosphonate metabolism protein (PhnI) (IPR008773)	Bacterial phosphonate metabolism protein (PhnI)	Bacterial phosphonate metabolism protein (PhnI) (cl01456)
379416	380300	PhnJ protein	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P lyase [EC:4.7.1.1] (K06163)	PhnJ protein (IPR010306)	Phosphonate metabolism protein PhnJ	Bacterial phosphonate metabolism protein (PhnJ) (COG3627)
380297	381073	Phosphonates transport ATP-binding protein PhnK	Putative phosphonate transport system ATP-binding protein, PhnK (K05781)	ABC transporters belong to the ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily (IPR003439)	ABC transporter system	PhnK (PRK11701)
381083	381793	Phosphonates transport ATP-binding protein PhnL	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnL [EC:2.7.8.37] (K05780)	ABC transporters belong to the ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily (IPR003439)	ABC transporter system	AAA superfamily (cl28181)

Continuación Tabla 39.

Posición del genoma		Anotación RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
384403	385416	Phosphonate ABC transporter permease protein phnE2 (TC 3.A.1.9.1)	Phosphonate transport system permease protein (K02042)	ABC transporters belong to the ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily (IPR003439)	Binding-protein-dependent transport system inner membrane component	ABC transporter system PhnE (COG3639)
388733	389341	ATP-binding protein PhnN	Ribose 1,5-bisphosphokinase [EC:2.7.4.23] (K05774)	L type calcium channel beta subunit (IPR008145)	No encontrado	NK superfamily (cl17190)
673876	673598	PhnO protein	Uncharacterized protein (K06975)	Gcn5-related N-acetyltransferases (GNAT), at use acetyl coenzyme A (CoA) to transfer an acetyl group to a substrate (IPR031165)	No encontrado	N-acetyltransferase



### 3.5. Búsqueda de genes relacionados con la nodulación y fijación de nitrógeno.

Como respuesta a los flavonoides secretados por las plantas leguminosas, las bacterias del género *Rhizobium* sintetizan unas moléculas específicas y clave del desarrollo simbiótico que son los factores de nodulación (FN) o lipo-quitto-oligosacáridos (LCOs) responsables de la división de las células corticales para la formación del primordio nodular (Ibáñez and Fabra 2011).

En la biosíntesis de los factores de nodulación intervienen diferentes proteínas siendo los productos génicos NodA, NodB y NodC cruciales en la síntesis de la estructura básica de los LCOs (Robledo *et al.*, 2011). En cuanto a su organización, los genes de nodulación (*nod*) están agrupados en operones como el operón *nodABCDIJ*. La proteína NodD, es un regulador transcripcional de la familia LysR, (Schell 1993) que se une a regiones conservadas del ADN bacteriano denominado cajas de nodulación situadas en las regiones promotoras de la mayoría de los genes de nodulación (Broughton *et al.*, 2000). Los genes *nodI* y *nodJ* están relacionados con la secreción de factores de nodulación que son reconocibles por las leguminosas durante la nodulación (Aoki *et al.*, 2013).

En el borrador del genoma de ALA10B2<sup>T</sup>, por el contrario, no se localizó ningún gen que mostrará homología con los genes simbióticos implicados en la nodulación de las plantas leguminosas. Estos datos indican una posible pérdida de genes simbióticos como se postula en el capítulo I. Cabe destacar que, la cepa de, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> no es la única cepa rizobiana carente de esta maquinaria genética. En los últimos años se han descrito diferentes especies bacterianas desprovistos de genes de nodulación como *Rhizobium petrolearium* sp. nov F11 (Zhang *et al.*, 2012), *Rhizobium marinum* sp. nov (Zeng *et al.*, 2015) o *Rhizobium zeae* CRZM18<sup>T</sup> (Celador-Lera *et al.*, 2017).

Otro aspecto inherente, de las bacterias rizobiales simbióticas es su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Una vez en el nódulo, los rizobios se diferencian en bacteroides en los cuáles la expresión de la enzima nitrógenasa, codificada por el cluster *nifHDK*, y que es activada por el regulador NifA. A su vez, la transcripción de NifA está regulada aguas arriba, en condiciones microaeróbicas, por el conjunto FixL/FixJ, un TCS sensor de oxígeno (David *et al.*, 1988). En el borrador del genoma de ALA10B2<sup>T</sup>, no identificamos ningún gen relacionado con la enzima nitrógenasa. Pero, sin embargo, si encontramos el sistema de dos componentes (TCS) FixL/FixJ (Tabla 40).

**Tabla 40.** Análisis de los genes implicados en la fijación del nitrógeno *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma	Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
30214 31689	Two-component oxygen-sensor histidine kinase FixL	Uncharacterized protein (K06975)	Histidine kinase domain (IPR005467)	Histidine kinase domain	BaeS (signal trasdcuntion hsitindine kinase ) (c127674)

Continuación Tabla 40.

Posición del genoma	Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
31686 32267	Transcriptional regulatory protein fixJ	Uncharacterized protein (K06975)	Signal transduction response regulator (IPR001789)	Response regulator receiver domain	FixJ (COG4566)

### 3.6. Búsqueda de genes relacionados con la producción de polisacáridos superficiales rizobianos (PSR).

#### 3.6.1. Adhesión bacteriana.

La adhesión radicular por parte de las bacterias del género *Rhizobium*, se lleva a cabo en dos etapas. La primera, se produce una unión inicial debido a la segregación, por parte de la bacteria, de lectinas y unas proteínas inherentes a *Rhizobium* denominadas rihadhesina (“*rhizobial calcium binding surface*”). Tras este primer anclaje, se produce una fijación irreversible gracias a la acumulación de bacterias en la punta del pelo radical del huésped. Además, la producción de  $\beta$  glucanos cíclico (G $\beta$ C), exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos extracelulares y polisacáridos capsulares son clave para el establecimiento de una simbiosis exitosa (Frayse *et al.*, 2003).

En el borrador del genoma de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, se identificaron 13 genes diferentes relacionados con la maquinaria genética de anclaje típica de *Rhizobium* (Tabla 41). Los genes relacionados con la producción de celulosa bacteriana se abordarán en el apartado 3.6.2.

En cuanto a los G $\beta$ C se ha descrito su importancia tanto en el proceso de infección, swimming, como en la adaptación hipoosmótica (Breedveld1 and Milleri 1994; Gay-Fraret *et al.*, 2012). Estos polisacáridos superficiales se han descrito tanto en patógenos como *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella abortus*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* como en endosimbiontes tales como *Ensifer meliloti*, *Ensifer fredii*, *Mesorhizobium loti* siendo los genes *ndvA* y *ndvB* los responsables de su producción en los endosimbiontes (Gay-Fraret *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que una reducción en la producción de glucanos en *Mesorhizobium loti* provoca una invasión defectiva en *Lotus japonicus* (Kawaharada *et al.*, 2007).

Estos genes se han encontrado en el borrador del genoma de ALA10B2<sup>T</sup>, indicando su posible implicación en las primeras etapas del proceso simbiótico.

A pesar de los numerosos estudios sobre la función de los EPS durante la simbiosis, aún se desconoce el mecanismo por el cual los EPS son determinantes para el establecimiento de una simbiosis beneficiosa en las leguminosas (Marczak *et al.*, 2017). No obstante, el succinoglucano o EPSI y el EPSII o galactoglucano son los EPS mejor estudiado en *Ensifer meliloti* siendo, el EPSI esencial en el establecimiento de una simbiosis efectiva en *Medicago sativa* (Frayse *et al.*, 2003).

Los resultados proporcionados por ambas plataformas de anotación automática predijeron un total de 13 genes *exo* relacionados con la síntesis de succinoglucano, así como ningún gen involucrado en biosíntesis de EPSII. El gen *exoF* codifica para una proteína necesaria para la adición de residuos de glucosa al lípido. Seguidamente, las siguientes adicciones de residuos de glucosa son llevada a cabo por un complejo de glicosiltransferasas formadas por los genes *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoU*, *exoO*, *exoW*. Además, se localizó el sistema *exoX-exoY*, también involucrado en la producción de EPSI en *Ensifer meliloti* (Gray *et al.*, 1990), *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Borthakur and Johnston 1987) y *Rhizobium* sp. NGR234 (Gray *et al.*, 1990). Se trata de proteínas reguladoras, en donde se sugiere que ExoX actúa como represor en la producción de EPSI (Marczak *et al.*, 2017). Por último, se predijo la existencia del gen *exoZ* que codifica para una transferasa, mutantes en dicho gen exhibieron una reducción en la eficiencia del inicio de la elongación del canal de infección.

**Tabla 41.** Análisis de los genes implicados en la adhesión bacterina *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma		Anotación RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
259730	261517	glucan export ATP-binding/permease protein NdvA (EC 3.6.3.42)	ABCB-BAC; ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial (K06147)	ABC transporter belong to the ATP-binding cassette (ABC) sueprfamily (IPR017902)	ATP binding cassette	Glucan ABC transporter (PRK13657)
270621	262177	Cyclic beta-1,2-glucan synthase (EC 2.4.1.-)	chvB, cgs, ndvB; cyclic beta-1,2-glucan synthetase [EC:2.4.1.-] (K13688)	GH94 (IPR010383)	GH94	GH94domain cyclic $\beta$ 1-2 glucan synthesis and similar domains (COG3459)
238484	239512	surface polysaccharides/antigens	exoA; succinoglycan biosynthesis protein ExoA [EC:2.4.-.-] (K16557)	GT2 (IPR001173)	GT2	Succinglycan ExoA (cl02525)
237276	238469	surface polysaccharides/antigens	exoL; succinoglycan biosynthesis protein ExoL [EC:2.-.-.-] (K16558)	GT subfamily 4 (IPR02898)	No encontrado	GT_GTB (cl10013)
239509	240438	Glucosyl-3-phosphoglycerate synthase (EC 2.4.1.266)	exoM; succinoglycan biosynthesis protein ExoM [EC:2.4.-.-] (K16556)	GT2 (IPR001173)	GT2	GT2 (pfam00535)
240441	241391	Beta-1,3-glucosyltransferase	exoO; succinoglycan biosynthesis protein ExoO [EC:2.4.-.-] (K16555)	GT2 (IPR001173)	GT2	GT2 (pfam00535)
228369	229376	Surface polysaccharides/antigens	exoU; succinoglycan biosynthesis protein ExoU [EC:2.4.-.-] (K16564)	GT2 (IPR001173)	GT2	GT2 (pfam00535)
230427	229459	Glycosyl transferase, family 2	exoW; succinoglycan biosynthesis protein ExoW [EC:2.4.-.-] (K16562)	GT2 (IPR001173)	GT2	GT_GTA (cd00761)
661344	661880	Exopolysaccharide synthesis protein ExoD-related protein	No encontrado	Exopolysaccharide synthesis, ExoD (IPR010331)	ExoD	Exo D superfamily (cl01617)

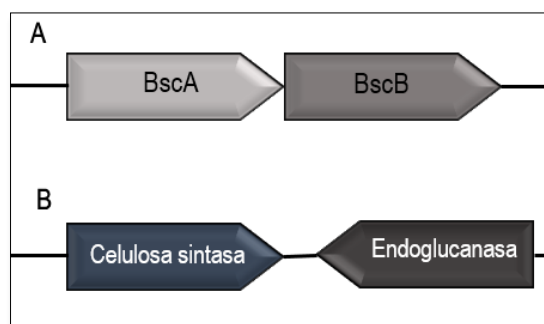
Continuación Tabla 41.

Posición del genoma		Anotación RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
857891	858946	Exopolysaccharide production protein ExoZ	Exopolysaccharide production protein ExoZ (K16568)	Acetyltransferase 3 (IPR002656)	Acetyltransferase	Acyltransferase (OafA) (COG1835)
227237	226557	Undecaprenyl-phosphate galactosephosphotransferase (EC 2.7.8.6)	Exopolysaccharide production protein ExoY (K16566)	Bacterial sugar transferase (IPR003362)	Bacterial sugar transferase	Bacterial sugar transferase (cl27431)
227964	228257	Surface polysaccharides/antigens	Exopolysaccharide production repressor protein ExoX (K16565)	Exopolysaccharide production repressor SyrA (IPR02439)	No encontrado	Exopolysaccharide production repressor SyrA (pfam11089)
868585	866414	hypothetical protein	ExoP, vpsO; polysaccharide biosynthesis transport protein (K16554)	Exopolysaccharide synthesis protein (IPR005702)	Chain length determinant protein	Tyrosine kinase (cl27519)
226473	225088	Exopolysaccharide production protein ExoF precursor	ExoF; polysaccharide biosynthesis/export protein ExoF (K16552)	Polysaccharide export protein (IPR003715)	Polysaccharide biosynthesis/export protein	Wza (periplasmic protein involved in polysaccharide protein) (COG1596)

### 3.6.7. Producción de celulosa bacteriana.

Las microfibrillas de celulosa producidas por los rizobios desempeñan un papel crucial en el proceso de anclaje a la superficie del huésped así como en la formación de biofilms (Mateos *et al.*, 1995), como lo demuestran los estudios llevados a cabo por (Downie 2010b) demostrando que la síntesis de celulosa bacteriana estimula el anclaje y la formación de biofilms en los pelos radiculares. Por ello, la búsqueda de los potenciales genes relacionados con la producción de celulosa resulta de gran interés, debido a los datos obtenidos en los ensayos de producción de celulosa *in vitro* de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Dos genes principales, están presentes en el operón de biosíntesis de celulosa en todas las especies rizobianas, la celulosa sintasa y el gen *celB* con unión a la proteína de unión al ácido bis-(3,5) ácido diguanílico (c-di- GMP). La celulosa sintasa es el primer gene del operón que codificada por *bscA* (bacterial cellulose synthesis), también denominado *acsA* (Acetobacter cellulose synthesis) o *celA* (cellulose). En segundo lugar, se encuentra una proteína de unión c-di-GMP codificado por *bcsB* (sinónimo *acsb*, *celB*) (Römling 2002). Estos dos genes, junto a una GT perteneciente a la familia 2 y 3 genes relacionados con actividad celulolítica se predijeron en el borrador del genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> (Tabla 42). Los resultados obtenidos mostraron, la presencia de dos putativos operones involucrados en la biosíntesis de celulosa bacteriana (Figura 41).



**Figura 41.** Operones putativos localizados en el genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. A, formado por los genes *bscA* (*celA*) y *bcsB* (*celB*). B. formado por una celulosa sintasa y una endoglucanasa.

BscA está formado por 8 segmentos transmembranales y dos grandes dominios citoplasmáticos, una glicosiltransferasa en el medio, y un fragmento C-terminal que contiene un dominio PilZ de unión a c-di-GMP. BscB se localiza en el periplasma y está anclado a la membrana. El complejo BcsAB forma un canal desde el dominio glicosiltransferasa a través de la membrana y el periplasma, el tamaño del mismo, le permite alojar varias unidades de glucósidos que pueden unirse al glucano naciente con su translocación a través de la membrana y en el periplasma (Römling and Galperin 2015). Además, otros operones descritos presentan un tercer gen denominado *bcsZ* (*celC*) ubicado cerca de la región putativa de celulosa sintasas del cromosoma (*celABC*), que codifica para una celulosa esencial para el proceso de infección simbiótico de *Rhizobium leguminosarum* *bv trifolii* ANU843 en *Trifolium repens* (Robledo *et al.*, 2008). Asimismo, el gen *celC* que codifica para una GH8, se ha localizado en numerosas especies bacterianas del género *Rhizobium* concluyendo su uso como un nuevo marcador filogenético (Robledo *et al.*, 2011b). Como se indicó en el apartado 2 de este capítulo, ninguna de las enzimas celulolítica pertenecía a la familia GH8. Asimismo, estos datos coinciden y corroboran los datos obtenidos en

el capítulo 1 sobre la no amplificación por PCR convencional del gen *celC*. Por lo tanto, su capacidad celulolítica deriva de la presencia de 3 celulasas con dominio proteico perteneciente a la familia GH5.

La familia GH5 junto a GH9 son las principales enzimas celulolíticas involucradas en la hidrólisis de celulosa, cuya actividades se han descrito como endo/exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa respectivamente (Mhuantong *et al.*, 2011). No es de extrañar, la presencia de este potencial hidrolítico, ya que el aislamiento de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> se realizó del tronco en descomposición de *Populus alba* (García-Fraile *et al.*, 2007). Por otra parte, la familia GH5 se ha documentado que en *Pseudomonas stutzeri*, esta familia enzimática está involucrada en la biosíntesis de celulosa empleando como substrato celobiosa, así como en la hidrólisis de CMC (Berlemont *et al.*, 2009).

Todos estos datos, nos ponen de manifiesto que los genes y sus productos proteicos, pueden desempeñar las mismas funciones descritas en la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*. Además, la ausencia del gen *celC* nos indica una posible abolición en el proceso de infección simbiótico, que se abordará con más detalle en el capítulo III.

**Tabla 42.** Análisis de los genes implicados en la producción de celulosa y celulasas *in silico* en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2T mediante el empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.

Posición del genoma		Anotación génica RAST	BlastKOALA	InterPro	Motivo proteico	CDD-Search
11066	8889	Cellulose synthase catalytic subunit [UDP-forming] (EC 2.4.1.12)	bcsA; cellulose synthase (UDP-forming) [EC: <a href="#">2.4.1.12</a> ] (K00694)	PilZ domain (IPR009875) / GT2 like (IPR001173)	GT2	Cellulose synthase super family (cl28038)
8879	6393	Cyclic di-GMP binding protein precursor	bcsB; cellulose synthase operon protein B (K20541)	Cellulose synthase BcsB, bacterial (IPR01853)	Bacterial cellulose synthase subunit	BcsB (pfam03170)
80658	82607	Glycosyl transferase, group 2 family protein, a member of the cellulose synthase superfamily	No encontrado	No encontrado	GT2	GT2 (cl11394)
83710	82658	Endoglucanase	E3.2.1.4; endoglucanase [EC: <a href="#">3.2.1.4</a> ]	Glycoside hydrolase, family (IPR001547)	GH5	Cellulase GH5 (pfam00150)
181956	182900	Cellulase	E3.2.1.4; endoglucanase [EC: <a href="#">3.2.1.4</a> ]	Glycoside hydrolase, family (IPR001547)	GH5	Cellulase GH5 (pfam00150)
859201	861984	Cellulase	No encontrado	Glycoside hydrolase, family (IPR001547)	GH5	Cellulase GH5 (pfam00150)



Para una mayor caracterización *in silico* de estos genes, se decidió evaluar su homología con otras secuencias depositadas en las bases de datos públicas NCBI mediante la herramienta BLAST. Los resultados obtenidos muestran, que los genes predichos en el genoma presentan homología con genes anotados con la actividad similar en bacterias pertenecientes al género *Neorhizobium*, *Rhizobium* y *Ensifer* (Tabla 43). Estos resultados muestran que la posible maquinaria génica involucrada en la biosíntesis de celulosa en ALA10B2<sup>T</sup> es similar y potencialmente común a otros organismos pertenecientes a la familia de los *Rhizobiaceae*. Sin embargo, en el caso de una de la celulasa (marcada con un asterisco), ya que el porcentaje de la consulta (Query cover) fue de un 6%, por lo que no podemos asignarles ninguna función descrita y conocida. Lo que podría estar indicándonos la presencia de un nuevo tipo de celulasa aún no descrita ni depositada en las bases de datos públicas.


**Tabla 43.** Comparación *in silico* de los genes involucrados en la biosíntesis de celulosa bacteriana de *Rhizobium cellulossilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> anotadas en el genoma empleando la herramienta Blastn.

Blastn				
Anotación ALA10B2 <sup>T</sup>	Microorganismo	Query cover	Identidad	Similitud %
Cellulose synthase catalytic subunit (UDP-forming)	Neorhizobium sp. NCHU2750 celA (CP030827.1)	100	0.0	87
	Neorhizobium sp. SOG26 cellulose synthase catalytic subunit (UDP-forming) (AXV14405.1)	97	0.0	80
	R. leguminosarum bv trifolii clone Rt623_74 cellulose synthase (KX486889)	95	0.0	77
	R. leguminosarum bv trifolii ANU843 celA (JN180924.1)	95	0.0	77
Cyclic di-GMP binding protein precursor	Neorhizobium sp. NCHU2750 cellulose synthase (CP030827.1)	83	0.0	70
	Neorhizobium sp. SOG26 celB (CP025512.1)	86	0.0	77
	R. leguminosarum bv trifolii ANU843 cellulose synthase subunit B (JN180925.1)	41	2e-36	68
Glycosyl transferase, group 2 family protein, a member of the cellulose synthase superfamily	Neorhizobium sp. NCHU2750 glycosyl transferase (CP030827.1)	98	0.0	71
	Neorhizobium galegae putative GT1 (HG938356.1)	91	5e-164	68
	Neorhizobium sp. SOG26 glycosyl transferase (CP025512.2)	73	6e-131	68
Endoglucanase	Neorhizobium sp. NCHU2750 cellulase	92	4e-168	73

Continuación Tabla 43.

Blastn				
Anotación ALA10B2 <sup>T</sup>	Microorganismo	Query cover	Identidad	Similitud %
Cellulase*	Rhizobium esperanzae N561 (CP013500.1)	6	3e-10	70
	Rhizobium sp. TAL182 (CP021024.1)	6	3e-10	70
Cellulase (859201-861984)	Neorhizobium sp. NCHU2750 cellulase (CP030827.1)	100	0.0	79
	Neorhizobium sp. SOG26 cellulase (CP025512.2)	95	1e-98	70
	Ensifer meliloti endoglucanase precursor (AF233448.1)	95	1e-66	68

# Capítulo III

A microscopic image of a plant root, likely from a legume, showing several small, rounded, light-colored nodules attached to the root surface. These nodules are characteristic of root nodule formation by rhizobium bacteria. The root itself is thin and translucent, with some internal cellular structures visible.

**Análisis del comportamiento simbiótico  
de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de  
*Rhizobium cellulosilyticum* con *Medicago sativa*,  
*Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris*.**



El género *Rhizobium* es conocido por establecer una relación simbiótica con plantas leguminosas, siendo los nódulos su nicho para la realización de la Fijación Biológica del Nitrógeno. En esta interacción diversas moléculas, procedentes tanto del micro como del macrosimbionte, desarrollan un papel crucial en el establecimiento de un diálogo molecular específico entre ambos. En este sentido, y conforme a los datos obtenidos en los capítulos I y II, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> es un rizobio carente de parte de la maquinaria genética inherente a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Por ello, y para esclarecer su potencial comportamiento simbiótico se decidió inocular dicha cepa con tres leguminosas diferentes y de gran interés agronómico como son *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris*.

## 1. Estudio mediante microscopía de la colonización e infección de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> con diferentes leguminosas.

Para poder analizar el comportamiento de ALA10B2<sup>T</sup> con las raíces de las leguminosas seleccionadas, se realizaron en primera estancia, ensayos en cultivos hidropónicos y bajo condiciones controladas de laboratorio. Para ello, la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> se marcó con el plásmido pBHR-mRFP, derivado del plásmido pHc60 que codifica para una proteína roja fluorescente (denominada RFP), lo cual nos permitió observar la colonización mediante microscopía de fluorescencia. El uso de este tipo de marcadores es una técnica de ingeniería genética ampliamente empleada en diversos campos científicos, siendo utilizados dentro de nuestra área como marcadores visuales para monitorizar la interacción planta-microorganismo (Flores-Félix *et al.*, 2015b; Jiménez-Gómez *et al.*, 2018).

Una vez germinadas las plantas, estas se inocularon con una suspensión bacteriana de  $D. O_{600} = 0,1$  tanto para de la cepa salvaje ALA10B2<sup>T</sup> como para la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_RFP marcada con la proteína roja fluorescente RFP. Tras la inoculación, las plantas se observaron de manera periódica, siendo los períodos de observación bajo el microscopio a los 5, 10 y 15 dpi aproximadamente para todas las plantas. A continuación, se detallan de manera separada los cambios morfológicos observados en los pelos radicales tras la inoculación de ALA10B2<sup>T</sup>, y por otro lado la colonización y formación de biofilms.

Tras la inoculación de las cepas de ALA10B2<sup>T</sup>, observamos cambios morfológicos de los pelos radicales indicando una respuesta por parte de la planta a la presencia del rizobio. Destacadamente, esta cepa es capaz de inducir la misma respuesta en las 3 leguminosas (Figura X). El estudio llevado a cabo entre la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* y las leguminosas *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris* pone de manifiesto la existencia de un reconocimiento entre los organismos, sin causar daños ni a nivel radicular ni al desarrollo vegetal, como se mostrará en los siguientes apartados de este capítulo.

Sin embargo y a pesar de la existencia de una respuesta vegetal a la presencia del rizobio, en ninguna de las leguminosas se estableció una simbiosis efectiva, ya que no se observaron fenotipos típicos de una interacción efectiva como es el cayado de Pastor (Hac), canales de infección (Inf) ni la formación de primordios nodulares (noi) (Tabla 44).

**Tabla 44.** Fenotipos radiculares simbióticos observados en las raíces de *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris* por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia del fenotipo en comparación con las plantas control.

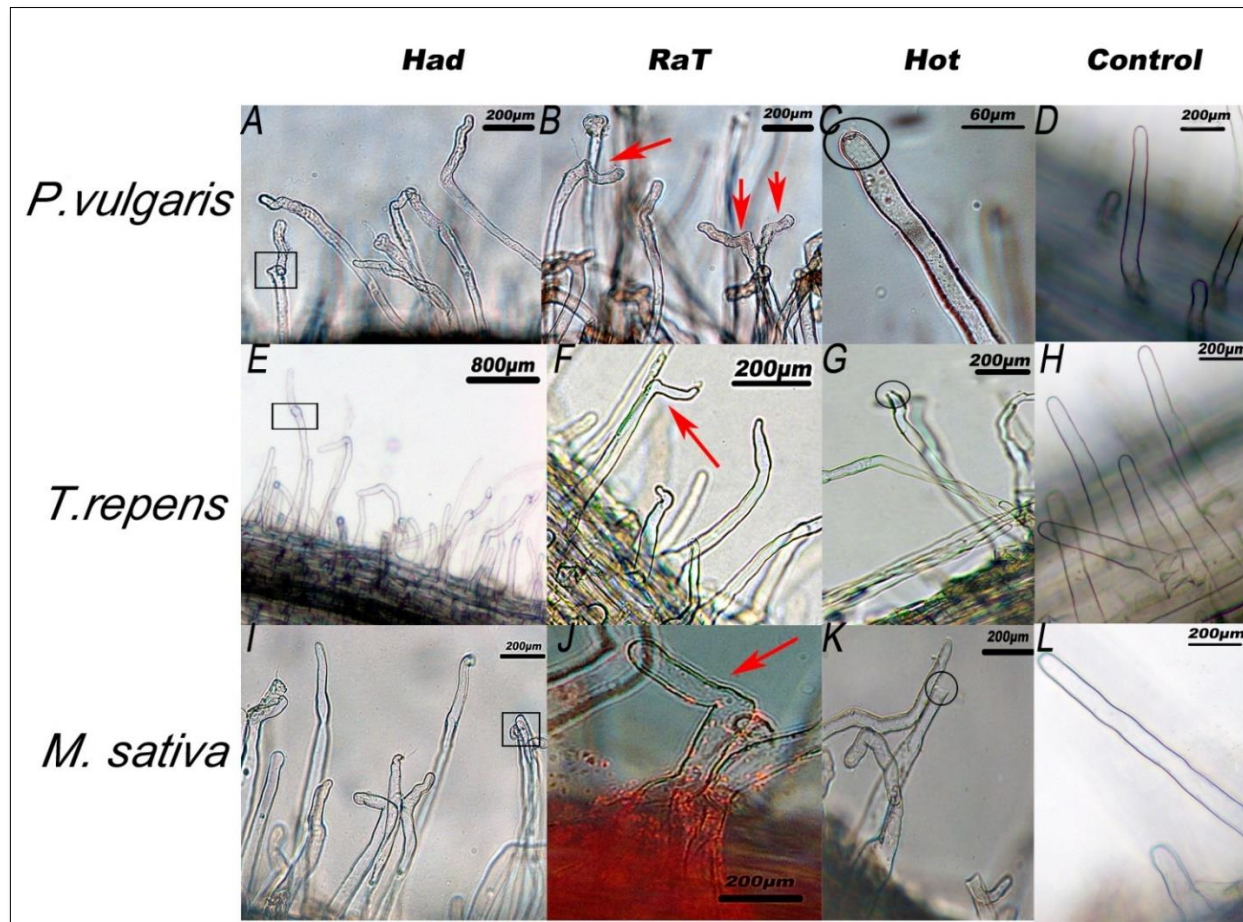
Leguminosa	Dpi	Fenotipos simbióticos						
		Had	RaT	Hot	Hac	Inf	Noi	Fix
<i>Medicago sativa</i>	5	+	+	+	-	-	-	-
	10	+	+	+	-	-	-	-
	15	+	+	+	-	-	-	-
<i>Trifolium repens</i>	5	+	+	+	-	-	-	-
	10	+	+	+	-	-	-	-
	15	+	+	+	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	5	+	+	+	-	-	-	-
	10	+	+	+	-	-	-	-
	15	+	+	+	-	-	-	-

Entre los fenotipos radicales observados en todas las leguminosas seleccionadas destacan, la observación de redirecciones o fenotipo Had (Figura 42, A, E, I), el fenotipo RaT (Figura 42, B, F, J). Con referencia al fenotipo Hot, en las raíces de *Phaseolus vulgaris* se muestra el inicio de la formación (Figura 42, C), mientras que en las raíces de *Trifolium repens* y *Medicago sativa* se muestra la decapitación de la punta radical (Figura 42, G, K).

Estos fenotipos son fruto de una interacción entre ambos organismos, ya que las plantas sin inocular presentan un desarrollo radical diferente a cuando perciben la presencia de un rizobio (Figura 42, D, H, L).

Los cambios morfológicos radicales inducidos por la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* se observaron desde los 5 dpi. Además, de los fenotipos descritos anteriormente, también se observó en todas las leguminosas la formación continuada de “curlings” (Figura 42, A, E, marcadas dentro de un recuadro). A pesar de la ausencia de una celulasa homóloga a la celulasa simbiótica CelC2, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> es capaz de producir un fenotipo similar al descrito por dicha celulasa en los pelos radicales de *Trifolium repens* (Robledo *et al.*, 2008). Estos mismos autores, observaron la ausencia de canales de infección, así como el característico cayado de Pastor en mutantes deficientes de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, siendo estas observaciones muy similares a las observadas en las interacciones de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* con las leguminosas seleccionadas. Estos datos sugieren que, la entrada del rizobio en el interior de los pelos radicales necesita de la presencia de un conjunto génico simbiótico como son los factores de nodulación, la presencia del rizobio compatible y la secreción de celulasas simbióticas.

En rasgos generales, los fenotipos radicales observados podrían estar relacionados con la potencial maquinaria genética de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> descrita en los capítulos I y II. No obstante, estos datos se abordarán con más detalle en la discusión general.



**Figura 42.** Microfotografías de los fenotipos radiculares observados en las leguminosas seleccionadas tras la inoculación de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. A-D) Observación de los fenotipos Had (A), fenotipo RaT (B), fenotipo Hot (C) en comparación con las plantas control (D) en las raíces de *Phaseolus vulgaris*. E-H) Observación de los fenotipos Had (E), fenotipo RaT (F), fenotipo Hot (G) en comparación con las plantas control (H) en las raíces de *Trifolium repens*. I-L) Observación de los fenotipos Had (I), fenotipo RaT (J), fenotipo Hot (K) en comparación con las plantas control (L) en las raíces de *Medicago sativa*. Los recuadros indican la formación continuada de “culings”. Las flechas indican el fenotipo RaT. Los cirulos indican el fenotipo Hot. Las fotos de corresponden a 10 dpi.

Una de las etapas esenciales para el desarrollo de una interacción beneficiosa y efectiva, es la adhesión bacteriana a la superficie radicular (Dazzo *et al.*, 1984). En la Tabla 45, se encuentra recogido a modo de resumen, los fenotipos observados relacionados con la formación de biofilms y colonización.

**Tabla 45.** Fenotipos radiculares simbióticos observados en las raíces de *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris* observados tras la inoculación de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en los primeros estadios del desarrollo simbiótico. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia.

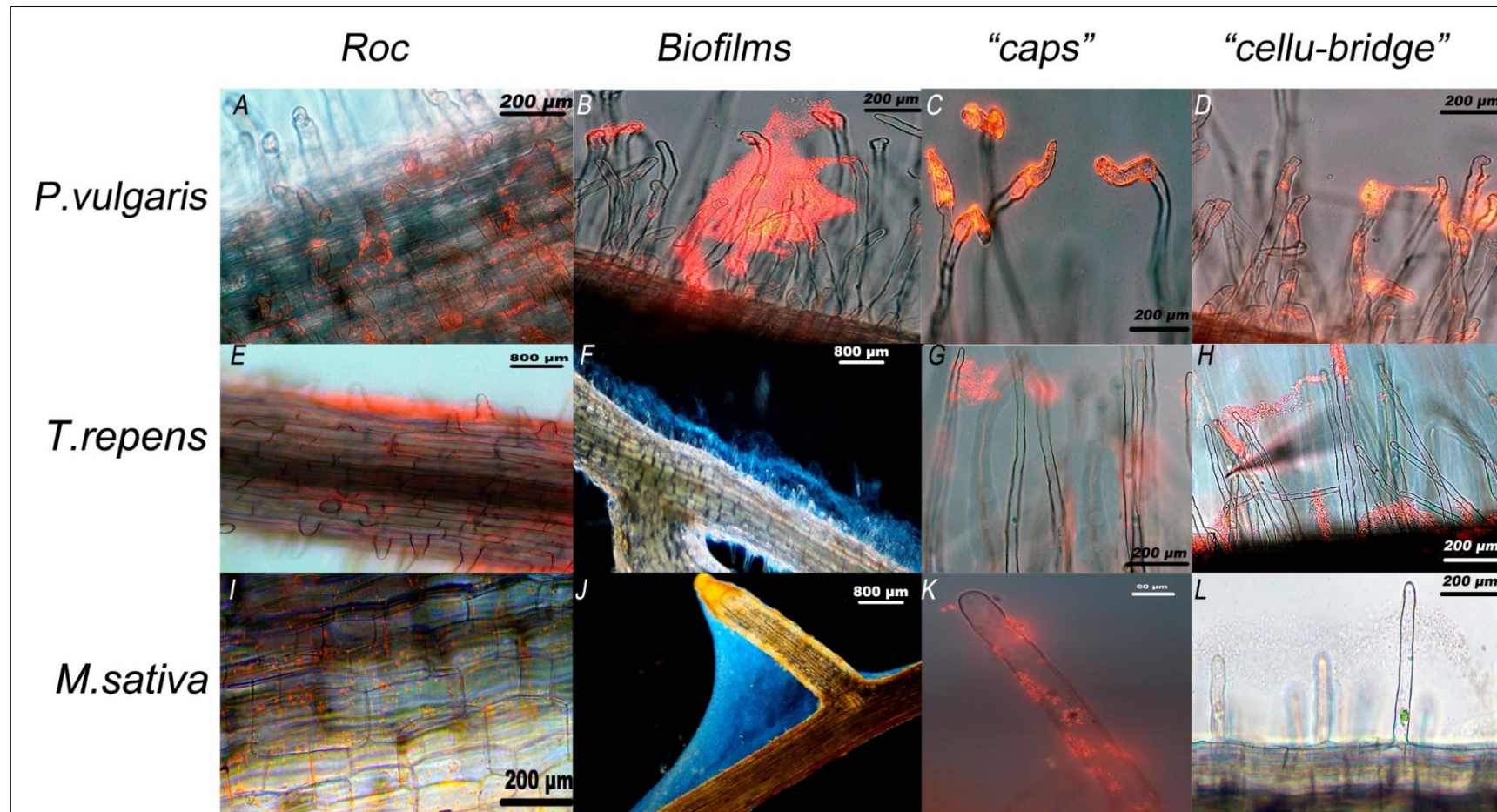
Leguminosa	Dpi	Roc	Biofilms	"cellu-bridge"	"caps"
<i>Medicago sativa</i>	5	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	15	+	+	+	+
<i>Trifolium repens</i>	5	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	15	+	+	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	5	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
	15	+	+	+	+

Durante el desarrollo de los experimentos, se observó una gran capacidad colonizadora por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> en sendas leguminosas. En los primeros estadios (5dpi) se observó el inicio de la colonización (fenotipo Roc) a la superficie radicular de *Phaseolus vulgaris* (Figura 43, A), en *Trifolium repens* (Figura 43, B) y *Medicago sativa* (Figura 43, C). Gracias al uso de la microscopia de fluorescencia se observó la acumulación de bacterias en la superficie radicular iniciando la formación de biofilms (Figura 43, B).

La celulosa es un polímero birrefringente, por ello, el uso de la luz polarizada nos permitió observar la magnitud de los biofilms formados por la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* (Figura 43, F, J), en donde observamos un biofilm tridimensional alrededor de las raíces. Asimismo, esta cepa es capaz de adherirse a la punta de los pelos radicales formando los denominados "cpas" (Figura 43, C, G, K).

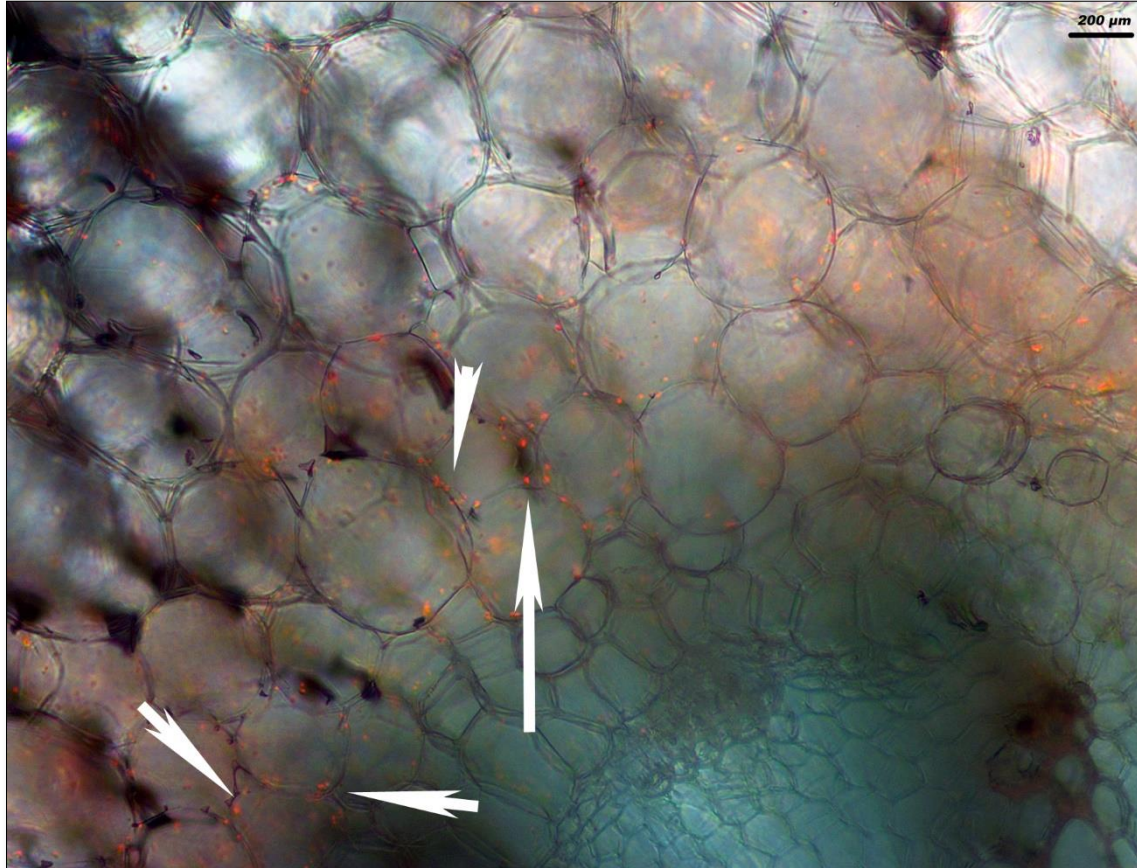
Una de las características más notables, y fruto de su gran capacidad para sintetizar celulosa en la interacción de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> con sendas leguminosas, es la capacidad para formar "puentes de celulosa" entre los pelos radicales. Este fenotipo no se ha observado en la bibliografía consultada, y por lo tanto sugerimos la existencia de un fenotipo nuevo en la interacción planta-microorganismo denominado cellu-bridge (Figura 43, D, H, L).





**Figura 43.** Microfotografías de la colonización de ALA10B2<sup>T</sup> en las raíces de *P. vulgaris* (A-D), *T. repens* (E-H) y *M. sativa* (I-L). A los 5 dpi se observó la colonización de la superficie radical (fenotipo Roc) (A, E, I) gracias al uso de la microscopía de fluorescencia. La formación de biofilms también se observó con dicha técnica (B), y mediante el uso de la luz polarizada en las raíces de *T. repens* (F) y *M. sativa* (J). La cepa ALA10B2<sup>T</sup> también es capaz de adherirse a la punta de los pelos apicales formando los denominados “caps” (C, G, K). Las microfotografías D, H y L muestran la formación del fenotipo propuesto cellu.-bridge , en la raíces de *P. vulgaris* (D), *T. repens* (H) y *M. sativa* (L).

Por otra parte, es importante destacar que en el caso de las raíces de *Phaseolus vulgaris*, se observó un comportamiento endófito por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> penetrando por espacios intercelulares (Figura 44). Estos datos nos sugieren que esta cepa puede utilizar como vía de la entrada la infección intercelular, descrita como vía ancestral de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas e independiente de factores de nodulación (Madsen *et al.*, 2010).



**Figura 44.** Corte transversal de la raíz de *Phaseolus vulgaris* inoculada con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_RFP. Las flechas indican la ubicación de las bacterias en los espacios intercelulares.

En referencia a estos datos, la ausencia de características inherentes a la simbiosis por parte del microsimbionte, siendo principalmente los factores de nodulación y las celulasas simbióticas, impiden la formación de una interacción simbiótica eficiente, no observándose fenotipos radiculares en una relación simbiótica ideal. Asimismo, la ausencia de estos factores simbióticos, en el caso de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> no afectan en el desarrollo de las leguminosas, ya que en nuestro estudio nunca se observaron indicios de enfermedad en las plantas inoculadas con dicha cepa.

## 2. Estudio del comportamiento de ALA10B2T en co-inoculación con un endosimbionte de *Phaseolus vulgaris* en cámara iluminada.

A pesar de que *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> no indujo ningún fenotipo característico de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, tampoco se observaron signos propios de una interacción con microorganismos patógenos, ya que en ninguna de las leguminosas empleadas se observaron síntomas relacionadas con la deficiencia nutritiva o signos de enfermedad. Por ello, se decidió evaluar si esta cepa era capaz de utilizar los mecanismos inherentes de una simbiosis efectiva producidos por un endosimbionte natural, así como de potenciar el desarrollo vegetal.

Para este estudio, se empleó como planta hospedadora la alubia común (*Phaseolus vulgaris*), ya que es una de las especies más cultivadas y empleadas como fuente de proteína para los seres humanos (Martínez-Romero 2003). Como endosimbionte se seleccionó la cepa TPV08 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, aislada por nuestro grupo de investigación de nódulos efectivos de alubia y descrita con una gran potencial para promover el desarrollo de cultivos hortícolas (García-Fraile *et al.*, 2012).

Para abordar este estudio, se emplearon las cepas salvajes de ambos rizobios. Además, se marcó a la cepa ALA10B2<sup>T</sup> con el gen reportero GUS para su posterior observación mediante microscopía óptica con el objetivo de estudiar su competitividad. Asimismo, para evaluar el comportamiento interactivo de ambas cepas con el macrosimbionte, se decidió emplear diferentes técnicas de microscopía como la microscopía confocal y la microscopía electrónica de transmisión.

En primer lugar, se llevaron a cabo los estudios de las inoculaciones simples de las cepas salvajes de *R. cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, *R. leguminosarum* TPV08, la co-inoculación empleando la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_GUS y TPV08 WT y un control sin inocular. A los 20 dpi aproximadamente, se observó la formación de nódulos en los tratamientos inoculados con la cepa endosimbionte TPV08 y la co-inoculación en las raíces de *Phaseolus vulgaris*, no encontrándose nódulos en el tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, así como en el control negativo (Figura 45). Asimismo, el número de nódulos en el tratamiento co-inoculado con ambos rizobios fue significativamente mayor que el tratamiento con la cepa TPV08 (Tabla 46).

**Tabla 46.** Número de nódulos obtenidos en los diferentes tratamientos con *Phaseolus vulgaris*.

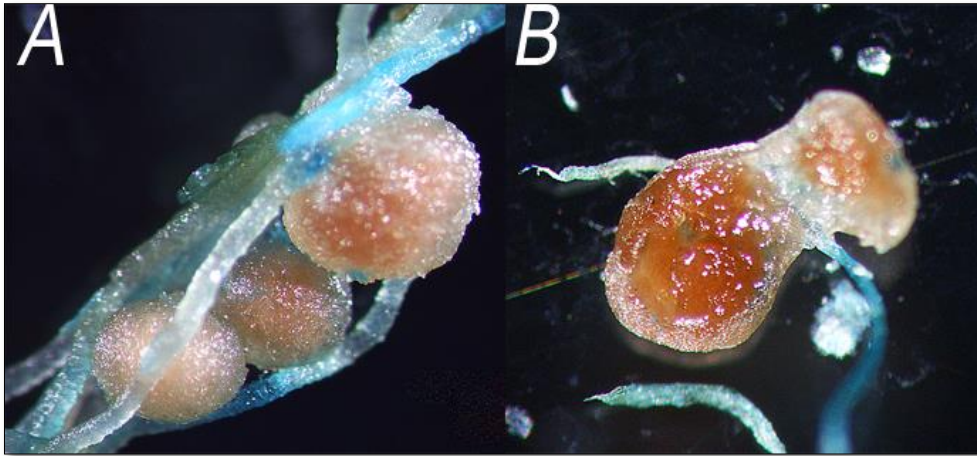
Tratamiento	Número de nódulos/planta
Control	0
ALA10B2 <sup>T</sup>	0
TPV08	23±0,13
Co-inoculación	38±0,18*

Valores marcados con un asterisco (\*) son significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).



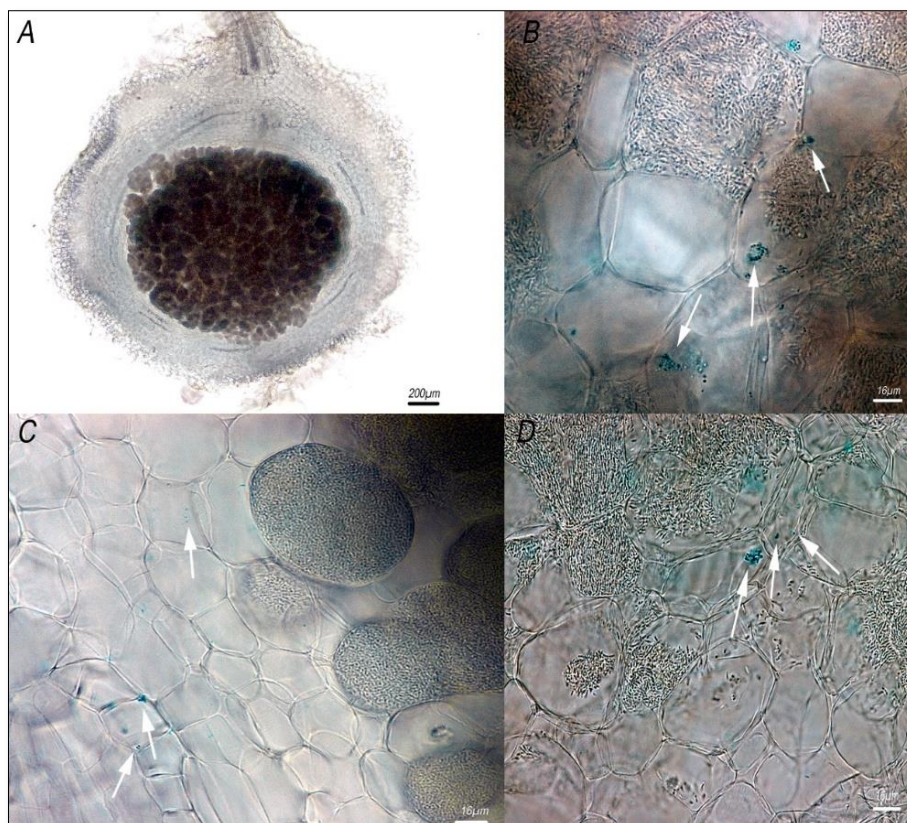
**Figura 45.** Ensayo en cámara iluminada de las cepas seleccionadas en *Phaseolus vulgaris* en condiciones hidropónicas. En la parte inferior se puede observar en detalle las raíces de los diferentes tratamientos. Las flechas marcan la presencia de nódulos. A) Tratamiento co-inoculado con ambos rizobios. B) Tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. C) Tratamiento inoculado con la cepa TPV08. D) Tratamiento control.

Seguidamente, se recolectaron los nódulos procedentes del tratamiento co-inoculado para su revelado. Algunas de las raíces se sometieron a tinción mediante una solución tamponada que contenía X-Glu para evaluar de un modo cualitativo la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en los nódulos (Ding *et al.*, 2008). Los resultados nos mostraron puntos localizados dentro de los nódulos procedentes de la co-inoculación (Figura 46) lo cual nos estaría indicando la posible presencia de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup>.



**Figura 46.** Fotografías realizadas con lupa estereoscópica de los nódulos de *Phaseolus vulgaris* procedentes del tratamiento co-inoculado con la cepa endosimbionte *Rhizobium leguminosarum* *bv phaseoli* y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> marcada con el gen reportero GUS. A) Nódulos efectivos de la interacción donde se observan diferentes zonas con coloración azul. B) Corte transversal de un nódulo que muestra coloración azul dentro del mismo lo cual nos estaría indicando la posible presencia de ALA10B2<sup>T</sup> en su interior.

Por otro lado, se realizaron cortes transversales con Médula de Saúco (Ventus®) de aquellos nódulos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa positiva para la visualización de su interior (Figura 47).



**Figura 47.** Microscopía óptica de los nódulos con actividad  $\beta$ -glucuronidasa positiva. A) Vista general del corte transversal de un nódulo. Las microfotografías B-D) son aumentos del interior del nódulo dónde se observan células vegetales infectadas con la cepa TPV08, así como la presencia de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> dentro en los espacios intercelulares (C y D). Las flechas indican la presencia de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

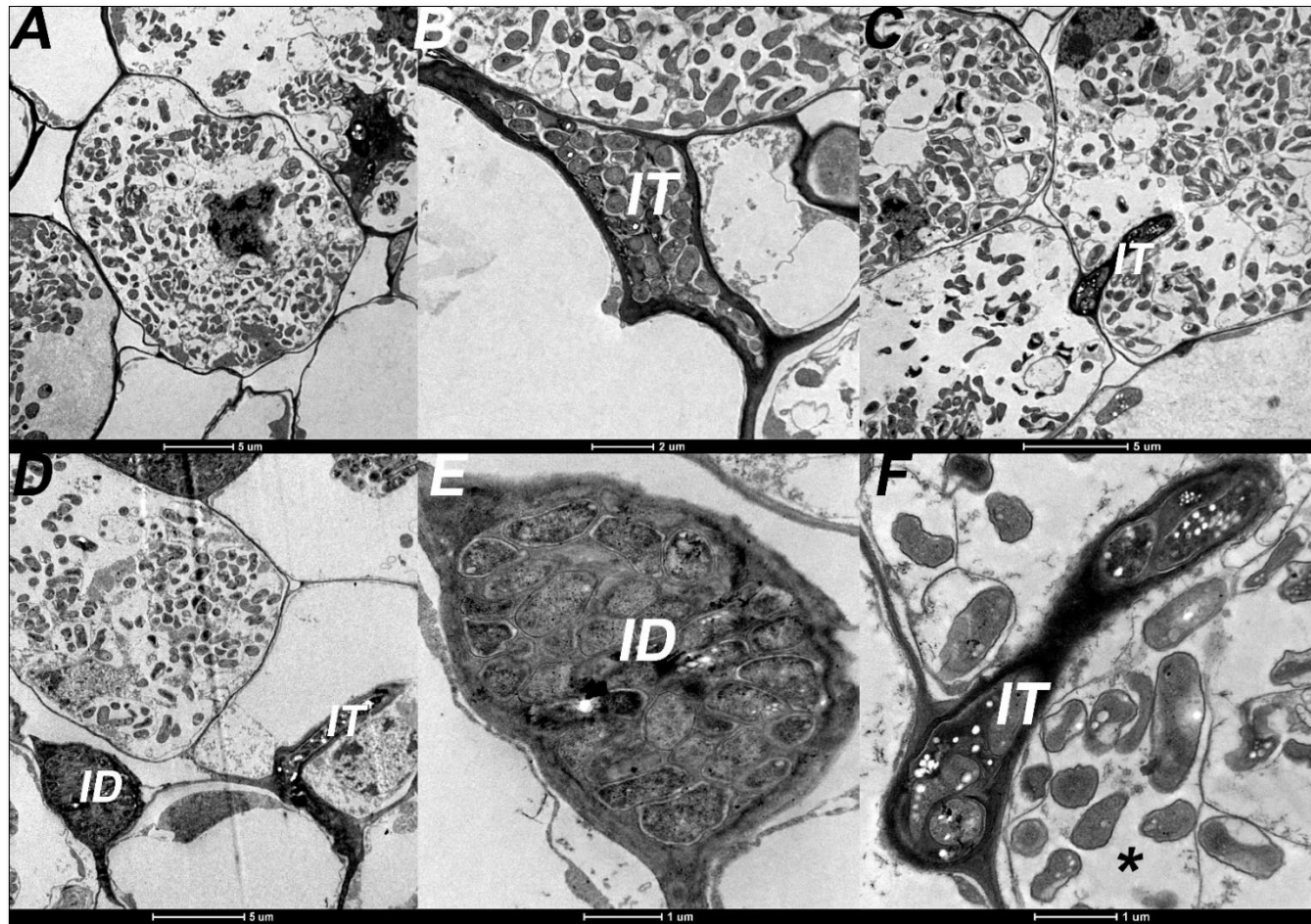
Gracias a los cortes transversales de los nódulos pudimos observar que estos presentaban la estructura típica de los nódulos determinados (Figura 48 A). Los diferentes aumentos llevados a cabo de la zona de infección, nos mostró que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> se encontraba de manera minoritaria en el interior del nódulo ocupando en su mayoría los espacios intercelulares (Figura 48, B-D). Asimismo, pudimos observar que las células nodulares estaban ocupadas por la cepa endosimbionte TPV08, ya dentro de las mismas no se apreció una tonalidad azulada indicativa de la presencia de *Rhizobium cellulosilyticum* (Figura 48).

A pesar de los datos obtenidos tras los cortes realizados, no pudimos discernir con claridad si la cepa ALA10B2<sup>T</sup> se limitaba sólo a los espacios intercelulares o por el contrario también se disponía en el interior algunas células vegetales. Por lo tanto, se decidió realizar un estudio comparativo de los nódulos procedentes de las plantas inoculadas con la cepa TPV08 y los nódulos procedentes del tratamiento coinoculado mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión.

En la Figura 48, se puede apreciar el interior de los nódulos procedentes de las plantas inoculadas con la cepa TPV08 de *Rhizobium leguminosarum* *bv phaseoli*, así como las estructuras típicas de una simbiosis efectiva y perfectamente organizada (A). Esta cepa infecta a la alubia mediante la formación de canales de infección (vía canónica) dirigiendo los rizobios al interior del nódulo a través de los canales de infección que se observan (B, C, D, F, F).

En los paneles (D, E), se puede observar la biogénesis de los simbiosomas debido a la formación de una gota de infección "infection droplet" (ID). Esa región es donde el canal de infección se invagina y los rizobios entran en contacto directo con la membrana plasmática del huésped sin la pared celular como barrera (Brewin and Hirsch 2004). Las bacterias se liberan en el citoplasma de las células corticales encapsuladas en una membrana de origen vegetal denominada simbiosoma o membrana peribacteroidea (F marcada con un asterisco). Este término fue acuñado por Roth *et al.*, (1988) definiéndolo como "compartimiento unido a la membrana que contiene uno o más simbiosomas y ciertos compuestos metabólicos localizados en el citoplasma del células eucariotas".

En el interior de los simbiosomas, los rizobios sufren un cambio morfológico diferenciándose en bacteroides (C) su forma simbiótica, permitiendo que se lleve a cabo la fijación biológica del nitrógeno.



**Figura 48.** Microfotografías del interior de los nódulos procedentes de las plantas inoculadas con la cepa TPV08 obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica donde se observa un interior celular organizado (A). La vía de entrada de este rizobio es a través de los canales de infección (B, C, D, F). En los paneles B y F se pueden apreciar la pared celular en el interior del canal. En los paneles D y E se observa el denominado infection droplet (ID) que marca la biogénesis de los simbiosomas (F marcado un asterisco) en donde el rizobio experimenta un cambio morfológico transformándose en bacteroides para llevar a cabo la FBN.

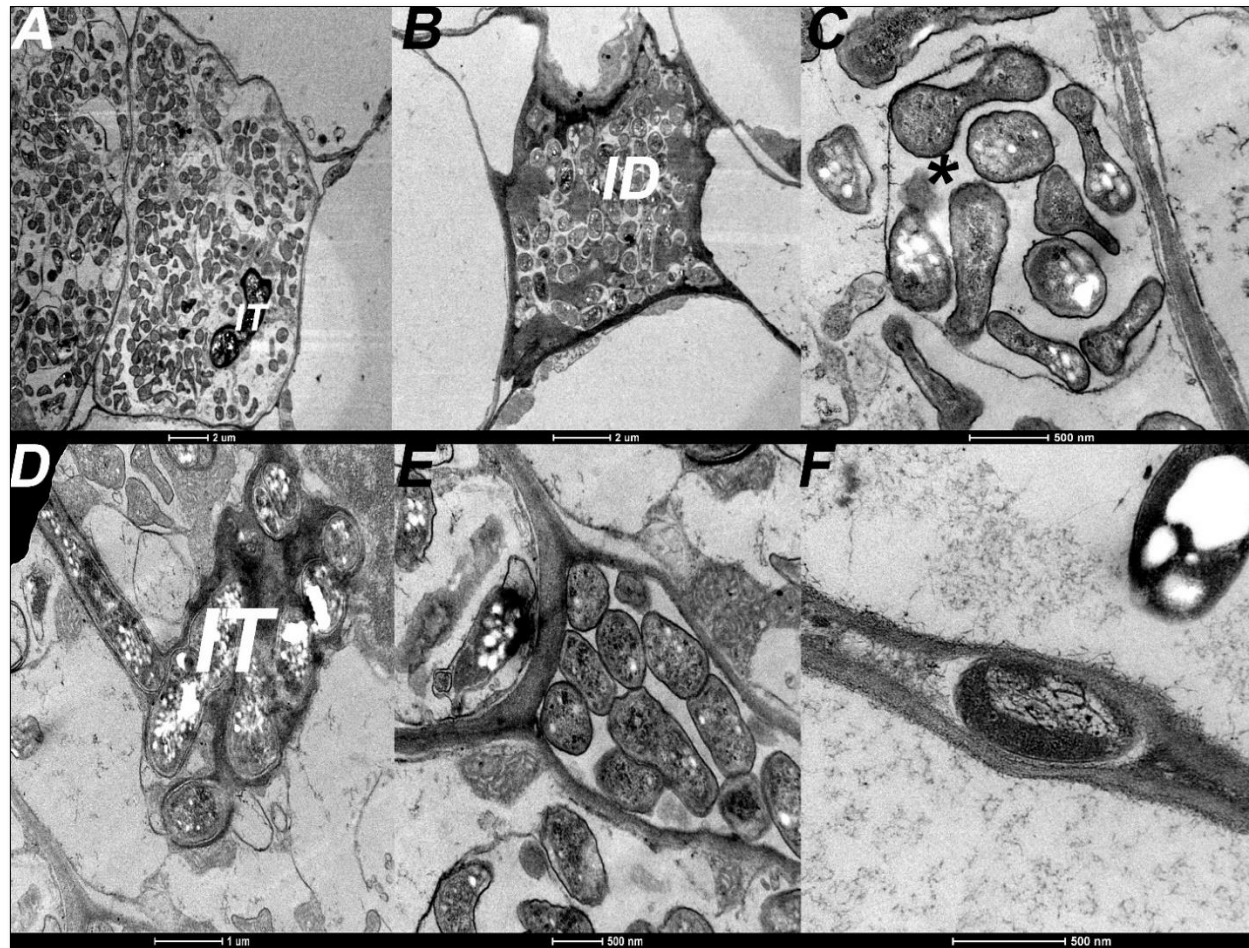
Con referencia a los nódulos procedentes de las plantas co-inoculadas con ambos rizobios (Figura 49) también se observó una organización interna típica de una simbiosis efectiva con células vegetales ocupadas en su totalidad (A). Del mismo modo, también se observaron canales de infección ya que esta es la vía de entrada empleada por la cepa TPV08 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (A, D) tal y como se observó en los nódulos de las plantas inoculadas con dicho endosimbionte.

Por otro lado, también se observó la denominada gota de infección “infection droplet” (ID) (B) como en los nódulos inducidos por la cepa TPV08. Otra característica común en ambos tratamientos fue la observación de simbiosomas y bacteroides (C) llevando a cabo la fijación biológica del nitrógeno.

Estas observaciones comunes a los nódulos procedentes de las plantas inoculadas de manera simple con la cepa TPV08 son lógicas. No obstante, las únicas diferencias que se observaron entre ambos tratamientos fue la presencia de células bacterianas en el interior de los espacios intercelulares (E y F) indicando la posible presencia de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> corroborando los datos obtenidos tras las observaciones de los cortes de los nódulos con actividad  $\beta$ -glucuronidasa positiva. Con estos datos podemos intuir que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> se encuentra alojada en los espacios intercelulares, sin poder discernir si esta cepa es capaz de ocupar el interior de las células vegetales y comportarse como un endosimbionte.

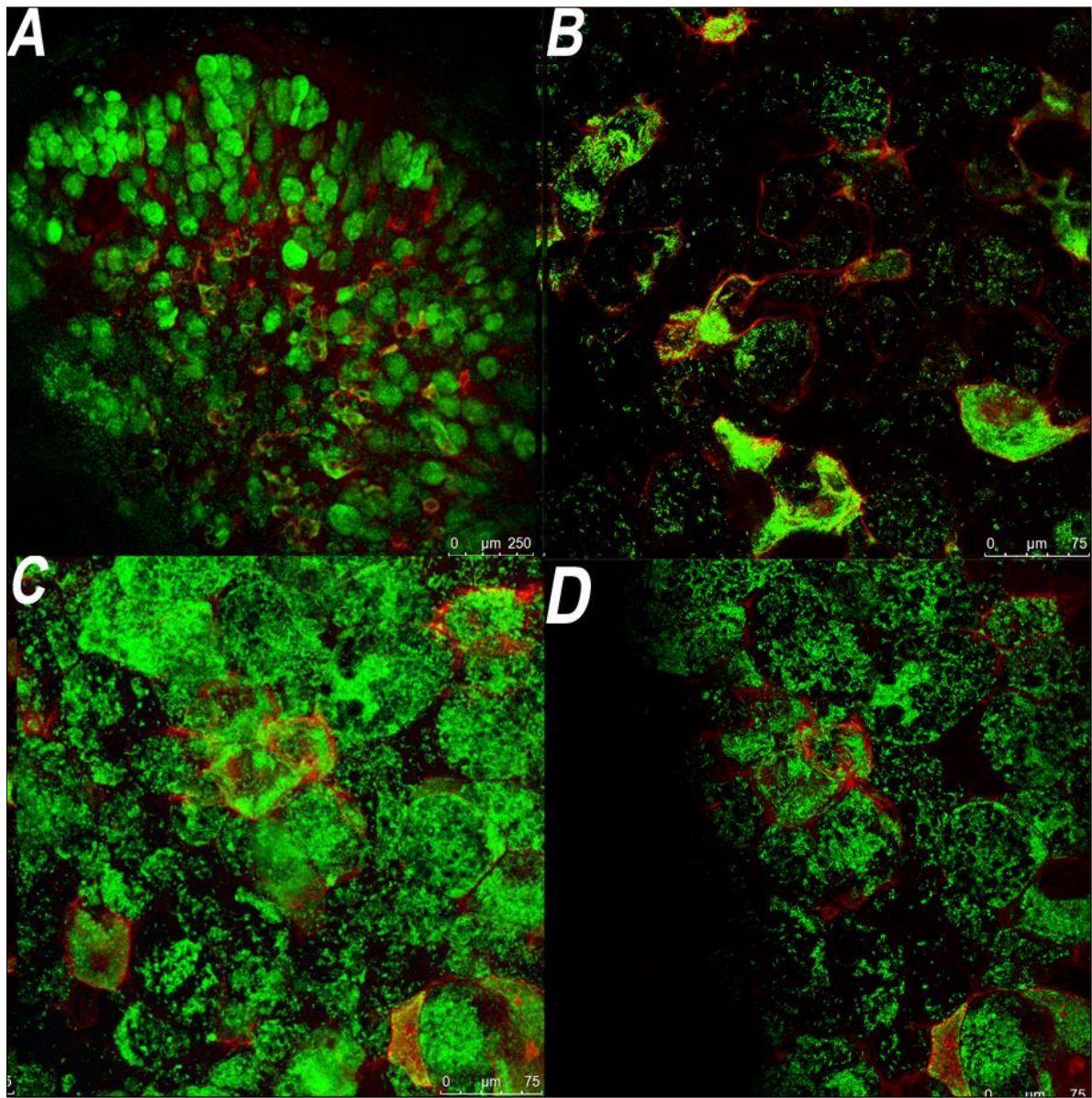
Por ello, se decidió realizar otro experimento empleando la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_RFP que expresa de manera constitutiva una proteína roja fluorescente y la cepa TPV08\_GFP que expresa de manera constitutiva una proteína verde fluorescente para discernir de un modo más preciso el comportamiento de ambos rizobios. En este caso las plantas se germinaron y crecieron en vermiculita estéril y bajo las mismas condiciones hidropónicas (Materiales y Métodos 5.2.).





**Figura 49.** Microfotografías mediante microscopía de transmisión electrónica del interior de los nódulos procedentes de las plantas co-inoculadas con ambos rizobios. Se observa un interior celular organizado (A), así como vías de entradas canónicas debido a la presencia de canales de infección (A, D). En el panel B se puede apreciar el denominado infection droplet (ID) que marca la biogénesis de los simbiosomas (C marcado un asterisco) en donde el rizobio experimenta un cambio morfológico transformándose en bacteroides para llevar a cabo la FBN. Los paneles E y F indican la existencia de células bacterianas en el interior celular relacionando dicha presencia con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*.

Cuando se observó la nodulación de las plantas, se seleccionaron algunos nódulos para la realización de cortes transversales mediante el empleo de la Médula de Saúco (Ventus®) para su posterior visualización mediante la microscopía confocal (Figura 50).



**Figura 50.** Microscopía confocal de cortes transversales de nódulos procedentes de las plantas co-inoculadas con ambos rizobios. En verde se puede observar la cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 que contiene el plásmido pHC60 que codifica para una GFP de manera constitutiva. En rojo se puede apreciar a la cepa ALA10B2<sup>T</sup> que contiene el plásmido pBHR-mRFP que codifica para una RFP de manera constitutiva alojándose en los espacios intercelulares.

En el panel A, se puede observar de forma general el interior de los nódulos ocupado en su mayoría por la cepa TPV08 ya que se encuentra en el interior de las células vegetales (verde), siendo minoritaria la presencia de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> en rojo. Los paneles B, C y D muestran un aumento de diferentes zonas del interior nodular confirma que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> ocupa los espacios intercelulares.

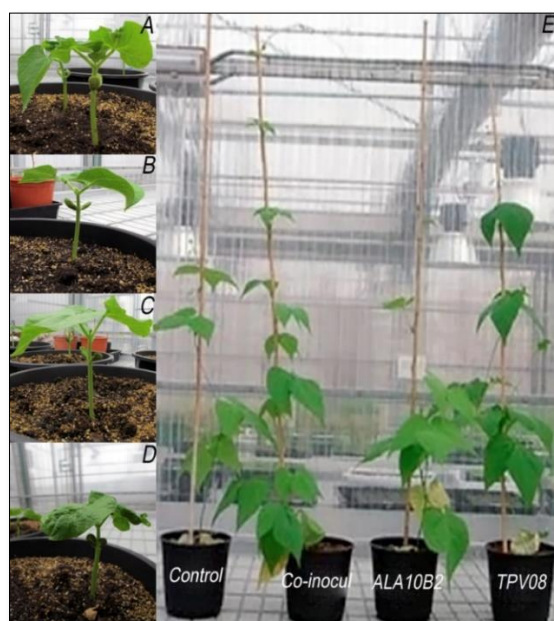
Estos datos ponen de manifiesto, que a pesar de la presencia de un rizobio endosimbionte de *Phaseolus vulgaris*, la cepa ALA10B2<sup>T</sup> no utiliza los canales de infección, sino que llega al

interior de los nódulos por vía intercelular, como se demostró en las inoculaciones simples (Figura 44). Además, estos datos podrían estar indicando una ausencia o inactivación parcial o total de maquinaria genética simbiótica relacionada con la capacidad para fijar nitrógeno típico del género *Rhizobium*. En vista con los resultados obtenidos, se procedió a evaluar la posible existencia de una sinergia entre ambos rizobios para la mejora de la producción de *Phaseolus vulgaris*.

### 3. Estudio del efecto de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> como PGPB de *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de invernadero.

#### 3.1. Análisis del fenotipo foliar durante el desarrollo del experimento.

Con el objetivo de evaluar el potencial de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> como bacteria PGPB y, conforme a los resultados obtenidos tras el estudio llevado a cabo por microscopía, se realizaron 3 experimentos alejados en el tiempo bajo condiciones de invernadero controladas. Para ello, se empleó una mezcla de vermiculita y turba no estéril (en proporciones 1:3) y se llevaron a cabo 4 tratamientos distintos, el control sin inocular, el tratamiento inoculado con la cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08, el tratamiento inoculado con la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> y el tratamiento con la co-inoculación. A los 10 días post germinación se inocularon (Figura 51 A-D) y la duración de los diferentes ensayos fue de 3 meses.

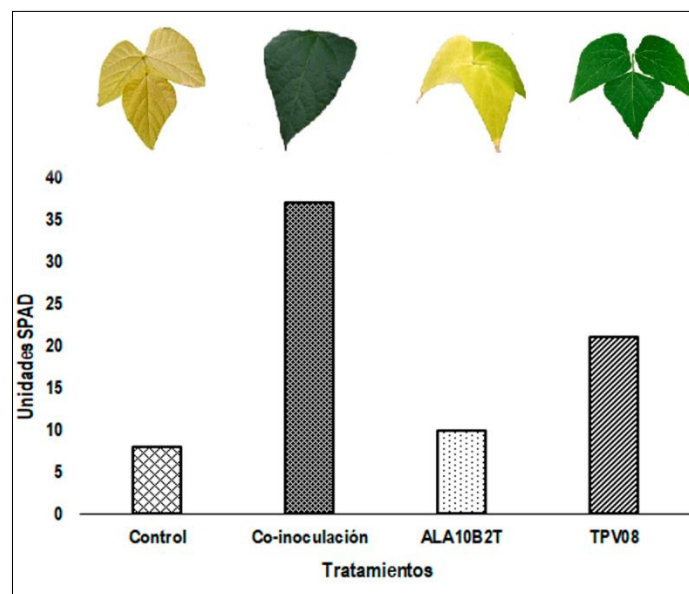


**Figura 51.** Desarrollo vegetativo de *Phaseolus vulgaris* en invernadero. Las fotografías A-D corresponden con el desarrollo vegetativo a los 10 días post germinación de los tratamientos control, co-inoculación, tratamiento con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> y tratamiento inoculado con la cepa TPV08 correspondientemente, E) desarrollo vegetativo a los 22 dpi de los diferentes tratamientos.

Durante el desarrollo de los ensayos, el crecimiento vegetativo de los tratamientos se observó periódicamente, percibiendo un crecimiento más rápido de las plantas inoculadas con ambos rizobios que el resto de los tratamientos, ya que presentaban una mayor frondosidad vegetal (Figura 51, E). Cabe destacar que, durante el desarrollo de estos, no se suplementaron con fertilizantes nitrogenados. Por lo tanto, el fenotipo observado en el caso del tratamiento de la co-inoculación nos podría estar indicando un posible efecto sinérgico entre la cepa TPV08 y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. Ambas cepas presentan mecanismos inherentes a las bacterias PGPB analizados en diferentes plantas hortícolas como el pimiento o el tomate como es el caso de la cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 (García-Fraile *et al.*, 2012), o mediante el estudio *in vitro* e *in silico* de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> llevados a cabo en la presente tesis doctoral (ver capítulos I y II).

Por otro lado, se evaluó el contenido en clorofila mediante el uso de un clorofilómetro portátil SPAD-502. El contenido en clorofila o el verdor de las hojas está afectado por una serie de factores, siendo uno de ellos el contenido en nitrógeno de la planta. Por lo tanto, esta herramienta tiene un gran potencial para detectar un déficit nutricional en nitrógeno (Netto *et al.*, 2005). Además, este aparato nos proporciona el índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) fundamentado en modelos matemáticos que permiten evaluar de manera cuantitativa la intensidad verde de la hoja a través de mediciones entre los espectros 650 nm donde hay absorción de luz para la molécula de clorofila y 940nm donde no ocurre dicha observación. Asimismo, se trata de un método no destructivo e instantáneo (Finnan *et al.*, 1997) indicándonos el contenido de clorofila mediante las unidades SPAD (Coste *et al.*, 2010).

La primera medición de clorofila se realizó a los 45 dpi. Los resultados indicaron un mayor contenido en clorofila en las plantas inoculadas con ambos rizobios, seguido del tratamiento inoculado con el endosimbionte TPV08, siendo en penúltimo y en último lugar el tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* y el control, respectivamente (Figura 52).



**Figura 52.** Comparación del contenido en clorofila de los tratamientos en *Phaseolus vulgaris* a los 45 dpi empleando un clorofilómetro portátil SPAD-502.

Estos datos, junto al fenotipo foliar observado, siguen la tendencia percibida a los 22 dpi, donde se observaron indicios de un posible efecto sinérgico entre las dos cepas rizobianas traduciéndose en un mejor desarrollo vegetal en el caso de *Phaseolus vulgaris*. Diversos estudios demuestran que el uso de consorcios bacterianos constituidos por bacterias del género *Rhizobium* y bacterias con potencial PGPB mejoran el desarrollo de diferentes leguminosas como *Pisum sativum* L. y *Lens culinaris* L. (Mishra *et al.*, 2009), *Galega orientalis* (Egamberdieva *et al.*, 2010) y *Phaseolus vulgaris* (Stajković *et al.*, 2011).

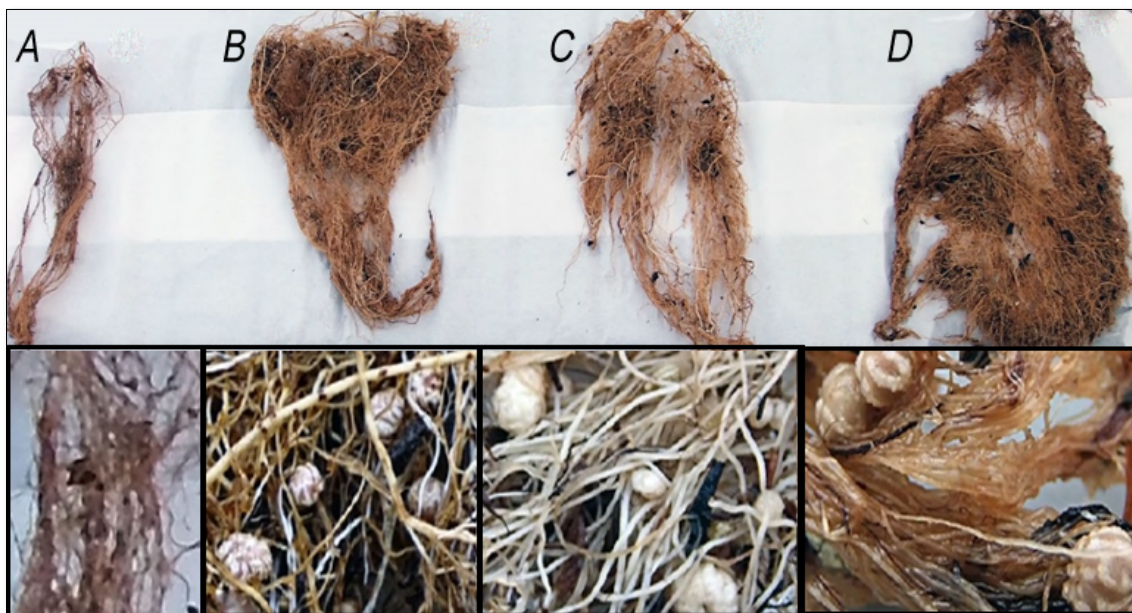
Esta tendencia fenotípica por parte de las plantas co-inoculadas, siguió siendo observable antes de la floración (51dpi), así como en el momento de la recolecta de los experimentos (105 dpi) (Figura 53). Como se observa, las plantas co-inoculadas con ambos rizobios presentaban una coloración foliar variable desde hojas verdes intensas a amarillas-verdosas, al contrario que el resto de los tratamientos. Por su parte, las plantas inoculadas con la cepa endosimbionte TPV08 exhibían hojas de coloración verdosa clara. A pesar de que tratamiento con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> mostrara hojas con una coloración verdosa similar al tratamiento inoculado con la cepa endosimbionte, el follaje era mucho menor en el primer caso. Al contrario que el resto de los tratamientos, el control presentaba el peor fenotipo exhibiendo un número ínfimo de hojas, todas ellas amarillentas.



Figura 53. Características fenotípicas de los diferentes tratamientos en el momento de la recolecta a los 105 dpi.

### 3.2. Análisis del fenotipo radicular.

Otro parámetro que se tuvo en cuenta tras analizar el fenotipo foliar de los diferentes tratamientos, fue la presencia y/o ausencia de nódulos. Tras la recolecta, las raíces de las plantas se lavaron con agua y se procedió a fotografiarlas. Todos los tratamientos presentaron nódulos en mayor o menor cantidad a excepción del tratamiento control (Figura 54), estos resultados se repitieron en los diferentes tratamientos realizados en el tiempo.



**Figura 54.** Aspecto de las raíces de los diferentes tratamientos. En la parte inferior se puede observar la presencia y/o ausencia de nódulos. A) Control sin inocular. B) Tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*. C) Tratamiento inoculado con la cepa endosimbionte TPV08 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. D) Tratamiento inoculado con ambos rizobios.

Como podemos observar, esta variedad de alubia por sí sola no es capaz de nodular en la combinación de turba-vermiculita no estéril que se empleó como sustrato. Sin embargo, al añadir, ya sea mediante inoculaciones simples a cada uno de los rizobios, como en co-inoculación, las raíces presentaron nódulos. En la literatura se ha descrito que *Phaseolus vulgaris* es una leguminosa promiscua ya que numerosas especies bacterianas son capaces de inducir la formación de nódulos (Michiels *et al.*, 1998; Martínez-Romero 2003). Sin embargo, el tipo de variedad verdina que se eligió para este estudio no comparte esta cualidad, y puede ser por ello, que su cultivo se esté viendo mermado.

Por otro lado, estos resultados nos pusieron de manifiesto el posible papel de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* como cepa “helper” del proceso de nodulación de otros simbiontes como en este caso de los posibles rizobios presentes en la turba.

### 3.2.1. Histología nodular.

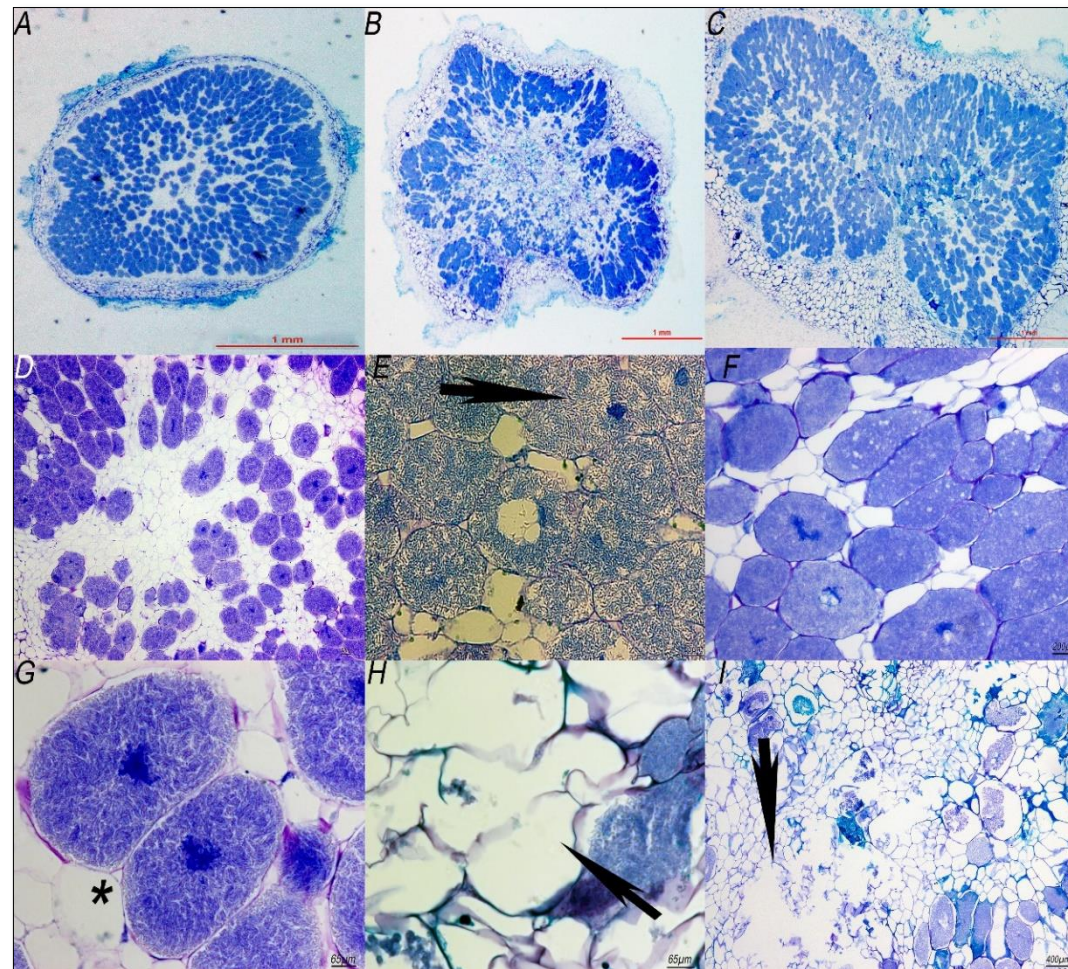
A continuación, se enviaron una serie de nódulos de cada uno de los tratamientos al Servicio de Patología Diagnóstica de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, donde se realizaron diversos cortes de 2-3 micras y se tiñeron con azul de toluidina al 0,01%. Posteriormente, se observaron las estructuras nodulares internas gracias al empleo de un microscopio Nikon Eclipse 80i a diferentes aumentos (Figura 55).

Al observar los nódulos correspondientes a las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08 en primer lugar observamos la morfología típica de un nódulo determinado (Figura 55, A). El interior exhibía una estructura organizada, en donde la mayoría de las células estaban ocupada por simbiosomas que se representan en color azul (Figura 55, A, D, G) a diferencia de las células vacías con coloración blanquecina marcadas con un asterisco (Figura 55, G). De un modo más detallado, observamos que las células con simbiosomas están perfectamente definidas y ocupadas en su totalidad mostrando la morfología típica de una interacción simbiótica.

En cuanto a los nódulos procedentes de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, la morfología interna de estos era irregular y presentaban un tamaño mayor (Figura 55, B) que los nódulos procedentes del tratamiento con la cepa TPV08. Por otro lado, observamos que el centro los mismos estaba dominado por células vacías encontrándose en la periferia las células ocupadas por simbiosomas (Figura 55, B). Una observación más detallada del interior del nódulo nos reveló la presencia de células vegetales ocupadas y vacías cuya pared exhibía una morfología irregular muy diferente a las células observadas de las plantas inoculadas con la cepa TPV08 que se encuentran recuadradas (Figura 55, E.). Asimismo, se observó células blancas cuya pared celular se extendía mostrando un tamaño superior y uniforme (Figura 55, K).

Referente a los nódulos de las plantas inoculadas con ambos rizobios, fueron los que mayor tamaño presentaron respecto al resto de los nódulos analizados (Figura 55, C). A diferencia de los nódulos procedentes del tratamiento con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, el interior mostraba en su totalidad, células ocupadas por simbiosomas (Figura 55 C, F). Asimismo, observamos otras similitudes con los restantes tratamientos analizados. Al igual que en los nódulos procedentes del tratamiento con la cepa TPV08, las células ocupadas por simbiosomas exhibían formas regulares (Figura 55, C, F, I). Al mismo tiempo, y al igual que lo observado en los nódulos procedentes del tratamiento con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, observamos células vacías con morfologías irregulares con un tamaño muy superior al de células vacías observadas en los nódulos del tratamiento de la cepa TPV08 (Figura 55, I).





**Figura 55.** Cortes histológicos realizados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* procedentes de los ensayos de invernadero. A, D, G) pertenecen al tratamiento inoculado con la cepa TPV08. B, E, H) procedentes del tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. C, F, I) proceden del tratamiento inoculado con ambos rizobios. Las fechas y asteriscos hacen referencia a lo explicado en el texto.

Estos datos sugieren que la presencia de células amorfas e irregulares pueden ser debidas a la presencia de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> ya que es un inóculo común a esos dos tratamientos. Además, tal como se demostró en el punto 2, la cepa ALA10B2<sup>T</sup> no es capaz de inducir nódulos por sí misma, pero sí de actuar como endofito (punto 1 del presente capítulo). No obstante, cuando esta se inocula con un rizobio compatible con *Phaseolus vulgaris* ambas bacterias se localizan en el interior del nódulo. A pesar, de la morfología presentada por ambos tratamientos, en ninguno de los casos se observaron síntomas relacionados con enfermedad, siendo el tratamiento inoculado en el que se obtuvieron de manera significativa los mejores resultados.

### 3.3. Análisis de los parámetros de productividad.

En la Tabla 47 se encuentran recogidos los diferentes parámetros analizados relacionados con la productividad de los tres ensayos llevados a cabo y separados en el tiempo. Es importante destacar que en todos los parámetros analizados los mejores resultados se obtuvieron en las plantas inoculadas con ambos rizobios. El peso medio de las semillas representa la media de los valores obtenidos por tratamiento y por ensayo. Los resultados fueron estadísticamente superiores en el caso de las plantas co-inoculadas, seguidos de las plantas inoculadas con el endosimbionte natural *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* TPV08, seguidas del tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> siendo las semillas con el menor peso las procedentes del tratamiento control.

En relación con la producción en (%), el tratamiento control representa el 100%, obteniéndose una producción del 200%, casi 300% y más de 500% en los tratamientos inoculados con las cepas simples ALA10B2<sup>T</sup>, TPV08 y las plantas coinoculadas respectivamente. Este incremento se debe al mayor número de vainas obtenidas en los tratamientos inoculados con respecto al control, así como al número de semillas obtenidas.

A pesar de que el porcentaje de número de semillas obtenidos en el tratamiento de las plantas co-inoculadas no fuera muy superior con respecto al tratamiento inoculado con la cepa TPV08, sí presentaron un mayor peso que en el resto de los tratamientos.

**Tabla 47.** Parámetros analizados tras la recolecta de los tres experimentos llevados a cabo bajo condiciones de invernadero con *Phaseolus vulgaris*.

Parámetros de productividad				
Tratamiento	Nº de vainas %	Nº de semillas%	Peso medio semillas (g) ± S.E	Producción %
Control	100	100	7,0±0,7 <sup>a</sup>	100
ALA10B2 <sup>T</sup>	193,3	287,2	13,4±1,2 <sup>b</sup>	308,5
TPV08	246,6	339,4	26,8±0,6 <sup>c</sup>	398,7
Coinoculación	276,2	370,4	31,6±2,4 <sup>d</sup>	626,3

Valores seguidos de la misma letra no son significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un efecto sinérgico entre ambos rizobios, traduciéndose en una mejora no solo del desarrollo vegetal como se ha expuesto en el punto anterior, sino también de la producción de *Phaseolus vulgaris*.

### 3.4. Análisis del contenido nutricional del grano de alubia.

Una vez finalizado los diferentes ensayos de invernadero y con el fin de evaluar las posibles mejoras nutricionales de los granos de alubia procedentes de los diferentes tratamientos, se enviaron un total de 3 replicas por tratamiento y por ensayo al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 48.

**Tabla 48.** Concentración del contenido ionómico de los minerales presentes en el grano de alubia de los diferentes tratamientos. Los valores representan la media con  $\pm$  el error estándar.

Tratamiento	Ca (g/100g)	K (g/100g)	Mg (g/100g)	P (g/100g)	S (g/100g)
Control	0,15 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	1,57 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,15 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>
ALA10B2 <sup>T</sup>	0,18 $\pm$ 0,02 <sup>bc</sup>	1,74 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	0,14 $\pm$ 0,0	0,60 $\pm$ 0,007	0,18 $\pm$ 0,003 <sup>ab</sup>
TPV08	0,21 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>	1,66 $\pm$ 0,06 <sup>cd</sup>	0,15 $\pm$ 0,003	0,62 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>
Coinoculación	0,21 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>	1,84 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	0,15 $\pm$ 0,006	0,61 $\pm$ 0,015 <sup>*</sup>	0,20 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
Tratamiento	N (mg/100g)	Mn (mg/Kg)	C (mg/Kg)		
Control	3,8 $\pm$ 0,04	25,25 $\pm$ 0,61 <sup>c</sup>	2,99 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>		
ALA10B2 <sup>T</sup>	4,3 $\pm$ 0,01	25,9 $\pm$ 0,87 <sup>c</sup>	3,26 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>		
TPV08	4,75 $\pm$ 0,006	28,28 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	4,07 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>		
Coinoculación	7,14 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	31,45 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	4,33 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>		

Valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos a  $P \leq 0.05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Los resultados obtenidos tras el análisis nos indicaron que, tanto los tratamientos inoculados con las inoculaciones simples como aquellas plantas inoculadas con ambos rizobios permanecían o mejoraban alguno de los oligoelementos analizados con respecto al tratamiento control.

Los datos procedentes del tratamiento con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> nos mostraron un incremento en el aporte de N, Ca, K y P, manteniéndose en un mismo nivel las concentraciones de S y Mg con respecto al control.

Por otro lado, observamos que el tratamiento con la cepa TPV08 mostraba mejoras nutricionales significativas en el aporte de N en comparación con el tratamiento control y el tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. Asimismo, la mayor concentración de Ca del grano se observó en este tratamiento, mientras que el resto de los elementos se mantuvo a la misma concentración que los granos procedentes de las plantas control, a excepción del K y P. Como ya se ha mencionado, esta mejora en el valor nutricional de los granos pueden ser fruto de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal descritos en los capítulos I y II de la presente tesis doctoral. Del mismo modo que en el tratamiento anterior, las plantas co-inoculadas exhibieron una mayor concentración en nitrógeno significativamente mayor que el resto de los tratamientos. En cuanto al resto de elementos, cabe destacar que el tratamiento de la co-inoculación mejoró de manera significativa el contenido en P presentes en el grano de la alubia, así como los valores de K, Mg y S respecto al resto de tratamientos. En el caso del contenido en Ca se mantuvo en los mismos valores que en los obtenidos en las plantas control.

#### 4. Estudio del efecto de *Rhizobium cellulosilyticum* junto a simbioses de leguminosas forrajeras en condiciones de invernadero.

Los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo en condiciones de invernadero con *Phaseolus vulgaris*, así como la observación del comportamiento de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> durante los primeros estadios simbióticos con diferentes leguminosas descritos en el apartado 1, nos hizo plantear si esta cepa rizobiana era capaz de actuar de “*helper*” y provocar los mismos efectos que los observados en *Phaseolus vulgaris* en otras leguminosas como el trébol o la alfalfa. Para discernir esta hipótesis, se seleccionaron como endosimbiontes la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* simbiote de *Trifolium repens* y la cepa 1021 de *Ensifer meliloti* simbiote de *Medicago sativa*. Para ello, se siguieron los mismos pasos que en el caso anterior, es decir, se llevaron a cabo cuatro tratamientos diferentes, un control sin inocular, un tratamiento inoculado con cada uno de las bacterias de manera individual y un tratamiento co-inoculado con ambas. A diferencia de los ensayos de invernadero llevados a cabo con *Phaseolus vulgaris*, en este caso se utilizó como sustrato vermiculita esterilizada y los tratamientos se regaron con una solución nutritiva carente de fuente de nitrógeno. La duración de los ensayos fue de 3 meses y los datos corresponden a un ensayo por leguminosa (n=35).

Como se puede apreciar en las Figuras 56 y 57, las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con ambos rizobios así como la cepa 1021 exhibían un fenotipo verdoso en comparación con el resto de tratamientos. Además, se puede apreciar una mayor frondosidad de las plantas tratadas con ambos rizobios que las plantas inoculadas con la cepa 1021 de *Ensifer medicae* (A). Tras la recolecta, otro de los parámetros que se tuvo en cuenta fue la ausencia o presencia de nódulos en los diferentes tratamientos. Los resultados muestran que sólo las plantas coinoculadas, como las inoculadas con la cepa simbiote exhibieron nódulos (B) siendo mayor el número de nódulos por planta en el tratamiento co-inoculado (Tabla 49).

Seguidamente, se procedió a evaluar diferentes parámetros relacionados con el desarrollo vegetal como son la longitud aérea y el peso seco. En la Figura 56 se muestra un representante de cada uno de los tratamientos. Se puede observar que las plantas inoculadas con ambos rizobios presentaban un mayor porte vegetal, así como una mayor frondosidad foliar, seguido del tratamiento inoculado con la cepa de *Ensifer medicae* 1021, observándose los peores fenotipos en los tratamientos correspondientes al control y las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>.

El análisis estadístico (Tabla 49) muestra que las plantas coinoculadas exhibieron un mayor número de nódulos en comparación con las plantas inoculadas con la cepa 1021. Asimismo, el desarrollo vegetal de las plantas con ambos rizobios presentó un incremento significativo en comparación con el resto de los tratamientos, traduciéndose en un peso seco significativamente mayor en comparación con el tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> y el tratamiento control.



**Figura 56.** Características fenotípicas de los diferentes tratamientos de *Medicago sativa* en el momento de la recolecta. A) Aspecto de las plantas en el invernadero. B) Aspecto de las raíces de cada uno de los tratamientos en donde se puede apreciar la presencia de nódulos en los tratamientos inoculados con la cepa ANU843 y con ambos rizobios.



Figura 57. Aspecto de las plantas de *Medicago sativa* en momento de la recolecta.

Los datos obtenidos tras la realización del experimento se encuentran en concordancia con lo observado en los ensayos llevados a cabo en *Phaseolus vulgaris*, observándose un mejor desarrollo y en consecuencia una mejor productividad de las plantas inoculadas con ambos rizobios.

En las Figuras 58 y 59, se muestran las plantas de *Trifolium repens* en el momento de la recolecta. En concordancia con el resto de las leguminosas analizadas, el tratamiento con ambos rizobios exhibía un mejor fenotipo en comparación con el resto de los tratamientos. De igual manera que en el caso del ensayo con *Medicago sativa*, en el momento de la recolecta se observó la ausencia o presencia de nódulos en los diferentes tratamientos. Los resultados muestran que sólo las plantas coinoculadas, como las inoculadas con la cepa simbiote exhibieron nódulos (Figura 58, B). A diferencia de las plantas de *Medicago sativa*, el mayor número de nódulos se obtuvo en las plantas inoculadas con la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 (Tabla 49).



**Figura 58.** Características fenotípicas de los diferentes tratamientos de *Trifolium repens* en el momento de la recolecta. A) Aspecto de las plantas en el invernadero. B) Aspecto de las raíces de cada uno de los tratamientos en donde se puede apreciar la presencia de nódulos en los tratamientos inoculados con la cepa 1021 y con ambos rizobios.



Figura 59. Aspecto de las plantas de *Trifolium repens* en momento de la recolecta.

De igual manera, se procedió a evaluar diferentes parámetros relacionados con el desarrollo vegetal como son la longitud aérea y el peso seco. En la Figura 59 se muestra un representante de cada uno de los tratamientos. Se puede observar que las plantas inoculadas con ambos rizobios presentaban un mayor porte vegetal, así como una mayor frondosidad foliar, seguido del tratamiento inoculado con la cepa ANU843, observándose los peores fenotipos en los tratamientos correspondientes al control y las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>.

A pesar de que el tratamiento inoculado con ambos rizobios presentará un menor número de nódulos que el tratamiento inoculado con la cepa ANU843, no afectó al desarrollo de las plantas, ya que las variables analizadas exhibieron un mejor resultado (Tabla 49).

Tabla 49. Estudio estadístico de los parámetros analizados en los ensayos de invernadero en *Medicago sativa* y *Trifolium repens*.

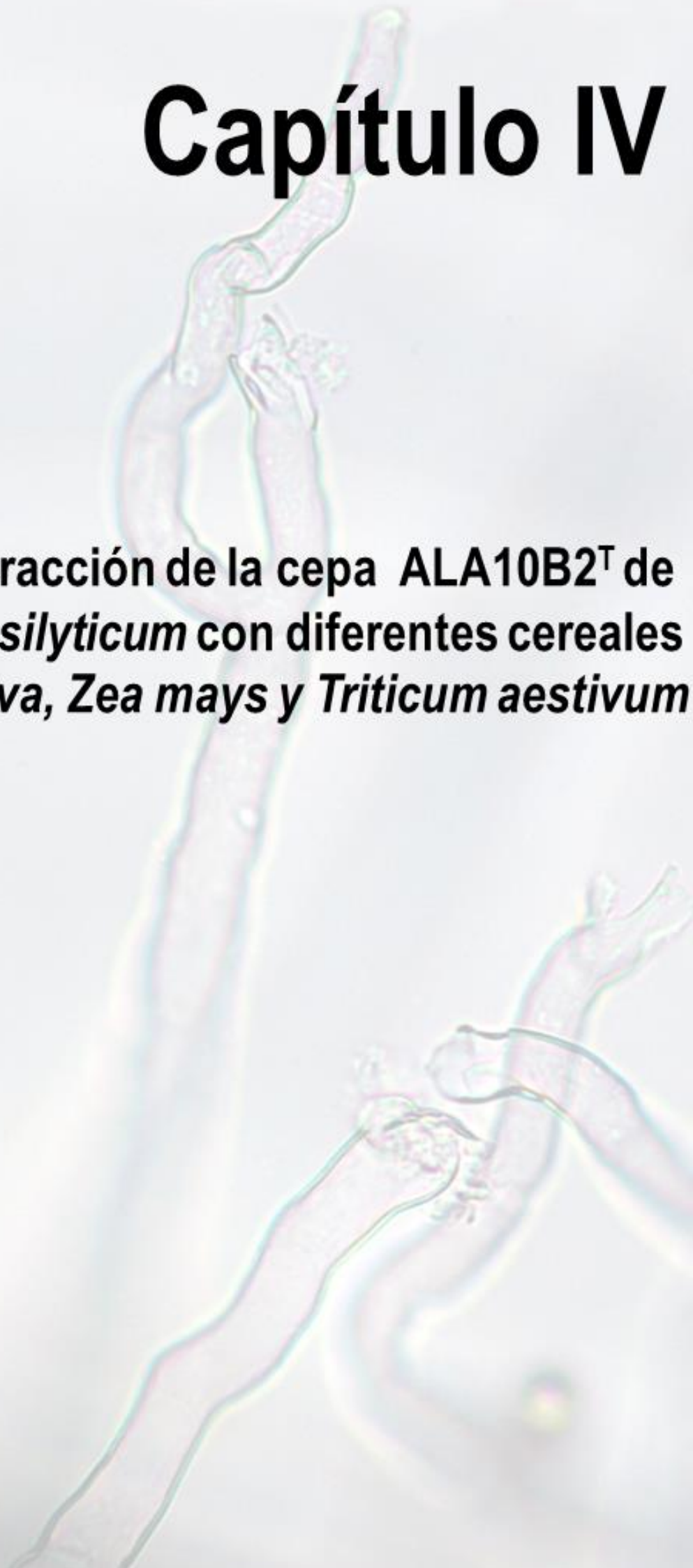
Leguminosa	Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Peso seco (g)	Nódulos/planta
<i>Medicago sativa</i>	Control	8,856±0,27	14,46±0,53 <sup>ab</sup>	0
	ALA10B2 <sup>T</sup>	6,027±0,28	16,34±0,39 <sup>ab</sup>	0
	1021	24±0,77	35,87±1,1 <sup>a</sup>	22
	Coinoculación	30,87±1,58 <sup>*</sup>	34,7±0,53 <sup>b</sup>	33
<i>Trifolium repens</i>	Control	3,7±0,24	0,07±0,001 <sup>ab</sup>	0
	ALA10B2 <sup>T</sup>	3,7±0,24	0,05±0,003 <sup>ab</sup>	0
	ANU843	10,6±0,34	0,23±0,02 <sup>a</sup>	41
	Coinoculación	18,01±0,78 <sup>*</sup>	0,27±0,01 <sup>b</sup>	20

Valores marcados con un (asterisco \*) y/o seguidos de la misma letra son significativos a P≤0.05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).



# Capítulo IV

**Análisis de la interacción de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosityticum* con diferentes cereales como *Avena sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum***





Los cereales son de una gran importancia agronómica a nivel mundial. A pesar de los diferentes tipos existentes, el 94% del consumo humano lo representan el trigo *Triticum aestivum*, el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*) (FAO, 2012). Además, los cereales constituyen la alimentación base del sector pecuario, que junto con la agricultura constituyen ejes de gran importancia en la economía española. Según lo establecido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://www.mapa.gob.es/fr/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/cereales/default.aspx>) Castilla y León es una de las principales regiones cerealistas, que dedica el 34% de su superficie al cultivo de cereales siendo las principales explotaciones de trigo, cebada, avena y maíz. Por ello, y por los efectos beneficiosos observados en leguminosas (ver capítulo III) por parte de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, se decidió evaluar su comportamiento con el trigo (*Triticum aestivum*), el maíz (*Zea mays*) y la avena (*Avena sativa*).

## 1. Estudio de la capacidad de colonización e infección de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en diferentes cereales.

El uso de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* como bioinoculantes, no sólo se reduce a la mejora de leguminosas, ya que desde que se comprobó que poseían mecanismos promotores del crecimiento vegetal, se han empleado para la mejora de plantas no leguminosas, y más específicamente cereales como *Oriza sativa* (Yanni *et al.*, 2001), *Zea mays* (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001) y *Triticum aestivum* exhibiendo resultados de mejora en el desarrollo vegetal.

Para evaluar el comportamiento de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> con los cereales seleccionados, se realizaron estudios similares a los llevados a cabo en el capítulo III, es decir, se emplearon la cepa salvaje (ALA10B2<sup>T</sup>\_WT) y la cepa marcada con la proteína fluorescente roja (ALA10B2<sup>T</sup>\_RFP). Asimismo, y siguiendo las pautas establecidas en el estudio de la interacción con planta leguminosas (ver capítulo III), se llevó a cabo una observación microscópica de cada una de las interacciones estimando un período de observación de 7 y 15 dpi.

A continuación, se detallan de manera separada la colonización y formación de biofilms, como los cambios morfológicos observados. Debido a que este es el primer estudio sobre la interacción de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> con los cereales seleccionados, se decidió evaluar si esta cepa era capaz de inducir cambios morfológicos en los pelos radicales y si estos a su vez eran parecidos a los observados en su interacción con las diferentes leguminosas (ver capítulo III). En la Tabla 51 se recogen los cambios morfológicos observados en los pelos radicales de los cereales seleccionados para este estudio.

**Tabla 51.** Fenotipos radiculares simbióticos observados en las raíces de *Avena sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum* por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia del fenotipo en comparación con las plantas control.

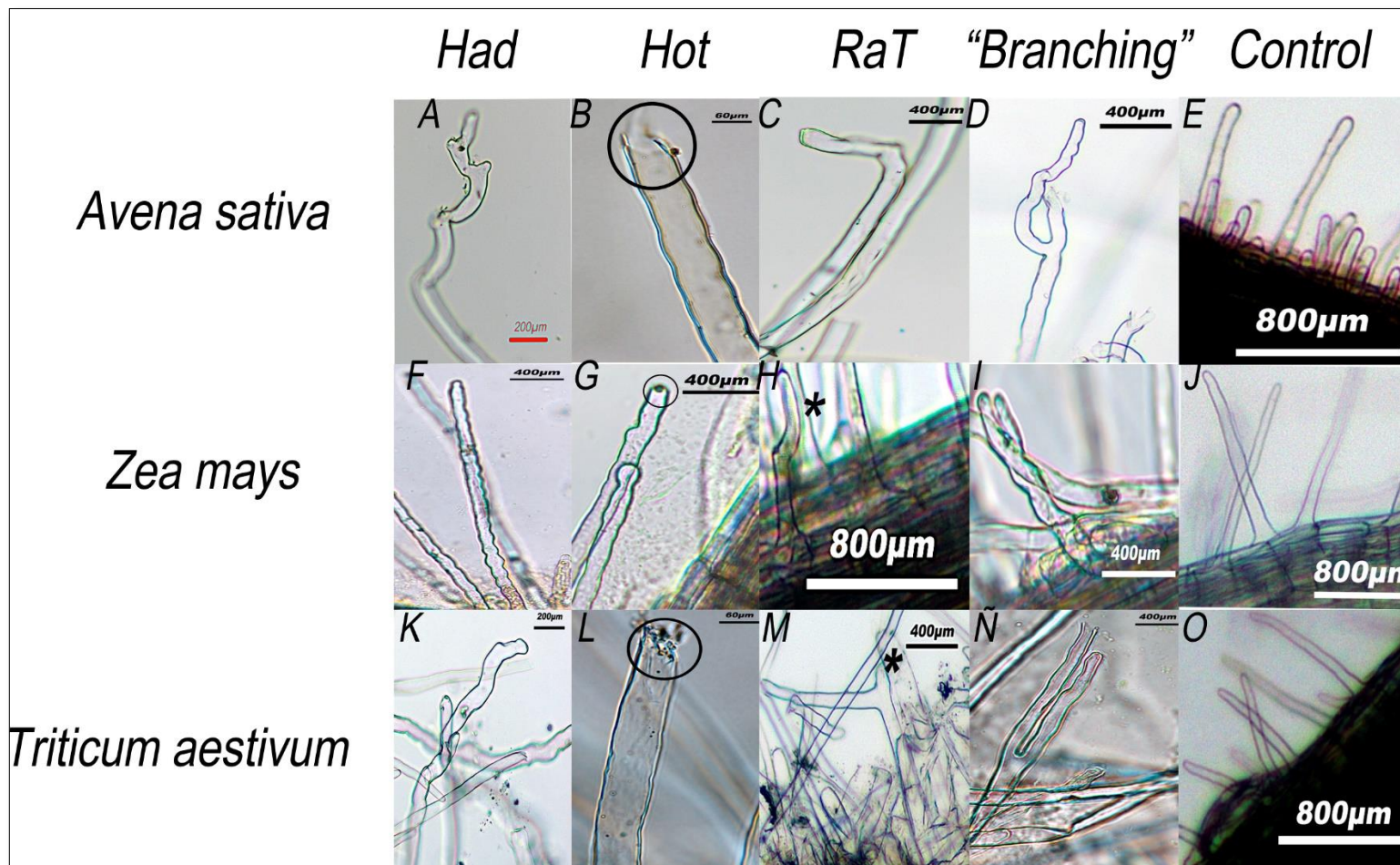
Cereal	Dpi	Fenotipos				
		Had	RaT	Hot	Branched	Hac
<i>Avena sativa</i>	7	+	+	+	+	-
	15	+	+	+	+	-
<i>Zea mays</i>	7	+	+	+	+	-
	15	+	+	+	+	-
<i>Triticum aestivum</i>	7	+	+	+	+	-
	15	+	+	+	+	-

Los cambios morfológicos observados en los pelos radicales indican la existencia de una interacción entre los cereales y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, ya que los pelos radicales de las plantas control no presentan ningún cambio morfológico (Figura X, E, J, O). Es importante destacar que, estos cambios morfológicos se apreciaron desde el inicio del experimento (7dpi) hasta el final de este (15dpi). Asimismo, estos fenotipos fueron muy similares a los observados en la interacción de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* con las leguminosas *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris* (ver capítulo III).

En todos los cereales, se observaron deformaciones de los pelos radicales (Figura 60, A, F K), cuyo fenotipo sería homólogo a las deformaciones englobadas en el fenotipo Had observado en las interacciones con leguminosas. Otro fenotipo en común fue la observación del fenotipo Hot (Figura 60, B, G L) así como la observación del fenotipo RaT (Figura 60, C, H, M).

Por otro lado, en las interacciones de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> con los cereales, no se observó como en el caso de la interacción con las leguminosas, la formación continuada de “curlings” ni cambios morfológicos relacionados con el fenotipo Hac o el característico cayado de pastor, lo que resulta lógico en el caso de los cereales.

Por el contrario, se observó un fenotipo no descrito en las interacciones de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> con leguminosas, el fenotipo “root hair branching” (Figura 60, D, I, Ñ) o crecimiento de la punta del pelo radical en dos “ramas” o bifurcaciones. Este fenotipo se ha descrito en la interacción de *Azospirillum* con cereales tales como el trigo y el maíz y otros cultivos hortícolas con el tomate y plantas herbáceas (Dobbelaere and Okon 2007).



**Figura 60.** Microfotografías de los cambios morfológicos observados en las raíces de *Avena sativa* (A-D), *Zea mays* (F-I) y *Triticum aestivum* (K-Ñ), tras la inoculación de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> en comparación con los pelos radicales de las plantas control (E, J, O) de cada uno de los cereales respectivamente. Todas las microfotografías están realizadas mediante el uso del microscopio óptico a los 7 dpi. Los círculos indican la presencia del fenotipo Hot o decapitación de la punta de los pelos radicales. Los asteriscos indican la presencia del fenotipo RaT. Los diferentes fenotipos observados hacen referencia a lo explicado en el texto.

En cuanto a la capacidad de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> para colonizar y formar biofilms *in planta*, los datos se encuentran recogidos en la Tabla 52.

**Tabla 55.** Fenotipos radiculares observados en las raíces de *Avena sativa*, *Zea mays* y *Triticum aestivum* observados tras la inoculación de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* relacionados con los procesos de colonización y formación de biofilms. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia.

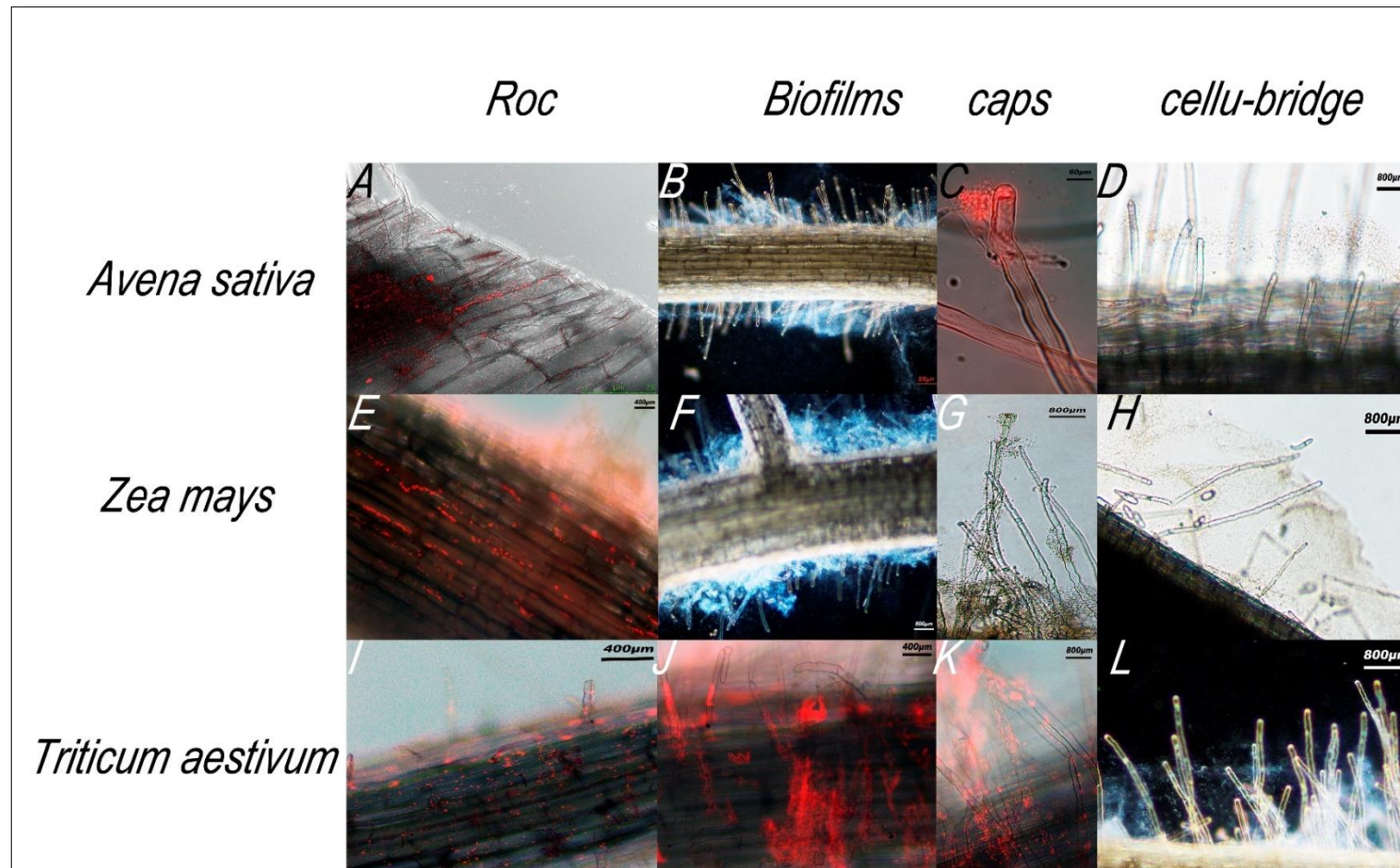
Cereal	Fenotipos				
	Dpi	Roc	Biofilms	"cellu-bridge"	"caps"
<i>Avena sativa</i>	7	+	+	+	+
	15	+	+	+	+
<i>Zea mays</i>	7	+	+	+	+
	15	+	+	+	+
<i>Triticum aestivum</i>	7	+	+	+	+
	15	+	+	+	+

Mediante el empleo de diferentes técnicas de microscopía, se pudo observar el comportamiento de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* con los cereales seleccionados.

De manera similar, al comportamiento común observado por parte de esta cepa con plantas leguminosas y cereales, encontramos un patrón común en relación a su capacidad para colonizar como formar biofilms *in planta*. En este sentido, se observó una gran capacidad colonizadora de la superficie radicular de los cereales seleccionados, haciendo alusión al fenotipo Roc (Figura 61, A, E, I).

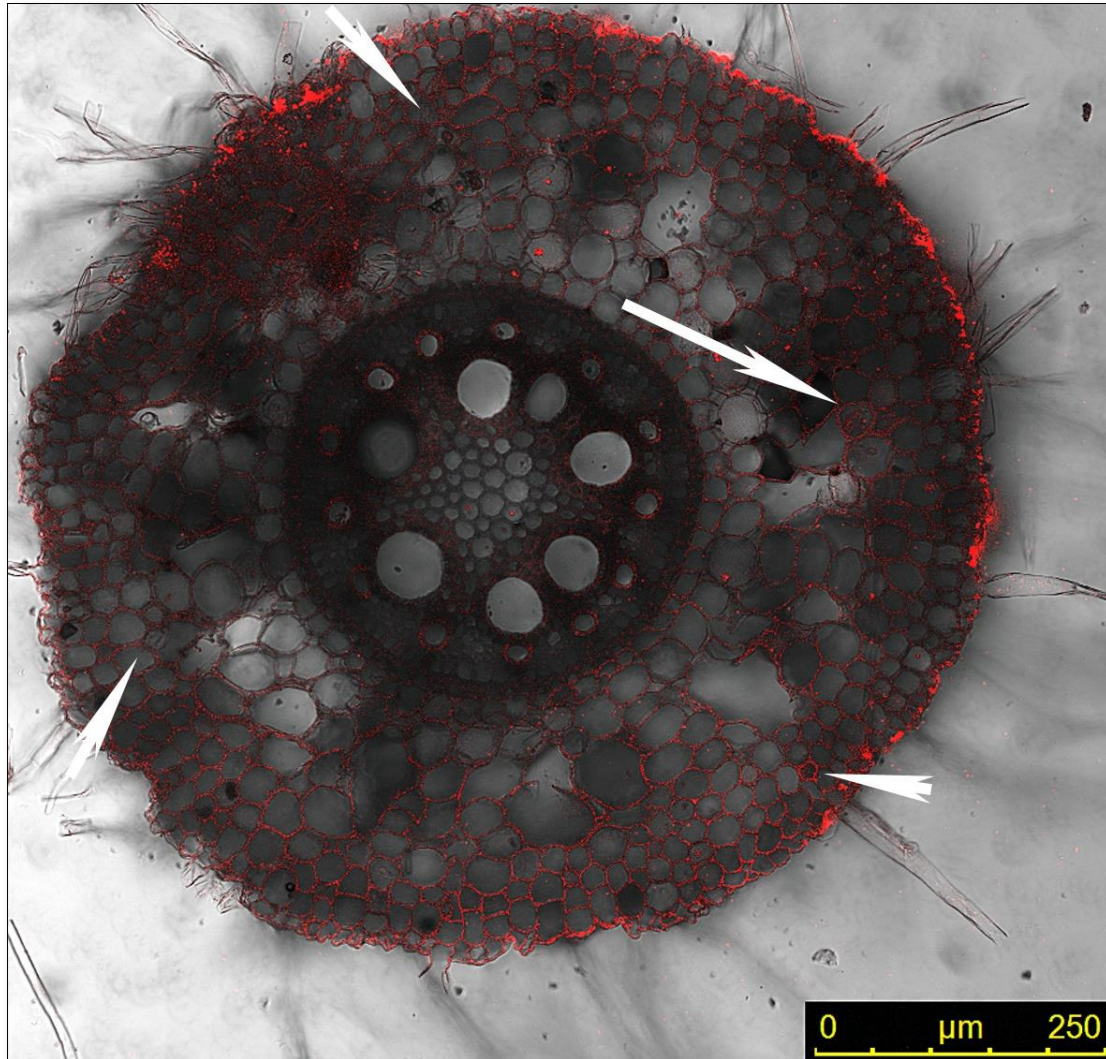
Otros comportamientos comunes observados a nivel radicular en plantas leguminosas como en cereales, es la gran formación de biofilms (Figura 61, B, F, J), la adhesión y acumulación de bacterias a la punta de los radicales (formación de "caps") (Figura 61, C, G, K), así como los "puentes de celulosa" denominados en el capítulo de las leguminosas como fenotipo cellu-bridge (Figura 61, D, H, L).

Todos estos datos ponen de manifiesto, la posible existencia de un patrón de comportamiento por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> en presencia de diferentes cultivos de interés agronómico con son las plantas leguminosas y los cereales analizados en el presente capítulo. No obstante, estos resultados se abordarán de un modo más detallado en el apartado de la discusión general.



**Figura 61.** Microfotografías de la colonización de ALA10B2T en las raíces de *Avena sativa* (A-D), *Zea mays* (E-H) y *Triticum aestivum* (I-L). A los 7 dpi se observó la colonización de la superficie radical (fenotipo Roc) (A, E, I) mediante el uso de la microscopía de fluorescencia. La formación de biofilms también se observó con dicha técnica (J) en las raíces de *Triticum aestivum* y mediante el uso de la luz polarizada en las raíces de *Zea mays* (F) y *Avena sativa* (B). La cepa ALA10B2T también es capaz de adherirse a la punta de los pelos apicales formando los denominados “caps” (C, G, K). Las microfotografías D, H y L muestran la formación del fenotipo propuesto cellu.-bridge.

Tal y como se ha descrito anteriormente, se observó una gran colonización en la superficie radicular de los cereales seleccionados. Sin embargo, en las observaciones mediante microscopía confocal, en el caso de las raíces de *Zea mays* se observó una penetración interna a nivel intercelular, localizada fundamentalmente en las primeras capas de las células del córtex (Figura 62). Este comportamiento se ha observado en otras cepas del género de *Rhizobium* en interacción con plantas de *Zea mays* (Celador-Lera, TD, 2018), poniendo de manifiesto un gran potencial de este género bacteriano como posibles endófitos de plantas no leguminosas.

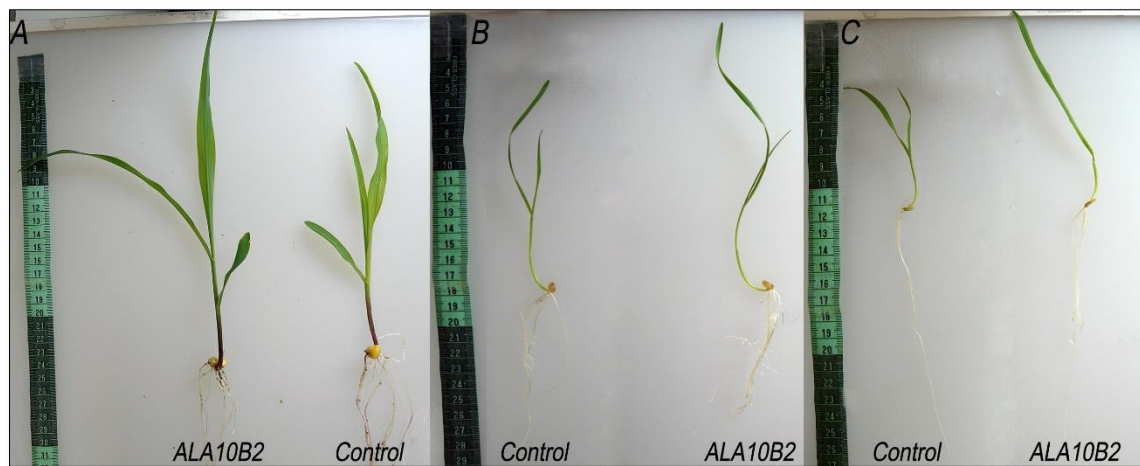


**Figura 62.** Microscopía confocal de cortes transversales de las raíces de *Zea mays* tras la inoculación con la cepa ALA10B2T\_RFP de *Rhizobium cellulosilyticum* a los 15 dpi. La coloración roja de la imagen corresponde con las bacterias de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2T ya que están marcada con el plásmido pBHR-mRFP que codifica para una proteína roja fluorescente (RFP) de manera constitutiva.



## 2. Estudio del efecto de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> como bacteria PGPB en cámara iluminada empleando diferentes cereales.

Debido a la capacidad colonizadora de las raíces de los cereales por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, así como a sus potenciales mecanismos PGPRs descritos en los capítulos anteriores (ver capítulo I, II y III). Se decidió evaluar si esta cepa bacteriana era capaz de incrementar el desarrollo vegetal de *Zea mays*, *Avena sativa* y *Triticum aestivum* durante los primeros estadios del desarrollo vegetal y bajo condiciones controladas de laboratorio. Para ello, se tomaron como parámetros la longitud aérea y radicular y se siguieron los pasos descritos en el apartado de materiales y métodos de la presente tesis doctoral (5.6.). Se estimó un período de observación del desarrollo vegetal a los 12 dpi de todos los cereales. Transcurrido ese tiempo, las plantas inoculadas exhibieron un mejor fenotipo que las plantas control (Figura 63).



**Figura 63.** Fenotipo de los diferentes cereales a 12 dpi. A) Plántulas de *Zea mays*. B) Plántulas de *Triticum aestivum*. C) Plántulas de *Avena sativa*.

En concordancia con los diferentes fenotipos observados, el análisis estadístico nos mostró un incremento significativamente mayor del desarrollo de la parte aérea por parte de las plántulas de los distintos cereales inoculados con la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en comparación con las cepas sin inocular (Tabla 53).

Por otro lado, también se observó un incremento significativo en la longitud del sistema radicular de las plántulas de *Zea mays* y *Triticum aestivum* (Tabla 53). No obstante, en el caso de las plántulas de *Avena sativa* la longitud del sistema radicular de las plantas inoculadas fue mayor, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el control sin inocular.

**Tabla 53.** Parámetros analizados tras los ensayos en cámara iluminada de los cereales seleccionados.

Cereal	Tratamiento	Longitud parte aérea (cm)	Longitud parte radicular (cm)
<i>Zea mays</i>	Control	23,3±0,768	17,6±0,876
	ALA10B2 <sup>T</sup>	31±123*	22,6±0,563*
<i>Avena sativa</i>	Control	10,91±0,267	12,26±0,356
	ALA10B2 <sup>T</sup>	13,15±0,322*	12,9±0,743
<i>Triticum aestivum</i>	Control	12,64±1,255	18,25±0,286
	ALA10B2 <sup>T</sup>	31±0,424*	22±0,238*

Los valores muestran la media y el error estándar de 12 plantas ( $\pm$ S. E) por tratamiento y variable. Los valores marcados con asterisco son estadísticamente significativos a  $P \leq 0,05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

Los resultados obtenidos en los primeros estadios del desarrollo vegetal de las plántulas de los diferentes cereales pueden ser debidos a los mecanismos PGPRs descritos en la presente tesis doctoral por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. No obstante, estos resultados se abordarán con más detalle en la discusión general.

### 3. Ensayos de microcosmos en invernadero.

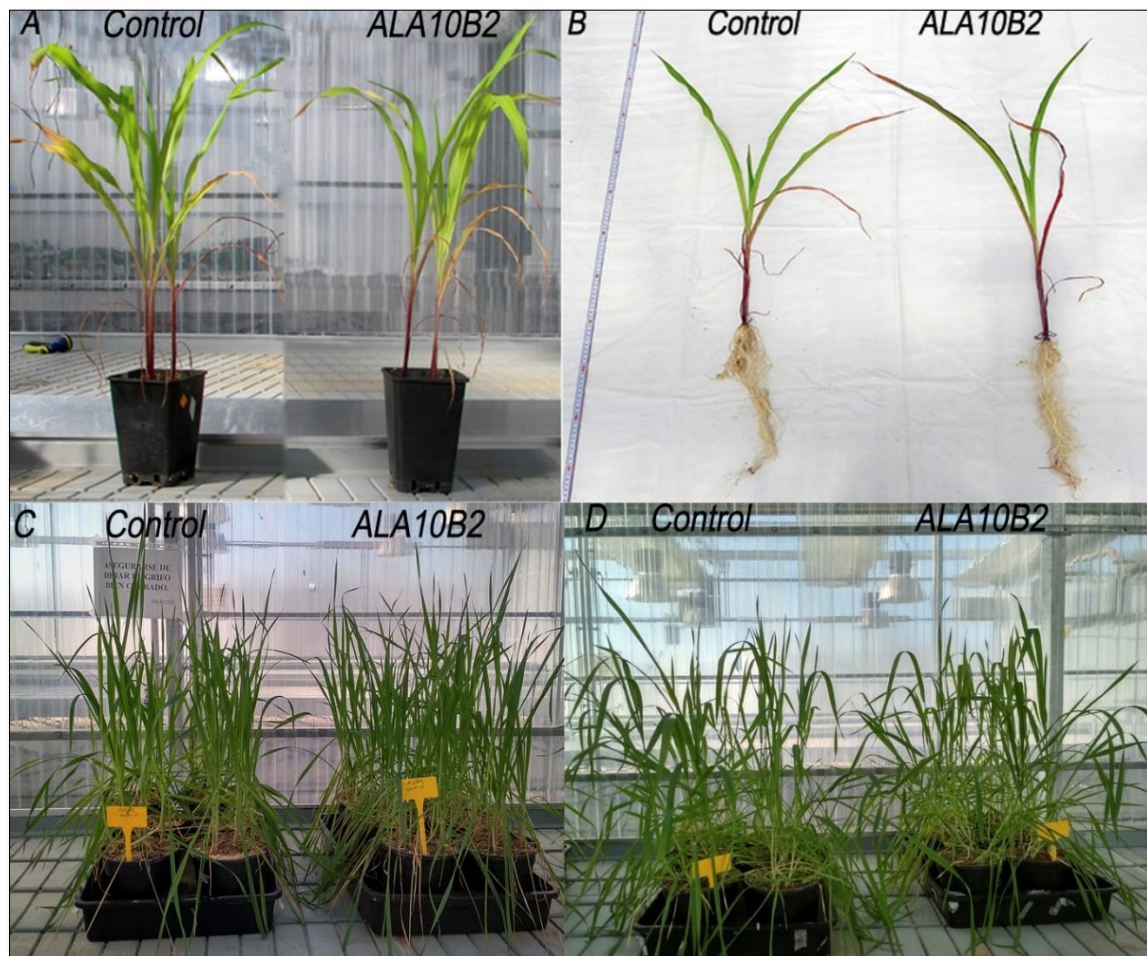
Conforme a los resultados obtenidos en la fase previa, se decidió realizar un ensayo bajo condiciones controladas de invernadero para analizar el efecto de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en los cereales seleccionados.

Para este estudio se emplearon como sustratos dos suelos procedentes de dos localidades diferentes. Por un lado, se recogió suelo cerca del río Tormes con el objetivo de emplear condiciones similares a las del cultivo del maíz. Por otro lado, se recogió suelo del municipio abulense de Cisla, donde se cultiva de manera rutinaria cereales como el trigo y la avena. Estos ensayos tuvieron una etapa de desarrollo corta, 44 días post inoculación para el maíz y 38 días en el caso del trigo y la avena, por lo que no se pudo llegar a producción debido principalmente a la limitación de espacio y de nutrientes. Los diferentes cultivos se regaron con agua a demanda y nunca se añadió fertilizantes químicos.

Los tratamientos empleados fueron los mismos que en la etapa anterior, un control sin inocular y un tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*. Los experimentos se observaron de manera rutinaria.

En el momento de la recolecta ninguno de los cereales empleados en este estudio, presentaron sintomatologías relacionadas con enfermedades o con déficit nutricional (Figura 64) En el caso de las plantas de maíz los parámetros que se evaluaron fueron la longitud de la parte aérea, radicular y el contenido en clorofila. Sin embargo, en el caso del trigo y la avena sólo se tuvieron en cuenta la longitud de la parte aérea y el contenido en clorofila.

**Figura 64.** Fenotipos de los diferentes cereales empleados en este estudio en el momento de la recolecta. A) Fenotipo de las plantas de *Zea mays* en las macetas a los 44 dpi. B) Plantas de *Zea mays* extraídas de la maceta. C) Fenotipo de las plantas de *Avena sativa* a los 38 dpi. D) Fenotipo de las plantas de *Triticum aestivum* a los 38 dpi.



Los resultados obtenidos tras la recolecta de los diferentes cereales se encuentra recogidos en la Tabla 54. Siguiendo la misma tendencia que los resultados observados en los ensayos llevados a cabo en cámara iluminada, las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* mostraron mejores resultados que las plantas control.

**Tabla 54.** Datos obtenidos tras la recolecta de los distintos cereales empleados en este estudio a los 35 dpi en el caso de la avena y del trigo. En el caso del maíz a los 59 dpi.

Cereal	Tratamiento	Longitud parte aérea (cm)	Clorofila (Unidades SPAD)
<i>Zea mays</i>	Control	82,88±1,29	12,19±0,41
	ALA10B2 <sup>T</sup>	83,83±0,701	15,06±0,56
<i>Avena sativa</i>	Control	50,8±0,872	36,1±0,488
	ALA10B2 <sup>T</sup>	52,9±1	37,2±0,596
<i>Triticum aestivum</i>	Control	62,13±1,23	32,34±0,45
	ALA10B2 <sup>T</sup>	68,26±0,918*	34,37±0,696*

Los valores muestran la media y el error estándar de 12 plantas (±S. E) por tratamiento y variable. Los valores marcados con asterisco son estadísticamente significativos a P≤0,05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

De manera general, los datos estadísticos indicaron un mayor desarrollo de la parte aérea así con un mayor contenido en clorofila de las plantas inoculadas. Sin embargo, esta diferencia

entre ambos tratamientos no fue significativa en términos estadísticos. Estos estudios son una aproximación y un paso previo necesario a los ensayos de campo, ya que, en este caso, los tres cereales seleccionados son anuales.

#### 4. Ensayo de campo con plantas de *Zea mays*.

El cultivo de cereales a nivel mundial se está viendo afectado a causa del efecto invernadero, ya que el aumento global de las temperaturas afecta de manera negativa al rendimiento de estos (Gong *et al.*, 2015). El maíz es un cereal de gran importancia mundial, y como planta C4 tiene un gran potencial de rendimiento, siendo susceptible de liderar el podio en cuanto a producción mundial en 2020 (Jones 2009).

El ensayo se llevó a cabo en un campo dedicado al cultivo anual de maíz situado en el municipio salmantino de Pino de Tormes (Figura 65). Para este estudio, se emplearon dos parcelas distintas, una se mantuvo en las mismas condiciones empleadas por el agricultor, es decir, con una fertilización previa a la siembra del maíz. En la otra parcela las condiciones fueron similares, pero, en este caso el suelo no se fertilizó. Para asegurar estas condiciones el agricultor nos habilitó una zona en la que nunca se habían añadido fertilizantes al suelo.



**Figura 65.** Localización de las dos parcelas empleadas para el ensayo de campo. El rectángulo rojo indica la parcela en que se trato con fertilizantes, mientras que el rectángulo azul muestra la parcela sin fertilizar.

Ambos tratamientos constan de tres réplicas y se diseñaron tres subparcelas por cada tratamiento. Durante el desarrollo del experimento, se llevó a cabo una observación rutinaria y la duración del ensayo comenzó en el mes de mayo hasta diciembre. A los 215 dpi se procedió a la recogida y el análisis de los distintos parámetros evaluados.

#### 4.1. Análisis de los elementos fertilizantes de los suelos agrícolas.

Previamente a la siembra, se recogieron muestras de ambas parcelas para evaluar el contenido nutricional de ambos suelos agrícolas. Una vez recogidas se mandaron al Servicio de ionómica (CEBAS-CSIC). Los resultados mostraron que tanto el contenido de los principales constituyentes del suelo (Tabla 55) como el contenido ionómico de los minerales (Tabla 56) fueron similares entre ambas parcelas, siendo algo superiores en la parcela sin fertilizar.

**Tabla 55.** Concentraciones del contenido de los nutrientes esenciales primarios y secundarios. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar.

Suelo	N-total (g/100g)	C-total (g/100g)	K (g/100g)	P (g/100g)	Ca (g/100g)	Mg (g/100g)	S (mg/Kg)
Sin fertilizar	0,08 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,07*	0,32 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01*	2 $\pm$ 0,0002
Fertilizado	0,09 $\pm$ 0,001	0,42 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,001	0,09 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	50 $\pm$ 0,002

Se realizaron tres réplicas de cada medida. Valores marcados con un asterisco son significativos a  $P \leq 0,05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

**Tabla 56.** Concentraciones del contenido de micronutrientes o minerales traza. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar.

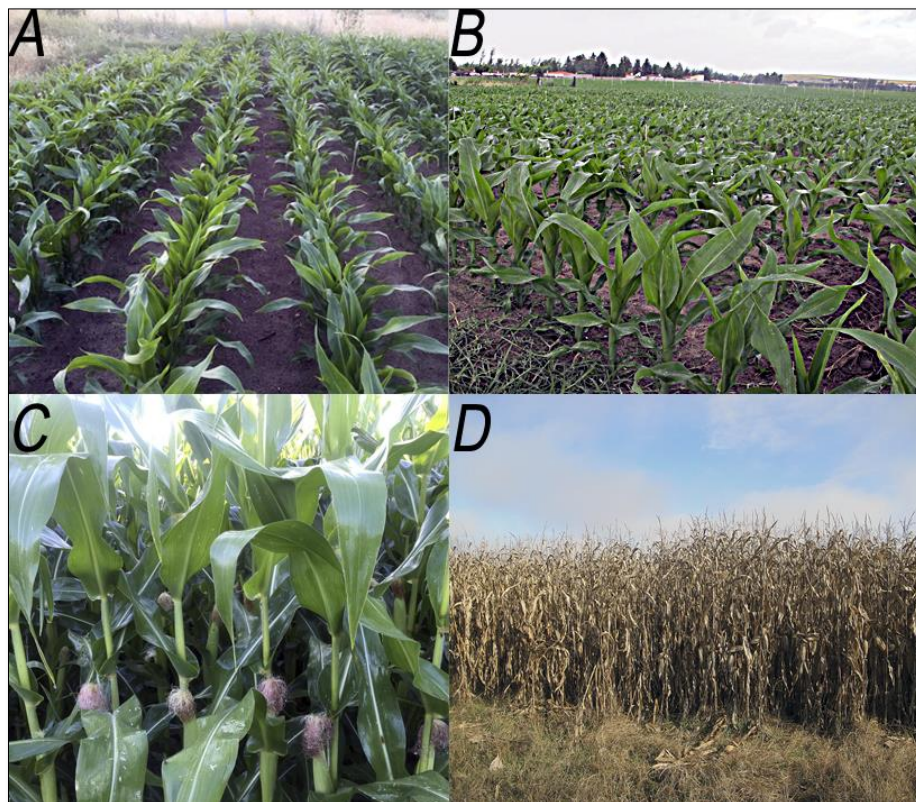
Suelo	Al (mg/Kg)	As (mg/Kg)	Be (mg/Kg)	Bi (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
Sin fertilizar	11 $\pm$ 0,03*	1,35 $\pm$ 0,17*	0,76 $\pm$ 0,03*	2,65 $\pm$ 0,13*	0,08 $\pm$ 0,01*	17,47 $\pm$ 1,06*	6,50 $\pm$ 0,14*
Fertilizado	8,8 $\pm$ 0,010	0,80 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,01	11,77 $\pm$ 0,13	4,44 $\pm$ 0,52
Suelo	Fe (mg/Kg)	Li (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	Na (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Rb (mg/Kg)
Sin fertilizar	12290,1 $\pm$ 650*	32,08 $\pm$ 2,2*	166,9 $\pm$ 41	100 $\pm$ 0,002	5,15 $\pm$ 1,28	7,26 $\pm$ 1,44	38,67 $\pm$ 1,1*
Fertilizado	9156,3 $\pm$ 212,3	23,80 $\pm$ 0,49	133,47 $\pm$ 18,6	100 $\pm$ 0,003	3,96 $\pm$ 0,49	6,08 $\pm$ 0,66	28,64 $\pm$ 1,35
Suelo	Se (mg/Kg)	Sr (mg/Kg)	Ti (mg/Kg)	Tl (mg/Kg)	V (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)	
Sin fertilizar	0,62 $\pm$ 0,32	9,91 $\pm$ 0,45	433,6 $\pm$ 20,9	20,11 $\pm$ 0,55	17,13 $\pm$ 0,5*	29,58 $\pm$ 0,94	
Fertilizado	0,46 $\pm$ 0,01	8,29 $\pm$ 0,83	290,2 $\pm$ 45,9	23,2 $\pm$ 0,45	11,75 $\pm$ 1,69	23,47 $\pm$ 2	

Se realizaron tres réplicas de cada medida. Valores marcados con un asterisco son significativos a  $P \leq 0,05$  de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

La disminución de los elementos esenciales en la parcela fertilizada puede estar relacionado con la sobreexplotación del mismo, ya que se ha documentado que el uso inadecuado y excesivo del suelo agrícola provoca un desequilibrio de los elementos esenciales (Tilman *et al.*, 2002). Por ello, los análisis de los suelos agrícolas son necesarios para evaluar los déficits y/o exceso de nutrientes presentes en el suelo y poder realizar un abono adecuado a las necesidades nutritivas del cultivo.

Por otro lado, observamos que el contenido en N y S fueron los únicos valores que fueron superiores en la parcela fertilizada. Estos resultados pueden estar relacionado con el tipo de fertilizante empleado por el agricultor, que en este caso fue Entec® 20+10+10 (20N, 10P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10 K<sub>2</sub>O y 7,5 SO<sub>3</sub>): La tecnología de este fertilizante según su fabricante, es la liberación lenta de los compuestos amoniacales lo cual podría estar relacionado con el leve aumento en la concentración de nitrógeno observado en el suelo fertilizado, así como una posible acumulación de estos elementos en suelo tras las sucesivas fertilizaciones.

Durante el desarrollo del experimento, las plantas de maíz presentaron un crecimiento y desarrollo vegetal normal, sin exhibir ninguna sintomatología relacionada con el déficit nutricional y/o la aparición de enfermedades (Figura 66).



**Figura 66.** Diferentes etapas del crecimiento del maíz en el ensayo de campo. A-B) Aspecto de las plantas antes de la formación de la mazorca. C) Aspecto de las plantas una vez iniciada la formación del grano de maíz. D) Aspecto de las plantas el día de la recolección de las mazorcas a los 251dpi.

#### 4.2. Análisis de parámetros de productividad.

Los resultados obtenidos tras la recolección de la cosecha se encuentran recogidos en la Tabla 57. El número de mazorcas obtenidas por planta fue el mismo en todos los tratamientos empleados y en ambas parcelas. No obstante, se observaron diferencias significativas en el peso de las mazorcas procedentes de los tratamientos inoculados con la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en comparación con sus respectivos tratamientos control de ambas parcelas.

Por otro lado, también pudimos observar un incremento en el número de semillas obtenidas en las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de ambos suelos comparadas con sus respectivos controles. Además, en el suelo sin fertilizar pudimos apreciar un incremento de la producción de un 4,19% en las plantas inoculadas. De la misma manera, se obtuvo un incremento del 18,18% en las plantas inoculadas con respecto a las plantas control sin inocular en la parcela

fertilizada. Este incremento en la producción, esta ligada al aumento del número de semillas por mazorca, así como al peso de la mazorca por planta.

**Tabla 57.** Resultados obtenidos tras la recogida a los 215 dpi del ensayo en campo.

Tratamiento	Suelo	Peso total (%)	Nº semillas/planta	Peso de la mazorca/ planta (g) ( $\pm$ E.E)	Nºmazorcas/planta
Control	Sin fertilizar	100	497	219,9 $\pm$ 10	1
	Fertilizado	100	478	255 $\pm$ 5,67*	1
ALA10B2 <sup>T</sup>	Sin fertilizar	104,19	518	262,4 $\pm$ 6,2	1
	Fertilizado	118,18	565	279,63 $\pm$ 6,16*	1

\*Para cada uno de los tratamientos se recolectaron las mazorcas de 15 plantas de maíz. Además, cada tratamiento se realizó por triplicado. Valores significativos a  $P \leq 0,05$  de acuerdo son Fisher.s Portected LSD (Least Significant Differences) E.E: Error Estándar.

Los incrementos observados en las diferentes variables analizadas podrían estar relacionadas con los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> descritos en los capítulos I, II y III de la presente tesis doctoral. Asimismo, la gran capacidad colonizadora, así como su capacidad para penetrar y actuar como endófito pueden influenciar de manera positiva en la producción de maíz bajo las condiciones empleadas en este estudio.

En cuanto a la bibliografía consultada, se han descrito estudios de campo con plantas de maíz empleando como bioinoculantes principalmente bacterias diazotróficas pertenecientes al género *Azospirillum* en combinación con diferentes concentraciones de abonos nitrogenados. Hungria *et al.*, (2010) emplearon un consorcio bacteriano integrado por *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, mostrando una mejora en el rendimiento de la producción de maíz en un rango comprendido entre 591 a 787 Kg/ha en comparación con aquellos tratamientos no inoculados. Otros autores, han empleado consorcios bacterianos empleando cepas pertenecientes a la especie *Azospirillum brasilense* en diferentes regiones geográficas dedicadas al cultivo de maíz y en combinación con diferentes concentraciones de nitrógeno. Sus resultados concluyeron que el uso de estos bioinoculantes reduce el uso de fertilizantes nitrogenados al 50% sin disminuir la producción de maíz (Vandeir *et al.*, 2017).

Por otro lado, Viruel *et al.*, (2014) realizaron un ensayo de campo empleando como bioinoculante una cepa de *Pseudomonas tolaasii* catalogada como PSB que previamente habían analizado en ensayos de invernadero. El empleo de esta cepa combinado con superfosfato triple mejoró el inicio de la aparición de las plántulas de maíz, el rendimiento del grano, la biomasa seca y el contenido en fósforo en las plantas de maíz en comparación con las plantas control.

Por otra parte y de igual manera que lo descrito en el punto 2.2, el uso de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* para la mejora de la producción de cereales y específicamente para el maíz en condiciones de campo, se ha documentado tan sólo de manera indirecta mediante el empleo de la técnica del cultivo de rotación (Latati *et al.*, 2016). Nuestro estudio aporta nueva información sobre el uso de bioinoculantes rizobianos junto con fertilizantes nitrogenados para la mejora del rendimiento agrícola del maíz. No obstante, futuros ensayos empleando diferentes concentraciones del fertilizante nitrogenado serán necesarios para esclarecer el efecto productivo por parte de la cepa bacteriana ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*.

### 4.3. Análisis del valor nutricional del grano de *Zea mays*.

De manera adicional se evaluó el contenido nutricional del grano de maíz para evaluar si la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> no sólo era capaz de mejorar la producción de maíz sino también de incrementar su valor nutricional. Los datos se encuentran recogidos en las Tabla 58.

**Tabla 58.** Valores analizados de los principales elementos esenciales en el grano de *Zea mays* inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en los ensayos

Tratamiento	Suelo	N (g/100g)	S (mg/Kg)	Mg (g/100g)	C (g/100g)	K (g/100g)
Control	Sin fertilizar	1,01±0,03	0,05±0	0,050±0,006	39,94±0,239	0,27±0,03
	Fertilizado	0,86±0,10	0,05±0,003	0,073±0,009	40,30±0,139	0,23±0,02
ALA10B2 <sup>T</sup>	Sin fertilizar	1,067±0,058	0,06±0,002	0,09±0,006	40,38±0,099	0,23±0,04
	Fertilizado	1,13±0,05	0,05±0,004	0,063±0,003	40,64±0,062	0,29±0,04
Tratamiento	Suelo	P (g/100g)	Ca (g/100g)	Mn (mg/Kg)		
Control	Sin fertilizar	0,21±0,04	0,01±0,01	9,587±0,550		
	Fertilizado	0,19±0,03	0,01±0,01	10,745±1,635		
ALA10B2 <sup>T</sup>	Sin fertilizar	0,19±0,03	0,003±0,001	11,39±0,071		
	Fertilizado	0,22±0,001	0,003±0,0009	8,573±0,776		

Se analizó por triplicado cada uno de los tratamientos. Valores marcados con asterisco son significativos a P≤0,05 de acuerdo con Fisher's Protected LSD (Least Significant Differences).

De manera general, los granos de maíz procedentes de las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> presentaron mayores valores en los principales elementos esenciales en comparación con las plantas control. Este aumento, en el caso del nitrógeno y el calcio se observó en ambos tipos de parcelas. En el caso del potasio y del fósforo estas mejoras se observaron sólo en el caso de la parcela fertilizada. En cuanto al resto de los elementos primarios y secundarios, se observaron valores similares, siendo mayor el contenido de potasio en el caso de la parcela sin fertilizar y en las plantas control. Por otro lado, las plantas inoculadas y fertilizadas exhibieron mejores resultados en el contenido de magnesio.

Estos resultados ponen de manifiesto que las plantas procedentes de la parcela fertilizada e inoculada presentaron mejores valores nutricionales, ya que los elementos primarios esenciales.

La selección de un buen bioinoculante para el desarrollo de una agricultura sostenible, no solo debe de incrementar el desarrollo vegetal sino también mejorar las cualidades nutricionales (García-Fraile *et al.*, 2017).



# Capítulo V

**Estudio de la implicación de la celulasa CelC2 en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> y regulación del operón *celABC* en la biosíntesis de celulosa**

10  $\mu\text{m}$





Desde hace años, en nuestro grupo de investigación se ha estudiado la implicación de la celulasa CelC2 en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa concluyendo su importancia en la infección primaria (Robledo *et al.*, 2008) así como en la biosíntesis de celulosa bacteriana (Robledo *et al.*, 2012). Asimismo, se ha demostrado que esta celulasa es específica de hospedador en la infección primaria e inespecífica de hospedador en infección secundaria y desarrollo nodular (Menéndez, TD, 2014). Debido a la importancia de dicha molécula, así como a la ausencia de este tipo de celulasas simbióticas en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, se decidió obtener cepas transformantes que expresen de manera heteróloga la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, así como su ortóloga, la celulasa CelC de *Ensifer medicae* para evaluar sus implicaciones en la producción de celulosa y biofilms e interacciones simbióticas empleando como plantas hospedadoras *Medicago sativa* y *Trifolium repens*.

## **1. Obtención de cepas transformantes de la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> que expresen heterológamente la celulasa CelC2 y su ortóloga perteneciente al género *Ensifer*.**

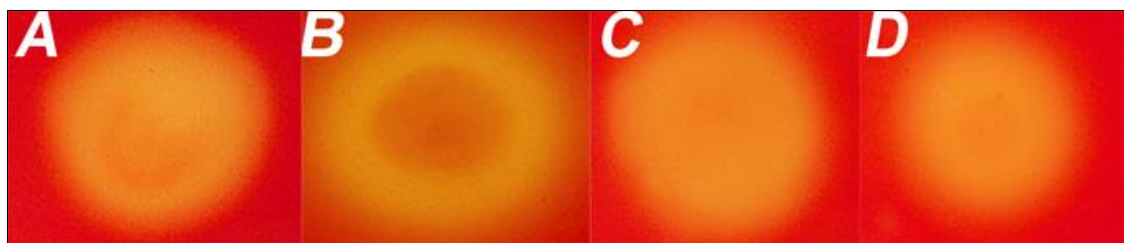
Para sobreexpresar de manera heteróloga ambas celulasas en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, se utilizaron dos plásmidos estables que expresan de manera constitutiva la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 denominado pJZC2 (Robledo *et al.*, 2011), así como la celulasa CelC de *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419 simbiote de *Medicago sativa*, denominado plásmido pEMC<sup>+</sup> (Menéndez, TD, 2014). Paralelamente, se utilizó el plásmido vacío pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al.*, 1994) como control.

## **2. Estudio de la implicación de la producción heteróloga de las celulasas CelC2 y CelC en la biosíntesis de celulosa y celulasas en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.**

Una vez obtenidos los transconjugantes que expresan heterológamente las celulasas CelC2 y CelC, se procedió a evaluar en cultivo puro sus potenciales implicaciones en la producción de actividad celulásica y celulosa.

Para evaluar los posibles efectos derivados de las expresiones heterólogas de ambas celulasas en la actividad celulásica de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> se empleó el medio cualitativo de la difusión radial empleando el método de la doble capa (Mateos *et al.*, 1995).

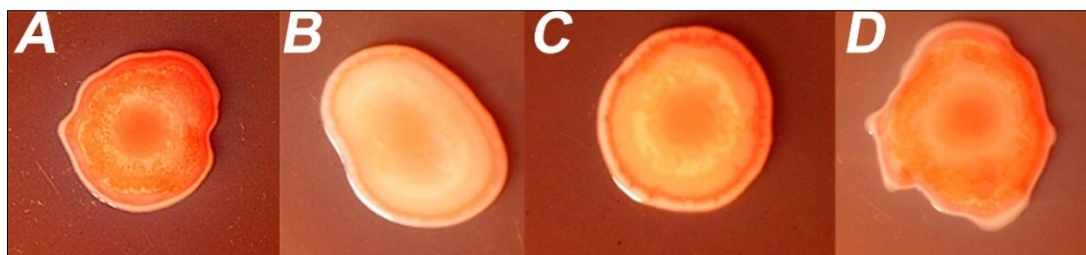
Como se puede observar en la Figura 67, no se apreciaron diferencias en cuanto a la actividad celulásica comparando los transconjugantes con la cepa salvaje de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Que no se aprecien diferencias mediante este método cualitativo, no quiere decir que no pueda existir un incremento de la actividad celulásica por parte de los transconjugantes y en comparación con la cepa salvaje. Futuros estudios de cuantificación serían necesarios para discernir el incremento o no de dicha actividad al expresar de manera heteróloga ambas celulasas.



**Figura 67.** Detección cualitativa de la producción de celulasas en cultivo puro. A) La cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt. B) La cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 que expresa de manera constitutiva la celulasa CelC2. C) La cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 que expresa de manera constitutiva la celulasa CelC. D) La cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_EV que contiene el plásmido pBBR1-MCS-2 empleada como control.

Para estimar diferencias cualitativas en cuanto a la producción de celulosa se realizó una tinción con Rojo Congo. Como se mencionó en el capítulo I, este colorante tiene la capacidad para adherirse a polímeros con enlaces  $\beta$  (1-4) como es el caso de la celulosa. Los resultados se analizaron de manera cualitativa conforme a la escala utilizada por (Robledo et al., 2012), de manera que los valores negativos (-) indican una nula producción de celulosa en presencia de Rojo Congo en el medio exhibiendo una coloración blanquecina, mientras que los valores +++ reflejan las mejores productoras mostrando una coloración rojiza (Tabla 59).

En la Figura 68 se puede observar que, la cepa salvaje de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> (Figura 68, A) es una gran productora de celulosa (ver capítulos I y II). Sin embargo, la cepa que expresa de manera heteróloga la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 (ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2) presentó una coloración más blanquecina que la cepa salvaje (Figura 68, B). Por otro lado, la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> que expresa de manera heteróloga y constitutiva la celulasa CelC de *Ensifer medicae* WSM419 (ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419) exhibía una tonalidad menos rojiza que la cepa salvaje (Figura 68, C), pero esas diferencias de tonalidades no fueron tan notables como las observadas en el caso de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2. Por último, observamos que la cepa que porta el plásmido vacío, es decir la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_pBBR1MCS-2 no presenta alteraciones en la producción de celulosa, ya que su tonalidad es similar a la cepa salvaje (Figura 68, D). Conforme a la escala cualitativa establecida por Robledo y colaboradores, las tonalidades rosáceas se relacionan con una menor cantidad y/o producción de celulosa bacteriana. Por lo tanto, la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 fue la de menor coloración, seguida por la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419, siendo iguales las coloraciones observadas en la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pBBR1MCS-2 y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_wt (Tabla 59).



**Figura 68.** Colonias de los distintos transcojugantes en YMA suplementado con 25mg/ml de Rojo Congo. A) *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> wt. B) *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> \_pJZC2 que expresa de manera constitutiva la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843. C) *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> \_WSM419 que expresa de manera constitutiva la celulasa CelC de *Ensifer medicae* WSM419 D) *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> \_EV que expresa el plásmido vacío pBBRMCS-2 utilizado como control. Las distintas colonias se crecieron en medio YMA suplementado con Km.

**Tabla 59.** Producción de celulosa en los transconjugantes de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*. Escala cualitativa de color de acuerdo con la escala propuesta por (Robledo *et al.*,2012).

Cepa bacteriana	Producción de celulosa
ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+++
ALA10B2 <sup>T</sup> _pJZC2	+
ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	++
ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+++

La disminución de la coloración observada en la producción de celulosa en la cepa que expresa la celulasa CelC2, concuerda con los resultados descritos por Robledo y colaboradores, quienes dictaminaron que las colonias de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 que sobreexpresaban dicha celulasa exhibían una coloración rosácea más pálida en comparación con la cepa salvaje, así como una disminución significativa en la producción de biofilms. No obstante, es importante destacar, que en nuestro grupo de investigación se han obtenido transconjugantes de la cepa de *Ensifer medicae* WSM419 que expresan de manera heteróloga la celulasa CelC2, las cuales no presentaron evidencias de que la producción de celulosa estuviera afectada, así como la formación de biofilms (Menéndez, TD 2014). Asimismo, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Menéndez, TD 2014), mostraron que la sobreexpresión homóloga de la celulasa CelC de *Ensifer medicae* WSM419, no produjo diferencias significativas en cuanto a la producción de celulosa ni a la formación de biofilms.

Los datos obtenidos en la presente tesis doctoral, como los publicado por Robledo y colaboradores, así como los establecidos en nuestro laboratorio (Menéndez, TD 2014), confirman que la celulasa CelC2 parece desempeñar un papel crucial en la biosíntesis de celulosa dentro del género *Rhizobium*. En este sentido, se realizó un análisis comparativo de las proteínas que conforman el operón *celAB* de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mediante el empleo de la herramienta BLASTp del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados mostraron que la celulosa sintasa (CelA) presentaba homología con otras celulosa sintasas (CelA) depositadas en las bases de datos y con diferentes géneros dentro de la familia Rhizobiaceae (Tabla 60).

En cuanto al gen *celB* de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> las predicciones *in silico* indican que codifica para una proteína reguladora de unión al di GMP cíclico (ver capítulo II). Además, la comparación mediante BLASTp nos mostró que esta proteína exhibía homología con otras proteínas reguladoras de unión al di-GMP cíclico de especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Neorhizobium* (Tabla 60).

**Tabla 60.** Porcentaje de similitud y funciones anotadas tras enfrentar la secuencia aminoacídica de la celulosa sintasa CelA y CelB de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> con la base de datos NCBI y dentro de la familia de los *Rhizobiaceae* utilizando la herramienta BLASTp.

Función descrita	Microorganismo	Resultados Blastp			
		Query cover	E-Value	% Identidad	Nº acceso
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora) BscA o celA	<i>Neorhizobium</i> sp. NCHU2750	100	0.0	93,25	WP_119938783.1
	<i>Neorhizobium galegae</i>	99	0.0	82,13	WP_0466224901.1
	<i>Rhizobium vignae</i>	99	0.0	81,99	WP_037087118.1
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> ANU843	99	0.0	74,17	AEK64748.1
	<i>Rhizobium laguerreae</i>	99	0.0	73,48	WP_131664256.1
	<i>Rhizobium etli</i>	99	0.0	73,62	WP_039619019.1
Proteína BscB o CelB reguladora de unión a di GMPc	<i>Neorhizobium</i> sp. NCHU2750	96	0.0	76,18	WP_119938782.1
	<i>Rhizobium</i> sp 24NR	99	0.0	60,12	WP_128443883.1
	<i>Neorhizobium galegae</i> bv <i>officinalis</i>	96	0.0	60,37	WP_133316567.1
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> ANU843	86	0.0	47,20	AEK64749.1

En términos generales, estos resultados nos ponen de manifiesto que, la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> contiene en su genoma un operón *celAB* involucrado en la biosíntesis de celulosa y común dentro de los géneros *Rhizobium* y *Neorhizobium* conforme a los resultados *in silico* obtenidos tras el enfrentamiento de las secuencias aminoacídicas a través de la herramienta BLASTp. Asimismo, la alta homología exhibida tras la comparación de las proteínas CelA y CelB con la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* podría explicar los resultados obtenidos conforme al análisis cualitativo de la producción de celulosa. No obstante, estos resultados se abordarán con más detalle en el apartado de Discusión general.

### 3. Estudio del efecto de la expresión heteróloga de las celulasas CelC2 y CelC en la colonización e infección simbiótica.

La biosíntesis de celulosa dentro del género *Rhizobium* constituye un factor crucial, ya que es el componente principal de los biofilms y permite una firme adhesión de las bacterias a los pelos radiculares (formación de “caps”) y a la superficie radicular (Dazzo *et al.*, 1984; Smit *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 1995). En los capítulos III y IV se ha descrito la gran capacidad colonizadora por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> sobre las superficies radiculares de plantas leguminosas como de cereales. Tal y cómo se mencionó el punto 2 del presente capítulo, la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en la cepa ALA10B2<sup>T</sup> mostró de manera cualitativa una coloración más rosácea en comparación con el color rojizo observado en la cepa salvaje. Asimismo, este cambio de coloración fue menos notable en el transconjugante que expresa la celulasa CelC. Conforme a estos resultados, se decidió evaluar las posibles implicaciones en la colonización e infección en los primeros estadios de la interacción simbiótica. Para ello, se emplearon como plantas huéspedes *Trifolium repens* y *Medicago sativa* y se estimaron 3 tiempos de observación, 5, 10 y 15 dpi.

Se realizó un experimento en condiciones hidropónicas y en cámara iluminada con un período de duración de 15 días aproximadamente siguiendo la metodología descrita en el apartado de Materiales y Métodos de la presente tesis doctoral. Los tratamientos para cada una de las plantas incluyeron, un control inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> wt, la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2, la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV, con el objetivo de evaluar el comportamiento de dichos transconjugantes con cada una de las leguminosas seleccionadas. De manera similar a lo establecido en los capítulos III y IV, se analizaron por separado la colonización y por otro lado los fenotipos radiculares relacionados con la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

Las observaciones realizadas mostraron que la capacidad para formar biofilms sólo se vio afectada en la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 observándose un retraso en la formación de la matriz exopolisacáridica (Tabla 61). Estos datos concuerdan con los observados tras la tinción con Rojo Congo lo cuál esta relacionado con la producción de celulosa, componente principal de los biofilms del género *Rhizobium* (ver Figura 68).

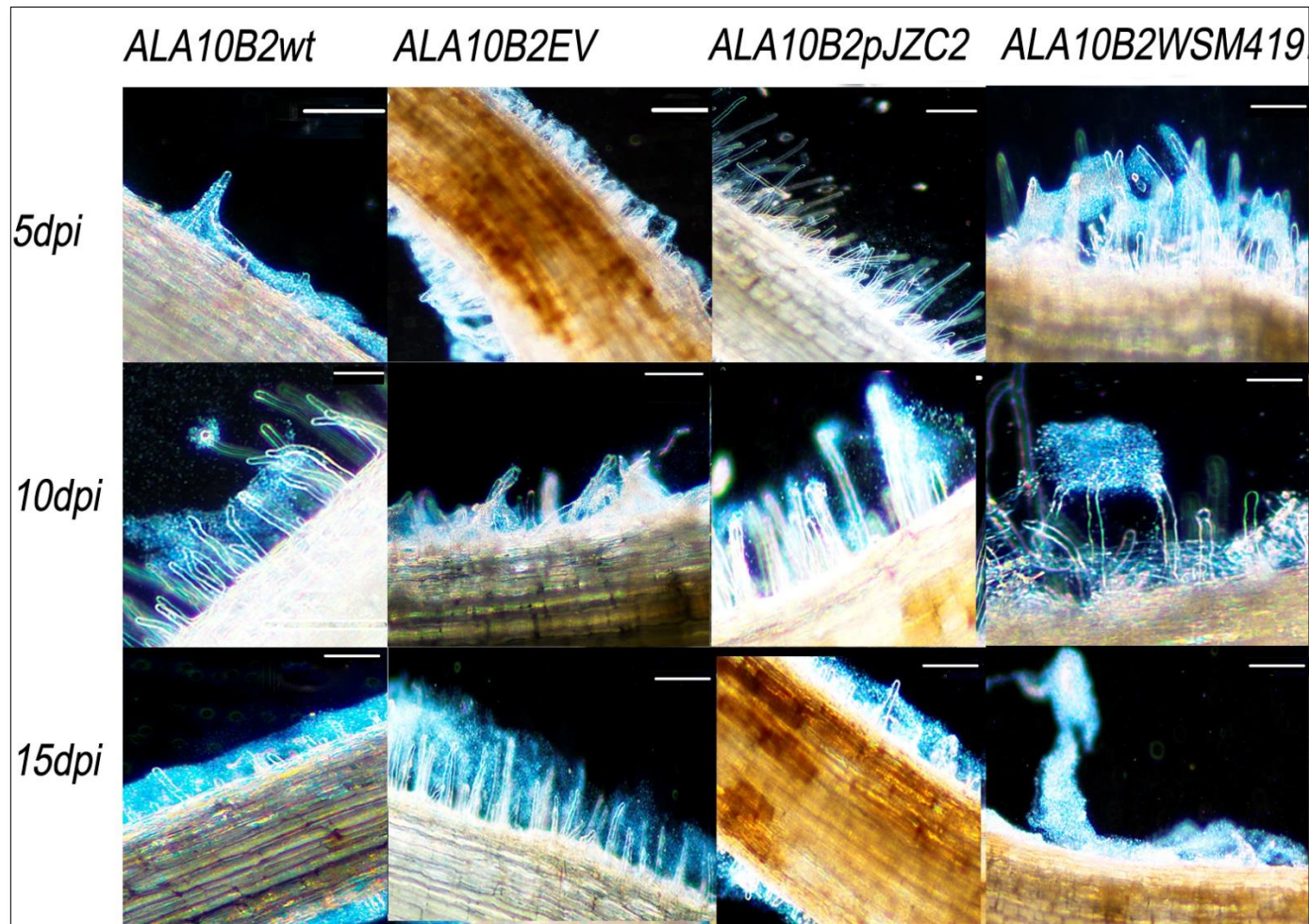
**Tabla 61.** Fenotipos radiculares simbióticos observados en las raíces de *Medicago sativa* derivados de las expresiones heterólogas de las celulasas CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y CelC de *Ensifer medicae* por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en los primeros estadios del desarrollo simbiótico. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia del fenotipo en comparación con la cepa salvaje.

Leguminosa	Dpi	Cepa	Biofilms	Fenotipo "cellu-bridge"	"caps"
<i>Medicago sativa</i>	5	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	-	-	-
		ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	+	+
	10	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	+	+
	15	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	+	+

Las observaciones realizadas mostraron que, en el caso de las raíces de *Medicago sativa* la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV utiliza de control negativo presentó un comportamiento similar a la cepa salvaje (ALA10B2<sup>T</sup>) a lo largo del desarrollo del experimento. Gracias al uso de la luz polarizada pudimos observar la formación de biofilms alrededor de la raíz y de los pelos radiculares característica de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* (Figura 69). Del mismo modo que en el caso anterior, la inoculación de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 presentó las características inherentes a la cepa salvaje sin observar alteraciones en la formación de biofilms a lo largo del ensayo (Figura 69). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJCZ2 sí exhibió un retraso en la formación de biofilms a los 5 dpi (Figura 69). Posteriormente, a los 10 y 15 dpi se observó la formación de biofilms (Figura 69).

Estas observaciones concuerdan en parte con las observaciones descritas por Robledo y colaboradores, en la cual una sobreexpresión de la celulasa CelC2 conlleva alteraciones en la colonización y formación de biofilms. Sin embargo, en nuestro estudio estos efectos son reversibles, ya que, a partir de los 10 dpi, se aprecia la formación de biofilms alrededor de las raíces y los pelos radiculares. Esto puede ser debido a que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> es una gran productora de celulosa en comparación con otras cepas del género *Rhizobium* (Diez-Mendez *et al.*, 2015) y por tanto su producción se puede ver afectada parcialmente pero no en su totalidad.





**Figura 69.** Efecto en la formación de biofilms y colonización derivados de las expresiones heterólogas de las celulasas CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y CelC de *Ensifer medicae* en la colonización de las raíces de *Medicago sativa* por parte de la cepa ALA10B2T de *Rhizobium cellulosilyticum* en los primeros estadios del desarrollo simbiótico. Las barras representan 800µm.

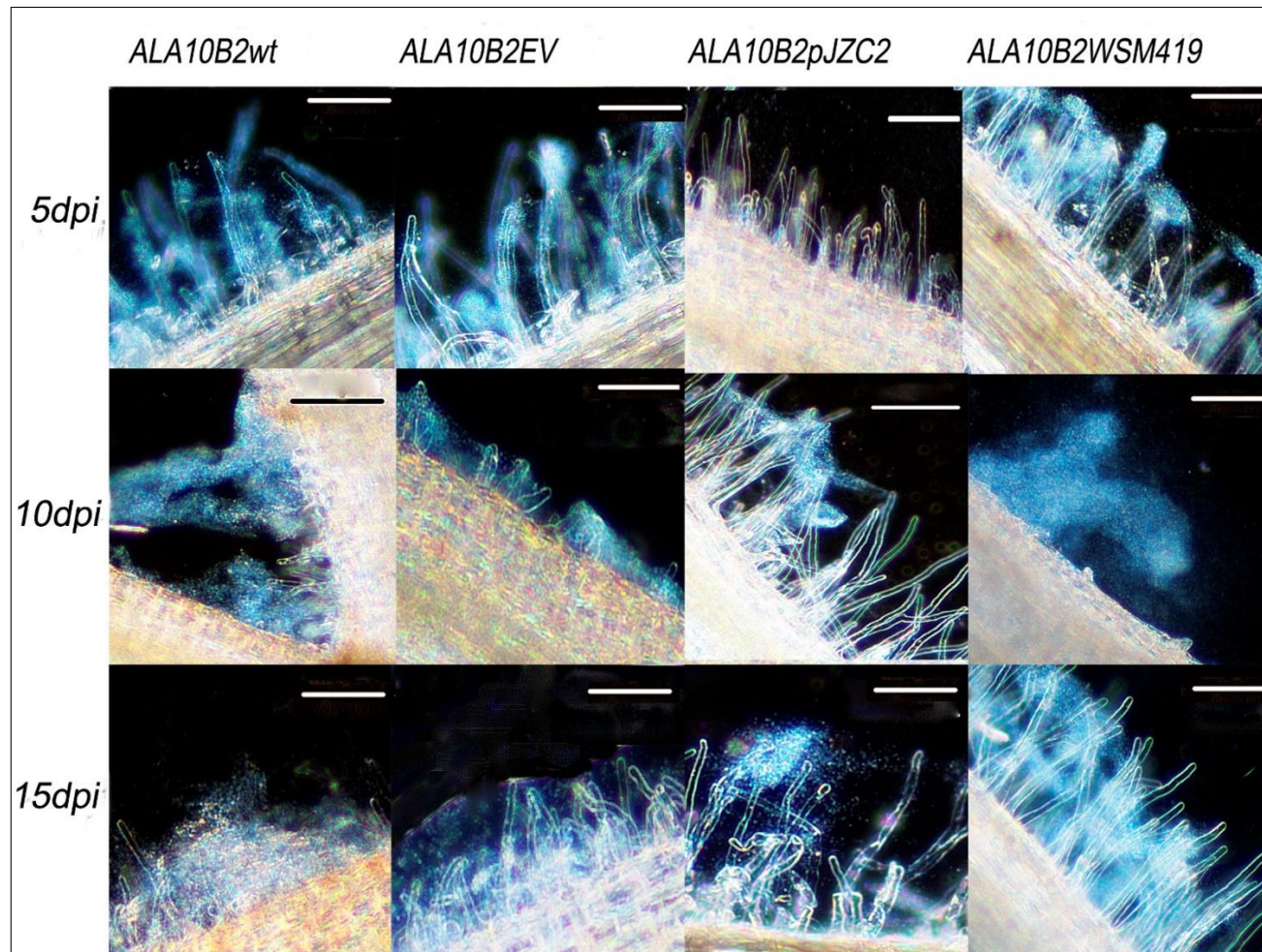
Por otro lado, se analizaron de la misma manera que en el caso de las raíces de *Medicago sativa*, las raíces de *Trifolium repens*. De manera similar, se observó un retraso en la formación de biofilms a los 5 dpi por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 no encontrándose dichas alteraciones en ningún otro tratamiento llevado a cabo en este estudio (Tabla 62).

**Tabla 62.** Fenotipos radiculares simbióticos observados en las raíces de *Trifolium repens* derivados de las expresiones heterólogas de las celulasas CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y CelC de *Ensifer medicae* por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en los primeros estadios del desarrollo simbiótico. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia del fenotipo en comparación con la cepa salvaje.

Leguminosa	Dpi	Cepa	Biofilms	Fenotipo "cellu-bridge"	"caps"
<i>Trifolium repens</i>	5	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	-	-	-
		ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	+	+
	10	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	+	+
	15	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	+	+
		ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	+	+

De igual manera que en el caso de las raíces de *Medicago sativa*, gracias al uso de la luz polarizada y el microscopio óptico pudimos observar la formación de biofilms a los 10 dpi en las raíces de *Trifolium repens* inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 (Figura 70). En el resto de los tratamientos la formación de biofilms se observó desde los 5 dpi.

Estos resultados se pueden relacionar con las observaciones cualitativas de producción de celulosa descritas en el apartado 2 del presente capítulo. La cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 fue la que presentó una menor coloración rojiza en comparación con el resto de los tratamientos, traduciéndose, según lo observado y bajo las condiciones analizadas de este estudio, en un retraso en la formación de biofilms y por tanto de la colonización de la superficie radicular de *Medicago sativa* y *Trifolium repens*. A pesar de que la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 presentó una coloración aparentemente menos rojiza que la mostrada por la cepa salvaje, la capacidad para colonizar y formar biofilms no se vio afectada en ninguna de las plantas empleadas como huéspedes ni a lo largo del desarrollo de los experimentos.



**Figura 70.** Efecto en la formación de biofilms y colonización derivados de las expresiones heterólogas de las celulasas CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y CelC de *Ensifer medicae* en la colonización de las raíces de *Trifolium repens* por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en los primeros estadios del desarrollo simbiótico. Las barras representan 800µm.

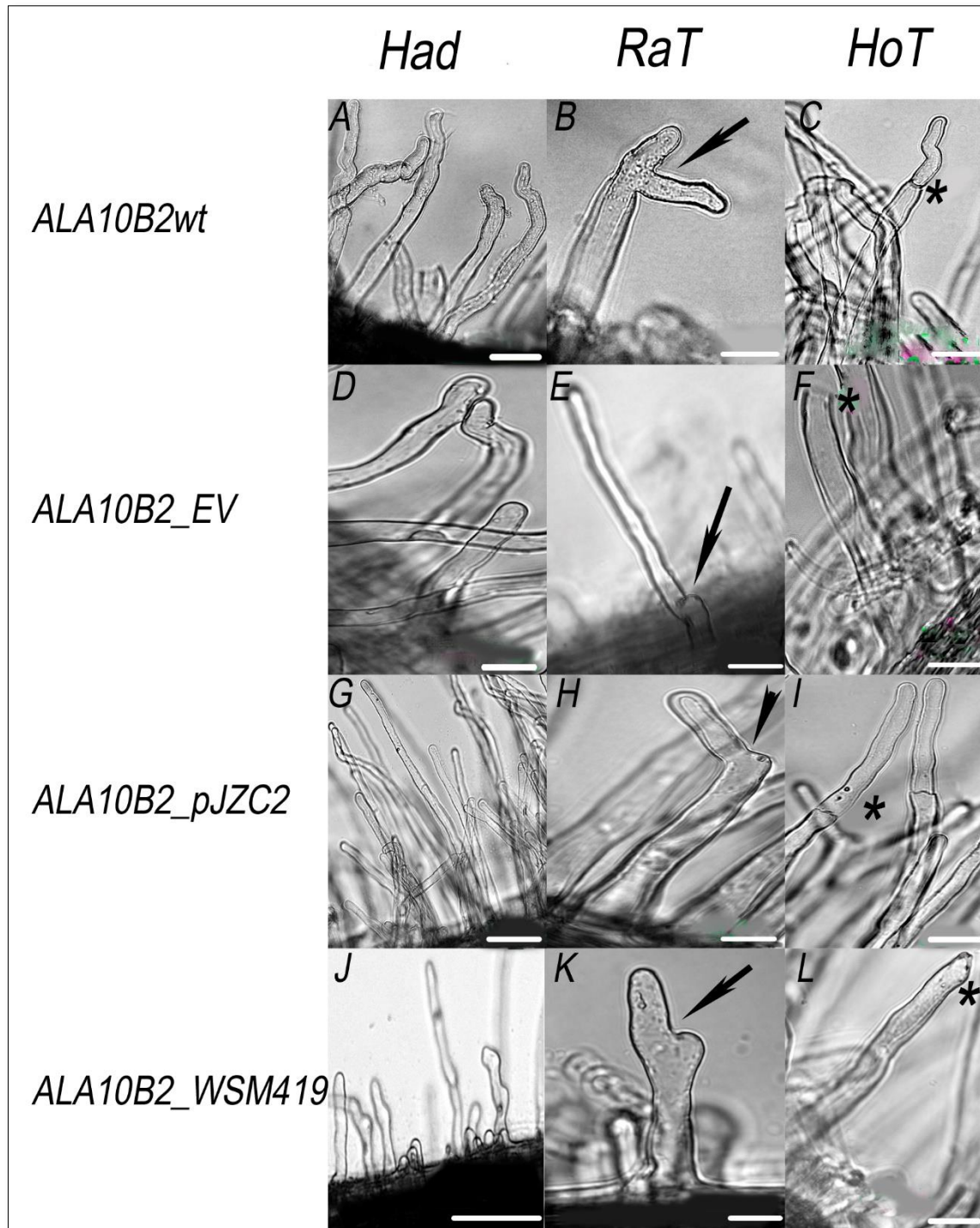
En referencia a la observación de fenotipos radiculares típicos de la interacción *Rhizobium*-leguminosa se encuentran recogidas en la Tabla 63 donde se refleja la ausencia o la presencia de dichos fenotipos durante el desarrollo de los experimentos.

**Tabla 63.** Fenotipos radiculares simbióticos observados en las raíces de *Medicago sativa* y *Trifolium repens* derivados de las expresiones heterólogas de las celulasas CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 y CelC de *Ensifer medicae* por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en los primeros estadios del desarrollo simbiótico. Las casillas con un valor + indican la presencia de ese fenotipo, un valor – indica ausencia, mientras que la w indica una presencia muy débil en comparación con la cepa salvaje.

Leguminosa	Cepa	Fenotipos simbióticos						
		Had	Hac	RaT	Hot	Inf	noi	Fix
<i>Medicago sativa</i>	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	-	+	+	-	-	-
	ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	+	-	+	+	-	-	-
	ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	-	+	+	-	-	-
	ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	-	+	+	-	-	-
<i>Trifolium repens</i>	ALA10B2 <sup>T</sup> _wt	+	-	+	+	-	-	-
	ALA10B2 <sup>T</sup> _pJCZ2	+	-	+	+	-	-	-
	ALA10B2 <sup>T</sup> _WSM419	+	-	+	+	-	-	-
	ALA10B2 <sup>T</sup> _EV	+	-	+	+	-	-	-

Las observaciones realizadas en las raíces de alfalfa inoculadas con la cepa ALA10B2\_wt mostraron fenotipos típicos de esta cepa descritos en el capítulo III, tales como deformaciones o fenotipo Had (Figura 71, A), fenotipo RaT (Figura 71, B) y el fenotipo HoT (Figura 71, C). Las raíces inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV (Figura 71, D, E, F), la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 (Figura X, G, H, I) y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 (Figura 71, J, K, L) presentaron los mismos fenotipos que los exhibidos por la cepa salvaje. Asimismo, en ninguno de los tratamientos empleados en este estudio se observó la formación de estructuras típicas como la formación de curlings o fenotipo “Hac, canales de infección o la formación de nódulos.

Como se puede observar en la imagen (Figura 71), en las observaciones relacionadas con el fenotipo HoT, éste se observó en diferentes estadios. El panel C muestra como la cepa ALA10B2wt tras producir la ruptura de la punta del pelo radical, éste se regenera y sigue su crecimiento. Estas mismas observaciones también se apreciaron en las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 (Figura 71, I). En el panel F se observa la ruptura de la punta del pelo radicular tras la inoculación con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV. Por otro lado, el panel L muestra la regeneración de la punta del pelo radicular en las planas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419, ya que esta no muestra la morfología redondeada típica de un pelo radicular sin inocular (ver capítulo III, Figura 42).

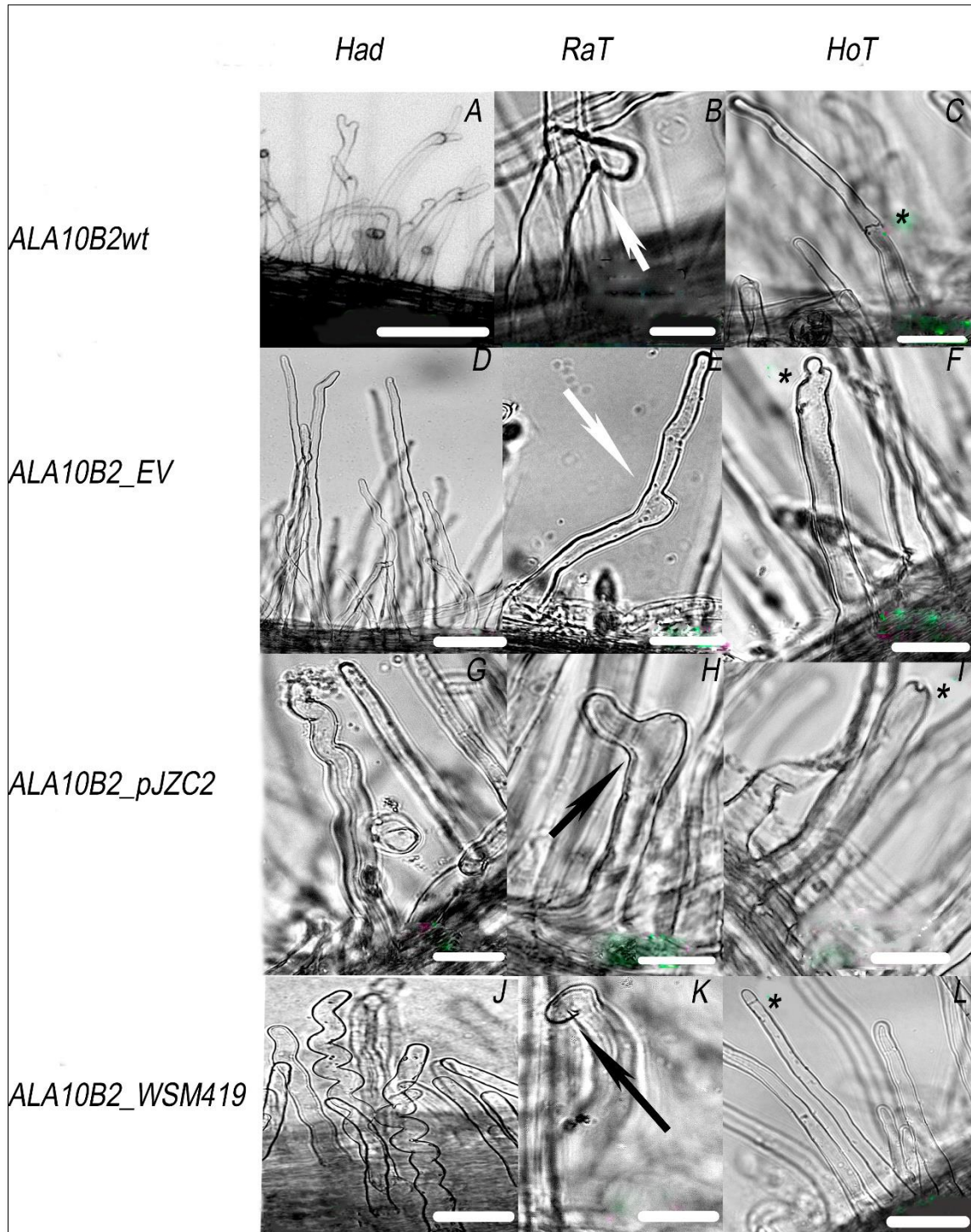


**Figura 71.** Microfotografías de los pelos radiculares en raíces de *Medicago sativa* inoculadas con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_wt (A, B, C), *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_EV (D, E, F), *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 (G, H, I) y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 (J, K, L). Todas las inoculaciones exhibieron los mismos cambios morfológicos radiculares relacionados con el fenotipo Had (A, D, G, J), el fenotipo RaT (B, E, H; K) y el fenotipo HoT (C, F, I, L). Los asteriscos indican las observaciones referidas al fenotipo HoT. Lo paneles A, E, G, H, I, K y L corresponden a los 5 dpi, los paneles B, C, D, F y J corresponden a los 10 dpi. Las barras de los paneles A y C corresponden a 400  $\mu$ m. El panel J a 800  $\mu$ m y el resto a 200  $\mu$ m.

De manera similar a las observaciones realizadas en los pelos radiculares de *Medicago sativa*, se procedió a examinar los pelos radiculares del trébol.

De igual manera que lo observado en la alfalfa, las observaciones realizadas en las raíces de trébol inoculadas con la cepa ALA10B2\_wt mostraron fenotipos típicos de esta cepa descritos en el capítulo III, tales como deformaciones o fenotipo Had (Figura 72, A), fenotipo RaT (Figura 72, B) y el fenotipo HoT (Figura 72, C). Las raíces plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV (Figura 72, D, E, F), la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 (Figura 72, G, H, I) y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 (Figura 72, J, K, L) presentaron los mismos fenotipos que los exhibidos por la cepa salvaje. Asimismo, en ninguno de los tratamientos empleados en este estudio se observó la formación de estructuras típicas como la formación de curlings o fenotipo “*Hac*”, canales de infección o la formación de nódulos.

Como se puede observar en la imagen (Figura 72), en las observaciones relacionadas con el fenotipo *HoT*, éste se observó en diferentes estadios. El panel C muestra como la cepa ALA10B2wt tras producir la ruptura de la punta del pelo radical, éste se regenera y sigue su crecimiento. Estas mismas observaciones también se apreciaron en las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 (Figura 72, L). En el panel F se muestra la ruptura de parte de la punta del pelo radical en las plantas inoculadas con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV. Por otro lado, en el panel se muestra un orificio en la punta del pelo radical iniciándose el fenotipo HoT en el tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2.



**Figura 72.** Microfotografías de los pelos radiculares en raíces de *Trifolium repens* inoculadas con *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_wt (A, B, C), *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_EV (D, E, F), *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 (G, H, I) y *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 (J, K, L). Todas las inoculaciones exhibieron los mismos cambios morfológicos radiculares relacionados con el fenotipo Had (A, D, G, J), el fenotipo RaT (B, E, H; K) y el fenotipo HoT (C, F, I, L). Los asteriscos indican las observaciones referidas al fenotipo HoT. Lo panales A, C, D, I, K y L corresponden a los 5 dpi, los paneles B, E, G, H, F y J corresponden a los 10 dpi.

Los resultados obtenidos tras las observaciones en ambas leguminosas ponen de manifiesto que la ausencia de factores de nodulación por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> wt, impide la formación del fenotipo *Hac* y por lo tanto la observación de estructuras típicas como canales de infección, como en el caso de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ya que es la enzima responsable de la infección primaria en *Trifolium repens*, su planta homóloga.

#### 4. Estudio de la regulación de la biosíntesis de celulosa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843.

En nuestro grupo de investigación, los estudios realizados con la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* han determinado el papel del gen *celC* durante la infección primaria durante el desarrollo de la interacción simbiótica con *Trifolium repens* (Robledo *et al.*, 2008), así como su papel en la regulación de la biosíntesis de celulosa (Robledo *et al.*, 2012). Asimismo, se ha propuesto la existencia de una posible secuencia reguladora y/o promotora del gen *celC* contenida en el gen anterior, el gen *celB* (Robledo, TD, 2010). Esta hipótesis se basa en una predicción *in silico* mediante el manejo de programas bioinformáticos (Solovyev *et al.*, 2011) de una caja -10 (TGGCGCAAT) y otra -35 (TTGCCT), apoyando la hipótesis de la posible presencia de una región interna reguladora.

Para discernir la posible presencia de una secuencia promotora aguas arriba del gen *celC*, es decir alojada en el gen *celB* se decidieron realizar fusiones transcripcionales acotando la secuencia predicha *in silico*, así como la secuencia promotora aguas arriba del gen *celA*.

##### 4.1. Obtención de fusiones transcripcionales.

Con el objetivo de ahondar de un modo más detallado sobre la posible regulación promotora interna del gen *celC* del operón *celABC* de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 se realizaron diferentes fusiones transcripcionales.

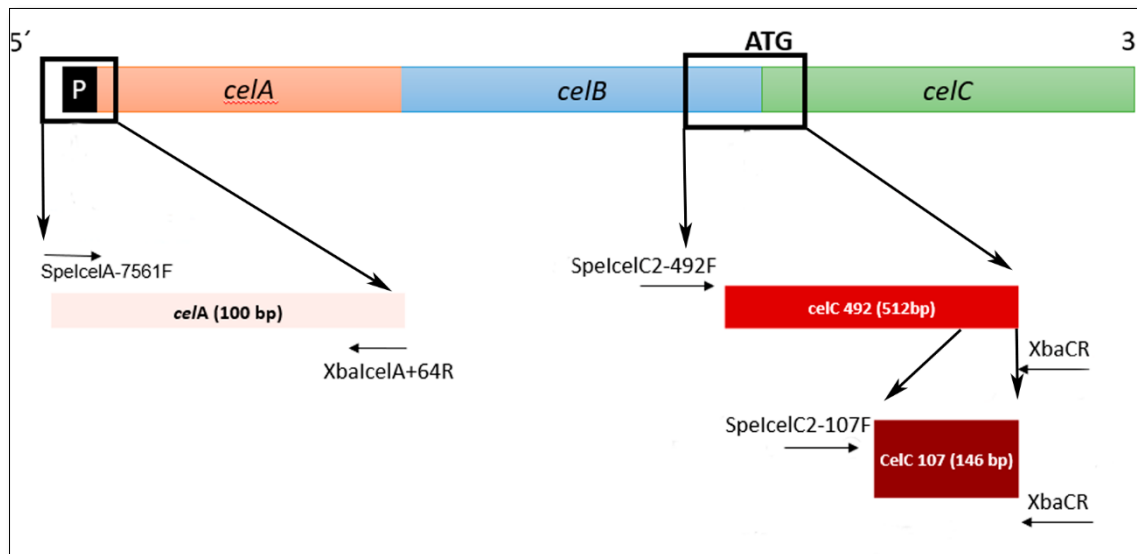
Para la obtención de dichas fusiones transcripcionales se empleó el plásmido pBBGFP, un plásmido sin promotor que tiene fusionada una proteína GFP y que fue cedido por el Dr. José Ignacio Zurdo y la Dra. Marta Robledo de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC (Granada) (ver materiales métodos).

Los fragmentos para los que se predicen las secuencias reguladoras (Figura 73) denominados, *celA*, *celC\_492* y *celC107* se encuentran delante de la secuencia que codifica para una GFP, actuando de secuencia promotora ya que como se ha mencionado, este plásmido carece de un promotor.

En la Figura 73, se representa de manera esquemática las zonas predichas con función promotora. El fragmento *celA* posee un tamaño de 100 bp y se sitúa aguas arriba del gen *celA* aunque solapa con las 65 primeras pares de bases del gen *celA*. El fragmento *celC\_492* tiene un tamaño de 512 bp y se sitúa en su gran mayoría en gen *celB* solapando con las 49 primeras pares de bases del gen *celC*. De manera similar a esta última, el fragmento *celC\_107* tiene un tamaño



de 146 pares de bases y en su mayoría se aloja dentro del gen *celB* solapando con las 49 primeras pares de bases del gen *celC*.

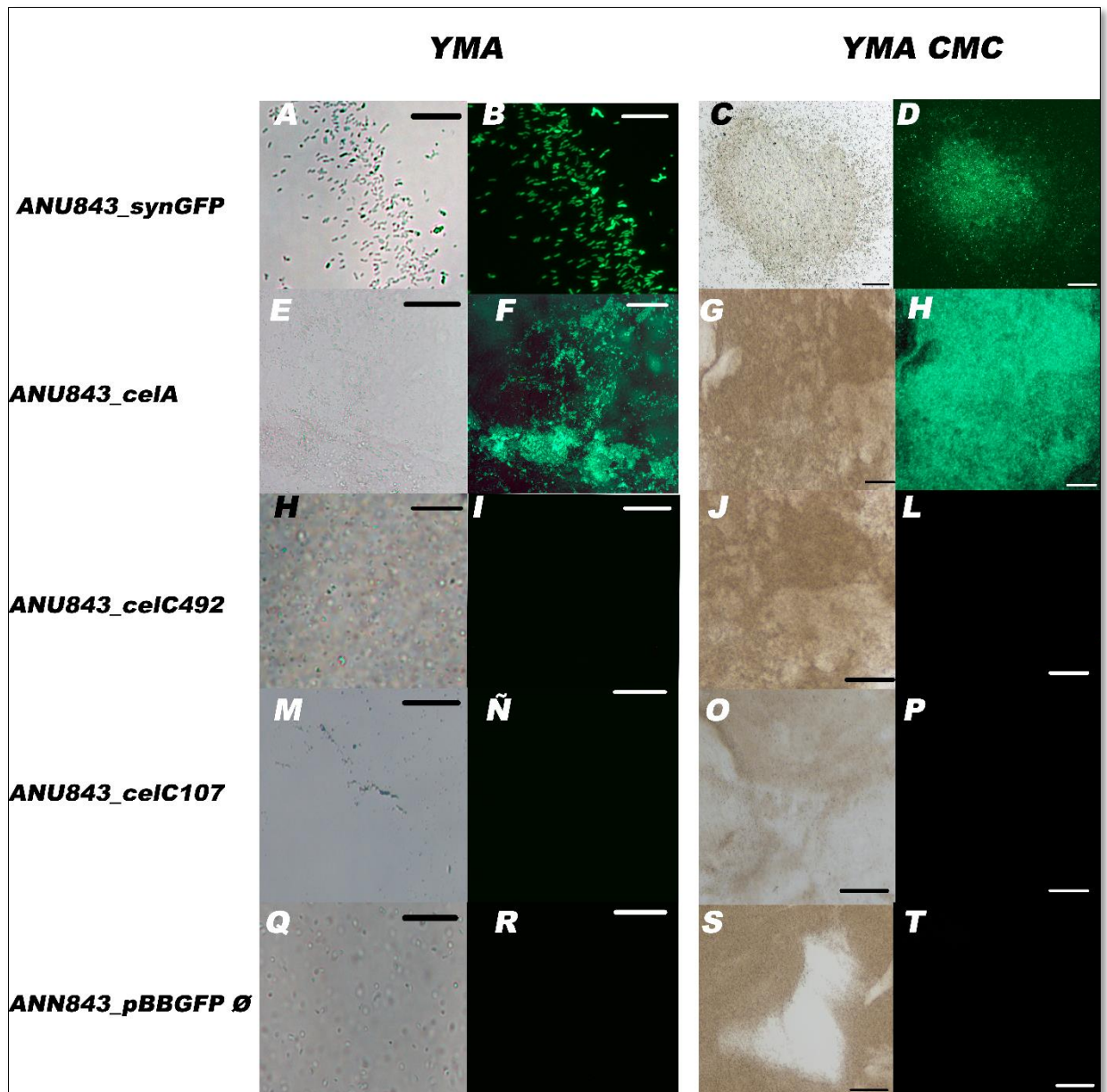


**Figura 73.** Esquema de los fragmentos génicos del operón *celABC* de *Rhizobium leguminosarum* *bv trifolii* ANU843 clonados en el plásmido pBBGFP. En cada uno de los genes se muestra la zona que corresponde a cada uno de los fragmentos, las enzimas de restricción empleadas en el proceso de clonación génica, así como el tamaño entre paréntesis ( ) de cada uno de los fragmentos empleados.

Además, se utilizó como control negativo el plásmido vacío pBBGFP denominado (pBBGFPØ), y como control positivo se utilizó el plásmido synGFP que codifica para una GFP de manera constitutiva. Ambos controles, así como las construcciones descritas anteriormente, se transfirieron a la cepa de *Rhizobium leguminosarum* *bv trifolii* ANU843 mediante conjugación triparental y biparental siguiendo la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos.

#### 4.1.1. Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales en cultivo puro.

Una vez obtenidos los transconjugantes con ambos controles y sendas fusiones transcripcionales, se decidió analizar todas ellas en cultivo puro. Con el objetivo de discernir la posible expresión de las regiones promotoras predichas *in silico*, cada uno de los transconjugantes se creció en medio YMA e YMA suplementado con CMC como substrato con sus correspondientes antibióticos durante 5 días. Seguidamente, se realizaron extensiones de sendas fusiones y de ambos controles en un portaobjetos excavado y se procedió a observar los cultivos puros utilizando el microscopio de fluorescencia (Figura 74).



**Figura 74.** Microfotografías de cultivos puros en medio YMA de las cepas con las diferentes fusiones transcripcionales ANU843\_celA (E, F), ANU843\_celC492 (I, J), ANU843\_celC107 (M, Ñ) y ambos controles siendo el positivo la cepa ANU843\_synGFP (A, B) y el control negativo la cepa ANU843\_pBBGFPØ (Q, R). Las microfotografías de los cultivos puros crecidos en medio YMA suplementado con CMC YMA de las cepas con las diferentes fusiones transcripcionales ANU843\_celA (G, H), ANU843\_celC492 (K, L), ANU843\_celC107 (O, P) y ambos controles siendo el positivo la cepa ANU843\_synGFP (C, D) y el control negativo la cepa ANU843\_pBBGFPØ (S, T). Las escalas de los paneles C, D, G y H corresponden con 200µm y el resto de paneles con 400µm.

Como podemos observar en la imagen (Figura 74) los cultivos puros de las cepas ANU843\_synGFP y ANU843\_celA mostraron fluorescencia verde en ambas condiciones, es decir, en medio de cultivo YMA (Figura 74, B, F respectivamente) y en este mismo medio suplementado con CMC (Figura 74, D, H respectivamente) Sin embargo, los transconjugantes ANU843\_492celC, ANU843\_107celC y Anu843\_pBBGFPØ no mostraron fluorescencia verde en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 74).

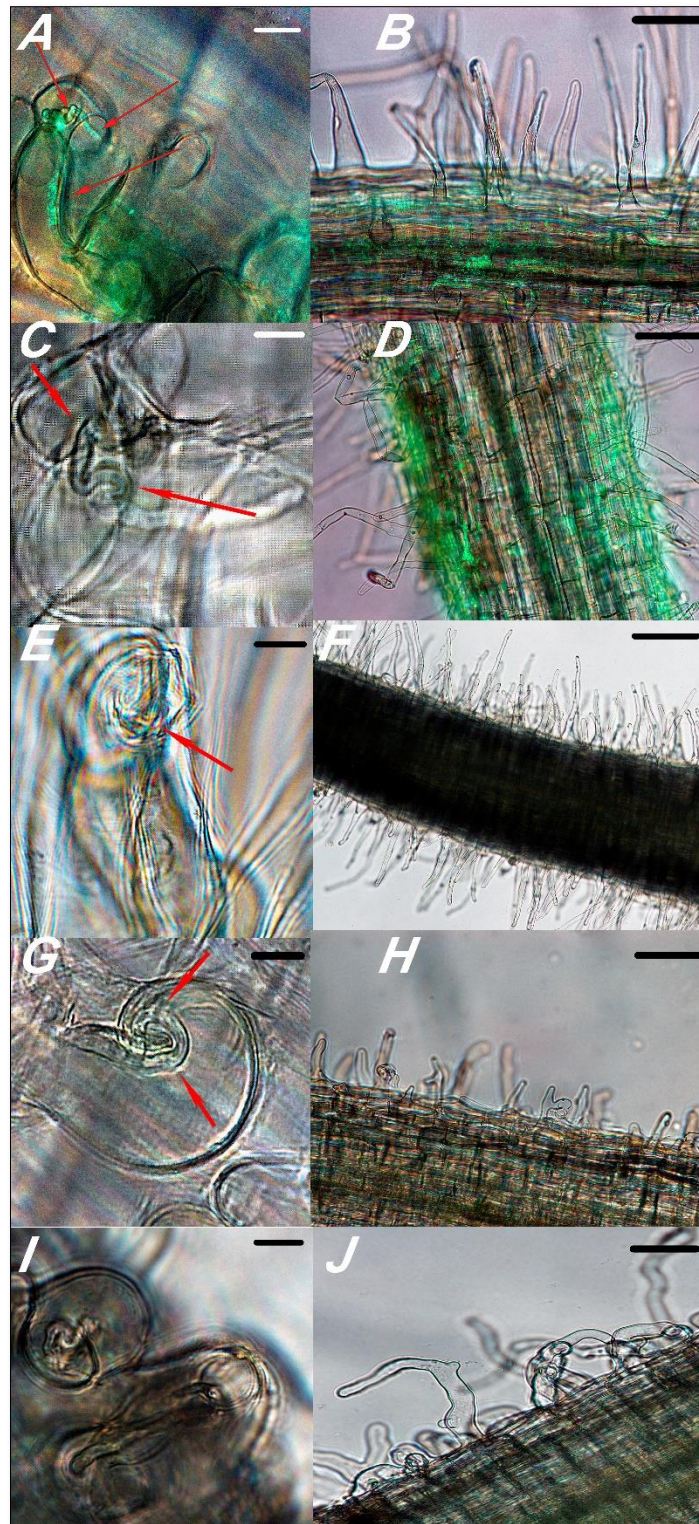
La celulasa celC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* presenta actividad celulásica frente a la celulosa no cristalina en *Trifolium repens*, localizándose en la punta de los pelos radicales, ya que esta enzima es la responsable de la formación del fenotipo HoT (Robledo et al., 2008). No obstante, nuestros resultados ponen de manifiesto que las secuencias promotoras predichas y alojadas dentro del gen *celB* y gen *celC* no muestran actividad en presencia y/o ausencia de CMC bajo las condiciones empleadas. Por el contrario, en el caso de la secuencia promotora aguas arriba del gen *celA* (ANU843\_celA) sí observamos fluorescencia verde en ambas condiciones, indicándonos que esa secuencia efectivamente sí actúa como promotora bajo las condiciones analizadas. Estos resultados se abordarán con más detalle en el apartado de discusión general.

#### 4.1.2. Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales *in planta*.

Una vez obtenidas y analizadas las diferentes fusiones transcripcionales, así como sus respectivos controles en cultivo puro, se procedió a evaluar su efecto *in planta*, por lo que decidimos realizar ensayos de infección en trébol, planta homóloga de la cepa ANU843.

Tras la inoculación y su posterior incubación en cámara iluminada, se seleccionaron distintas raíces de cada tratamiento para su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Se estimaron diferentes etapas inherentes al desarrollo simbiótico como es el anclaje y formación de biofilms y la infección primaria, ya que como se ha descrito en la literatura la celulasa CelC2 degrada la pared celular del extremo apical de los pelos radicales.

En relación con la etapa de anclaje y formación de biofilms, observamos que la fusión transcripcional ANU843\_celA mostraba fluorescencia verde (Figura 75, D) de manera similar al control positivo ANU843\_synGFP a lo largo de la superficie radicular (Figura 75, C). Estos resultados confirman que además de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de celulosa, existe una secuencia localizada aguas arriba del operón que regula al menos la expresión del gen *celA*. En cuanto al resto de fusiones transcripcionales, no observamos fluorescencia verde en la cepa ANU843\_celC492 (Figura 75, H), la cepa ANU843\_celC107 (Figura 75, J) ni en el control negativo ANU843\_pBBGFPØ (Figura 75, F). Estos resultados nos indican que durante el anclaje a la superficie radicular, la potencial secuencia promotora predicha no se encuentra activa y por lo tanto bajo estas condiciones no existe una regulación interna de la expresión del gen *celC*, lo cual podría resultar lógico ya que se ha descrito en la bibliografía la importancia de esta enzima en la infección primaria dentro de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Robledo et al., 2008).



**Figura 75.** Microfotografías de los pelos radiculares y superficie de las raíces de *Trifolium repens* inoculadas con las diferentes cepas de ANU843 que contienen las diferentes fusiones transcripcionales y sus respectivos controles. Se muestra la expresión constitutiva de la GFP en el control positivo (B) y del fragmento *ce1A* (D) durante el proceso de colonización. Los fragmentos denominados *ce1C\_492* (H) *ce1C\_107* (F) no muestran fluorescencia en la etapa de colonización de manera similar al control negativo (F). Durante la infección primaria y formación de canales de infección se aprecia fluorescencia en el control positivo (A), no observándose fluorescencia en el resto de las fusiones transcripcionales, siendo el fragmento *ce1A* (C), *ce1C\_492* (G), *ce1C\_107* (I), y en el control negativo (E). Las flechas señalan los canales de infección de los paneles (A, C, E, G, I). Las escalas de los paneles A, C, E, G e I corresponden a 60µm. Las escalas de los paneles B, D, H y J A 400 µm y el panel F a 800 µm.

En segundo lugar, se realizaron observaciones de los pelos radiculares para analizar de igual manera que en la etapa de colonización, la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales, así como de los controles empleados en este estudio. Como se puede apreciar en la imagen (Figura 75), solo observamos fluorescencia verde en el control positivo que expresa de manera constitutiva una GFP (A). Sin embargo, en el resto de las fusiones transcripcionales no observamos ningún signo de fluorescencia verde, siendo los paneles C, G, E, I, las correspondientes a las construcciones *ce/A*, el control negativo, *ce/C\_492* y *ce/C\_107* respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto, que durante la infección primaria la secuencia con función promotora aguas arriba del gen *ce/A* deja de regular la expresión indicando que durante la formación del canal de infección la cepa ANU843 no sintetiza celulosa, lo cual resulta lógico. Por otro lado, la no observación de fluorescencia verde en las fusiones transcripcionales englobas en su mayor parte dentro del gen *ce/B* y parte del gen *ce/C* ponen de manifiesto que la secuencia promotora interna predicha no parece estar activa.

De una manera global, los resultados obtenidos parecen indicar la existencia de una secuencia promotora que regula sino todo el operón al menos los genes involucrados en la biosíntesis de celulosa, ya que durante el proceso de colonización observamos fluorescencia verde. Asimismo, estas observaciones también fueron apreciadas en cultivo puro tanto en presencia como en ausencia de CMC por parte de la cepa ANU843\_ *ce/A*. Por el contrario, no se observó fluorescencia verde en el resto de las fusiones transcripcionales ni en cultivo puro ni durante la etapa de colonización. Adicionalmente, la expresión promotora observada aguas arribas del gen *ce/A* finalizó durante la formación de los canales de infección, indicando la existencia de una regulación interna de los diferentes genes que conforman el operón *ce/ABC* no siendo debida a la existencia de una secuencia promotora interna aguas arriba del gen *ce/C*, ya que no se observó fluorescencia verde en la punta de los pelos radiculares, así como en presencia del sustrato de la enzima (CMC). Estos datos se abordarán de un modo más detallado en el apartado de discusión general.



# **Discusión general**





El aumento demográfico existente, así como las prácticas agrícolas fundamentadas en el uso de fertilizantes, herbicidas y pesticidas químicos contribuyen a los problemas medio ambientales existentes en el siglo XXI y por consiguiente a la salud humana. Son muchas las organizaciones mundiales y nacionales, que ponen de manifiesto la necesidad de un cambio sostenible inmediato para poder sustentar a una población creciente de la que se estima unos 9,700 millones de personas para el año 2050. Además, ese cambio agrícola debe proporcionar una dieta saludable y accesible fundamentada en una mayor ingesta de legumbres, verduras y frutas frescas (Willett *et al.*, 2019).

Desde hace años, y como alternativa para mitigar en su totalidad o al menos parcialmente los efectos nocivos derivados del uso excesivo de fertilizantes químicos, las investigaciones se han centrado en buscar soluciones sostenibles, ecológicas y naturales, situándose los probióticos como una de las mejores alternativas. Los probióticos son microorganismos que tienen la capacidad de mejorar la salud de su huésped. Dentro del ámbito agrícola se conocen como bacterias PGPB (de sus siglas en inglés **Plant Growth Promotion Bacteria**), es decir, bacterias con habilidades para promover el crecimiento vegetal. Estos microorganismos presentan dos mecanismos de actuación, los denominados directos mejorando la adquisición de nutrientes (biofertilizantes) y/o modulando los niveles hormonales *in situ* de las raíces fomentando su desarrollo (fitoestimuladores) o de manera indirecta, actuando como agentes de biocontrol frente a plagas y fitopatógenos (biopesticidas) (Bhattacharyya and Jha 2012; Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Otro aspecto, a la hora de seleccionar un bioinoculante, es que este debe de ser inocuo para el medio ambiente y la salud humana. En este sentido las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* se clasifican dentro del grupo 1 conforme a lo establecido por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, el cual establece 4 niveles de bioseguridad, siendo el valor 1 el correspondiente a microorganismos que no causan enfermedades, y 4 para aquellos que representan un alto riesgo de contagio individual.

Las bacterias del género *Rhizobium* y su interacción simbiótica con plantas leguminosas ha sido la relación mutualista más estudiada. En los últimos años se ha descrito su potencial como género PGPRs mejorando el rendimiento de cultivos hortícolas como el pimiento o el tomate (García-Fraile *et al.*, 2012), *Lactuca sativa* y *Daucus carota* (Flores-Félix *et al.*, 2013), y en cereales de gran importancia agronómica como *Oryza sativa* (Yanni *et al.*, 2001), *Zea mays* (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero 2001) así como en *Triticum aestivum* (Lupwayi *et al.*, 2004). Estos datos ponen de manifiesto el potencial del género *Rhizobium* como probiótico de un amplio rango de hospedadores.

*Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> fue la especie seleccionada para este trabajo. En el grupo de investigación “Interacciones planta-microorganismo” del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, se aisló esta cepa bacteriana de un nicho completamente diferente al típico nódulo de plantas leguminosas, como fue la madera en descomposición de *Populus alba* y se identificó como una nueva especie dentro del género *Rhizobium*. Además, se describió que poseía una gran actividad celulásica ya que es capaz de utilizar como fuente de carbono el sustrato carboximetilcelulosa (CMC) (García-Fraile *et al.*, 2007).

A partir de estos resultados, en este trabajo se ha llevado a cabo la **caracterización fenotípica y genotípica** (capítulo I y II) de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosityticum* en función de sus posibles mecanismos PGPB, así como de características simbióticas. Para ello, se han empleado pruebas fenotípicas *in vitro*, técnicas moleculares fundamentadas en el uso de la PCR convencional y la secuenciación del genoma de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> (Capítulos I y II).

## Discusión general

Dicha anotación genómica, se realizó empleando dos servidores automáticos distintos, RAST (**R**apid **A**nnotation using **S**ubsystem **T**echnology) (Overbeek *et al.*, 2014) y BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016), ambas herramientas realizan sus búsquedas en bases de datos no redundantes, empleando diferentes algoritmos. El servidor RAST proporciona información sobre genes codificantes, RNAt y RNAr, mientras que la herramienta BlastKOALA proporciona información sobre la existencia de genes ortólogos dentro del genoma objeto de estudio. Es importante destacar, que el genoma empleado para el desarrollo de la presente tesis doctoral se trata de un genoma que no está cerrado, y por lo tanto no podemos asumir que todos los genes estén anotados. Por ello, se emplearon estas dos herramientas bioinformáticas para poder obtener la máxima información génica de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, sobre los potenciales genes inherentes a las bacterias PGPB, como aquellos propios de las bacterias del género *Rhizobium* y su capacidad para establecer una simbiosis efectiva con las leguminosas. Además, de estas dos plataformas de anotación genómica, se empleó el servidor dbCAN2 ligado al análisis de las putativas CAZymes (Zhang *et al.*, 2018). La base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy) es un repositorio muy complejo que proporciona información “curada” de los grupos CAZymes, incluyendo su nombre, número de acceso a GenBank, números EC y estructura 3D. La asignación de una familia CAZy a una nueva secuencia, puede ayudar a descubrir el mecanismo catalítico, los posibles sustratos y los residuos del sitio activo (Yin *et al.*, 2012). La colección de enzimas activas en carbohidratos codificadas por el genoma de un organismo “CAZome” proporciona información útil sobre la naturaleza y el metabolismo de los carbohidratos complejos de la especie (Lombard *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos tras el análisis del CAZome de *Rhizobium cellulosityticum* ALA10B2<sup>T</sup> nos reveló la presencia de enzimas con actividad glucosiltransferasas (GTs) (40,7%), módulos de unión a carbohidratos (CBM) (7,4%), enzimas auxiliares (AAs) (4,6%), esterasas de carbohidratos (CEs) (3,7%) y liasas de polisacáridos (LPs) (1,8%), siendo el número más heterogéneo y abundante el correspondiente al grupo de las glicosil hidrolasas (GHS) (41,6%) lo cual podría estar relacionado con el nicho del que fue aislado, y por tanto de la necesidad de emplear maquinaria enzimática eficiente para la obtención de nutrientes.

La capacidad bacteriana de adaptación a nuevos nichos conlleva un incremento en la competencia por los nutrientes con otros microorganismos, especialmente en el suelo donde las condiciones nutricionales son muy variables y escasas, desencadenando el desarrollo de mecanismos para su supervivencia. Estos mecanismos pueden ser aprovechados por las plantas a través del establecimiento de relaciones mutualistas con microorganismos beneficiosos, siendo a su vez susceptibles de ser utilizados por el ser humano como una alternativa sostenible para la mejora del rendimiento agrícola.

Bajo condiciones de inanición de fosfato, el único proceso conocido hasta la fecha para la obtención de fosfato inorgánico es el regulón *Pho* (Santos-Beneit 2015). Este fue descrito en *Escherichia coli*, y tras su caracterización se ha identificado en muchas otras especies bacterianas (Wanner and Chang 1987). Dentro de esta red de regulación se encuentran los transportadores *Pst* y *phn* (Santos-Beneit 2015) todos ellos identificados en el genoma de ALA10B2<sup>T</sup>. En los mecanismos de producción de ácidos orgánicos, el ácido glucónico parece ser el agente más frecuente involucrado en la solubilización de Pi (Puentes *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006), cuya síntesis es catalizada por la enzima glucosa deshidrogenasa (GHD) (identificada en la cepa de estudio) en presencia del cofactor pirroloquinolina quinina (PQQ), no identificada en el genoma de ALA10B2<sup>T</sup>. Parece ser que la expresión de esta coenzima en el caso de algunos rizobios como *Rhizobium tropici* se realiza bajo ciertas condiciones ambientales de estrés nutricional que conducen a una vía alternativa extracelular para el metabolismo de la glucosa

(Bernardelli et al., 2001). Las pruebas *in vitro* mostraron que la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, fue capaz de solubilizar Pi en forma de fosfato bicálcico, estos resultados junto con la ausencia de la capacidad para solubilizar Pi en forma tricálcica e hidroxapatita son concluyentes para las condiciones de laboratorio, no pudiendo descartar la capacidad para solubilizar otras formas de Pi en condiciones de campo debido a que el análisis *in silico* indicó la identificación de genes relacionados con las vías más importantes empleadas por bacterias PSB para solubilizar Pi.

En cuanto a su potencial como fitoestimulador, sus habilidades parecen estar asociadas a la síntesis de IAA, ya que no se detectaron genes vinculados con otros reguladores hormonales como el ácido abscísico, las giberelinas, citoquininas, el etileno y en relación con este último, genes relacionados con actividad ACC desaminasa. Estos resultados podrían ser indicativos de la ausencia de esta maquinaria genética, pero debido a que el genoma de ALA10B2<sup>T</sup> no es completo, no podemos excluir la presencia de alguno de ellos.

La biosíntesis bacteriana de ácido indolacético (IAA) en la cepa ALA10B2<sup>T</sup> parece llevarse a cabo por una ruta dependiente de L-triptófano denominada ruta indol-3-piruvato (IPA) que es la más común en la biosíntesis de IAA en bacterias PGPB (Spaepen and Vanderleyden 2011). A pesar de que en el genoma no se localizaron los genes involucrados en dicha ruta, sí se identificó un factor  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa (*RpoN*) que está involucrado en la regulación de diversos procesos como la formación de flagelos, asimilación de nitrógeno (Leang et al., 2009) y en la biosíntesis de IAA en bacterias del género *Azospirillum* donde se ha identificado la participación del factor  $\sigma^{54}$  *RpoN* en la expresión del gen *ipdC* inherente de la ruta IPA (Spaepen and Vanderleyden 2011). Además, esta hipótesis se ve respaldada por la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de triptófano, así como por la detección mediante el uso de la espectrofotometría de masas HPLC de IAA. Estos resultados indican una gran capacidad de síntesis (295  $\mu\text{g/ml}$ ), ya que comparando los datos obtenidos con otros rizobios en los se ha empleado la misma técnica y sus datos son públicos, siendo el máximo valor encontrado de 142,5  $\mu\text{g/ml}$  en *Rhizobium* sp.P2 (Kumar Ghosh et al., 2013).

Por otra parte, y en relación con la capacidad biopesticida de las PGPB, los sideróforos se han sugerido como una alternativa sostenible al uso de pesticidas nocivos (Schenk et al., 2012), ya que diversos estudios han determinado su importancia frente a fitopatógenos (Schippers et al., 1987; Pal et al., 2001; Yu et al., 2011; Verma et al., 2011). Los estudios llevados a cabo para la caracterización de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> muestran que es capaz de producir sideróforos y que estos son de la clase de los hidroxamatos, y dentro de estos pertenecientes a la familia de los ferricromos ya que se han identificado los genes *FhuABCD*. Este tipo es uno de los principales sideróforos utilizados por hongos (Renshaw et al., 2002; Winkelmann 2007), aunque también se han detectado en bacterias como *Escherichia coli* (Eisenhauer et al., 2005; Pawelek et al., 2006) y *Pseudomonas aeruginosa* (Hannauer et al., 2010). Asimismo, los análisis *in silico* revelaron la existencia del sistema de transporte para el  $\text{Fe}^{3+}$  *TonB* que constituye el mecanismo por excelencia en bacterias Gram negativas (Carlton et al., 2007; Cornelis 2010; Schalk and Guillon 2013). Estos datos juntos con los resultados positivos obtenidos en las pruebas *in vitro* indican que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> tiene un gran potencial para la síntesis de sideróforos.

En los últimos años, las investigaciones han puesto de manifiesto que algunas rizobacterias son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante la liberación de ciertos compuestos volátiles como la acetoina, los terpenos o el 2, 3 butanodiol (Pérez-Montaña et al., 2014). Este último, se sabe que induce la respuesta defensiva en *Arabidopsis* (Ryu et al., 2003).

## Discusión general

En la cepa ALA10B2<sup>T</sup> se han detectados varios genes para la síntesis de 2, 3 butanodiol. Estos resultados junto al resto de los resultados descritos anteriormente indican que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> es susceptible de ser utilizada como bacteria PGPB.

Una vez determinado su potencial como bacteria PGPB, se procedió a evaluar sus características genóticas inherentes al establecimiento de una simbiosis efectiva con plantas leguminosas.

La síntesis de factores de nodulación (NFs) o lipochitoooligosacáridos (LCOs) es necesaria para la inducción de la organogénesis nodular en las leguminosas y por consiguiente de la FBN. Los genes bacterianos responsables de la secreción de los NFs son los genes de nodulación encontrándose la mayoría de ellos en megaplásmidos como es el plásmido simbiótico o pSym (Cooper 2007). Hasta la fecha todos los rizobios capaces de inducir nódulos presentan en su genoma una o varias copias del operón *nodABC* responsables de la síntesis del esqueleto N-acetil-D-glucosamina de los NFs y de la unión del ácido graso al extremo no reductor del NFs. Otros conjuntos génicos, como por ejemplo *nodFEL* o *nodSU* son específicos de cepa (Poinsoy and Couderc 2017). Todos estos operones están precedidos por promotores que presentan una secuencia consenso de unión NodD que se encuentra unido a cajas *nod* (*nod-box*) (Fisher *et al.*, 1988; Broughton *et al.*, 2000; Cooper 2004). La presencia de este factor transcripcional en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> se ha descrito (García-Fraile *et al.*, 2007). Sin embargo, los análisis *in silico* llevados a cabo en este estudio no indicaron la presencia de dicho activador ni la presencia de genes relacionados con la nodulación. Asimismo, los resultados obtenidos por PCR convencional mostraron una ausencia del gen *nodC* en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. La ausencia de otros genes relacionados con la nodulación tras los análisis *in silico* no son concluyentes ya que el genoma de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> empleado en esta tesis doctoral no está completo.

Además de los NFs, existen otras moléculas necesarias para el establecimiento de una interacción simbiótica como son los lipopolisacáridos (LPS),  $\beta$  glucanos cíclicos, polisacáridos capsulares (KPS) y polisacáridos extracelulares ácidos (EPS) (Skorupska *et al.*, 2006; Marczak *et al.*, 2017). La importancia de cada uno de estos polisacáridos superficiales rizobianos en la nodulación varía en función del tipo de nódulo, es decir, si son determinados o indeterminados (Crespo-Rivas *et al.*, 2009). Además, la acumulación de datos relacionados con la producción de exopolisacáridos sugiere una relación con la infección, la liberación de las células en el interior de los nódulos, la multiplicación de los simbiosomas, así como en la formación de los bacteroides debido a las funciones de protección de estos compuestos en los rizobios contra los compuestos derivados de los mecanismos de defensa de las plantas (Skorupska *et al.*, 2006).

Los exopolisacáridos rizobianos son heteropolisacáridos específicos de especie o de cepa, que pueden ser secretados al exterior (EPS) o quedar retenidos en la superficie bacteriana en forma de polisacáridos capsulares (KPS). Los EPS rizobianos son requeridos para la formación de nódulos indeterminados efectivos en leguminosas como *Medicago sativa*. No obstante, parecen ser imprescindibles en aquellas leguminosas de nódulos determinados como *Phaseolus spp.* o *Glicine max* (Gage 2004). Por otro lado, los EPS junto a los KPS se han descrito como polisacáridos necesarios para la elongación del canal de infección (Gage 2004). Además, se ha propuesto que los KPS rodean a las bacterias proporcionando una barrera protectora tanto frente a bacteriófagos como a condiciones adversas que pueden ocurrir en la rizosfera (Frayssé *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito que los KPS en *Ensifer fredii* HH103 desempeñan un papel

importante en la simbiosis de esta cepa con las leguminosas *Cajanus cajan* y *Glicine max* (Parada *et al.*, 2006).

El papel de los cicloglucanos se relaciona con la adaptación de la bacteria a ambientes hipoosmóticos así como en el proceso de infección relacionado con la presencia de canales de infección (Breedveld and Milleri, 1994). Diversos estudios determinan que mutantes rizobianos en la producción de cicloglucanos exhiben defectos en su habilidad para inducir la formación de nódulos determinados e indeterminados (Bhagwat *et al.*, 1992; Breedveld and Milleri, 1994; D'Antuono *et al.*, 2008; Fraysse *et al.*, 2003; Geremia *et al.*, 1987).

En cuanto a la función simbiótica de los LPS, aún no está esclarecida, este polisacárido superficial rizobiano podría desempeñar un papel activo en las últimas etapas de la interacción simbiótica como por ejemplo inhibiendo las reacciones de defensa de la planta o simplemente ayudando en el proceso de adaptación como endosimbionte (Fraysse *et al.*, 2003).

Tras el análisis *in silico*, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> mostró genes relacionados con la síntesis de cicloglucanos *ndvA* y *ndvB*. Estos genes se han descrito en *Ensifer meliloti* como genes necesarios para la producción de CG (Breedveld and Milleri, 1994). Por otro lado, los genes relacionados con la síntesis de EPS son los denominados *exo/exs* o *pss* formando grandes conjuntos génicos ubicados en el cromosoma o en megaplásmidos (Kaneko *et al.*, 2000; Finan *et al.*, 2001). En el genoma de ALA10B2<sup>T</sup> se identificaron algunos genes relacionados con la ruta de síntesis de succinoglicano o EPSI en *Ensifer meliloti* como transferasas codificadas por los genes *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoF*, *exoY* y *exoW* involucradas en la transferencia de precursores al portador lipídico, enzimas modificadores como *ExoZ* y proteínas involucradas en el ensamblaje y exportación del EPS como *ExoP* (Skorupska *et al.*, 2006). Estos hallazgos génicos podrían indicar una posible función similar en el caso de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>.

Otro mecanismo necesario en la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa es la adhesión bacteriana a la superficie radicular, ya que constituye una etapa clave para la interacción. Las microfibrillas de celulosa se han descrito como las responsables del anclaje irreversible de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* a las raíces de su hospedador *Trifolium repens* (Mateos *et al.*, 1995).

Los estudios llevados a cabo mediante el uso del colorante Rojo Congo, indican la presencia de un polisacárido con enlaces  $\beta$  1,4 en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> (Robledo *et al.*, 2012; Diez-Mendez *et al.*, 2015). Su naturaleza, se determinó mediante un ensayo enzimático con diferentes proteasas y celulasas, siendo estas últimas las responsables de la disgregación de todos los flóculos. La regulación génica de la biosíntesis de celulosa en dicha cepa es debida a la presencia de dos operones, un operón *celAB* y otro compuesto con una glicosiltransferasa (GT) perteneciente a la superfamilia de las celulosa sintasas y una endoglucanasa. Los estudios llevados a cabo por Römling, (2002) y Römling and Galperin, (2015), han puesto de manifiesto una gran diversidad de operones involucrados en la biosíntesis de celulosa y en la formación de biofilms de bacterias patógenas y beneficiosas, demostrando la importancia de este polímero en las interacciones planta-microorganismo.

Otra molécula de gran importancia son las celulasas simbióticas. Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto la importancia de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 en el proceso de infección primaria durante la interacción con su hospedador, ya que mutantes deficientes en dicha celulasa fueron incapaces

## Discusión general

de inducir canales de infección y por lo tanto de establecer una simbiosis efectiva (Robledo *et al.*, 2008).

La cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* posee un gran actividad celulásica debido a que es capaz de crecer utilizando como fuente de carbonos, el sustrato carborximetilcelulosa (García-Fraile *et al.*, 2007). Asimismo, dicha actividad se ha comparado con otras cepas tipo, exhibiendo una gran halo hidrolítico (Diez-Mendez *et al.*, 2015).

Esta actividad está regulada por la presencia de 3 isoenzimas. El empleo de la herramienta Blastp mostró que ninguna de ellas presentaba homología con la celulasa simbiótica CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* *bv trifolii* descrita como marcador filogenético del género *Rhizobium* (Robledo *et al.*, 2011). Sin embargo, mostró una alta homología con celulasas pertenecientes al género *Neorhizobium*. Esta ausencia enzimática se corroboró mediante el uso de la PCR convencional. Asimismo, el estudio llevado a cabo para determinar la temperatura y pH óptimo de la actividad celulásica de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> nos mostró un amplio rango de temperatura y pH muy diferente a los parámetros óptimos de la celulasa CelC2 (pH5,2 y 37°C) (Robledo *et al.*, 2012). Estos resultados de tan amplio rango pueden ser debidos a la funcionalidad de las 3 isoenzimas identificadas en el genoma. Otra diferencia, es que la celulasa CelC2 pertenece a la familia 8 de las GH, mientras que las celulasas identificadas en *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> pertenecen a la familia GH5, que junto con la familia GH9 se han descrito como enzimas celulolíticas involucradas en la hidrólisis de celulosa con actividad endo/exo glucanasa y  $\beta$  glucosidasa respectivamente (Mhuantong *et al.*, 2011).

El metabolismo del nitrógeno en nódulos esta catalizado por la enzima nitrogenasa (D Oldroyd 2013). Los genes responsables de la FBN son los denominados genes *nif*. A pesar de que la regulación de estos genes depende directamente de la proteína NifA, la expresión de dichos productos génicos varía entre los distintos rizobios (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Los estudios *in silico* llevados a cabo en el genoma de ALA10B2<sup>T</sup> no indicaron la presencia de ningún gen relacionado con la enzima nitrogenasa y por consiguiente con los mecanismos relacionados con la FBN. Sin embargo, si se identificó la presencia del sistema de componentes FixL-FixJ. Este complejo regula las expresiones de genes reguladores implicados en la fijación del nitrógeno como *NifA* y/o en la respiración aerobia FixK en diferentes rizobios (David *et al.*, 1988; de Philip *et al.*, 1990; Bobik *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2018).

La ausencia de genes simbióticos, derivados del estudio *in silico* no constituyen datos concluyentes ya que como se ha mencionado anteriormente, se trata de un borrador genómico incompleto, no pudiendo asumir que todos los productos génicos estén anotados.

Por ello, y para evaluar el **comportamiento simbiótico** de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum*, se realizaron inoculaciones simples en leguminosas como *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris* (capítulo III).

Los resultados derivados de estos estudios mostraron evidencias macroscópicas de respuesta en todas las leguminosas. Una evidencia de la posible existencia de genes involucrados con la presencia de genes relacionados con la nodulación en la cepa ALA10B2<sup>T</sup> son los cambios morfológicos observados en las raíces de tres leguminosas, ya que dicha cepa induce deformaciones de los pelos radicales similares al fenotipo Had el cual se ha descrito que es debido a la presencia de factores de nodulación (Oldroyd and Downie 2008). Otro fenotipo radicular simbiótico observado fue el fenotipo Hot, siendo la celulasa CelC2 responsable de la formación de

un agujero en el ápice de la punta apical constituyendo la puerta de entrada en la vía canónica (Robledo et al., 2008). A pesar de la identificación de genes relacionados con la producción de EPSI, no se observaron canales de infección (fenotipo Inf) en ninguna de las leguminosas, así como tampoco se observó la formación del fenotipo Hac o el característico cayado de Pastor. Estos dos últimos fenotipos se relacionan con la presencia de factores de nodulación, así como de la presencia de un rizobio compatible, respectivamente (Esseling et al., 2003).

A pesar de la ausencia de una celulasa homóloga a la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, se observaron fenotipos relacionados con dicha celulasa como el fenotipo Hot y el fenotipo RaT. Este último fenotipo se ha observado de manera significativa en las raíces de diferentes leguminosas tras la inoculación de mutantes superproductores que expresan de manera heteróloga y homóloga dicha celulasa en comparación con las cepas salvajes. Asimismo, se postula que ese fenotipo puede ser debido como “respuesta a la agresión que supone la degradación del ápice del pelo producido por la celulasa CelC2 y/o como una respuesta de defensa de la planta al “sentir” el desequilibrio en la acción de dicha celulasa no siendo suficiente para abortar el proceso de infección” (Menéndez, TD, 2014). Por lo tanto, la observación de ambos fenotipos tras la inoculación de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> podrían ser debidos a sus mecanismos hidrolíticos ya que las 3 isoenzimas identificadas en el genoma se relacionan con GH involucradas en la hidrólisis de celulosa (Mhuantong et al., 2011). A pesar de este gran potencial hidrolítico, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> interactúa de una manera positiva con las tres leguminosas seleccionadas ya que ninguna de ellas mostro signos de enfermedad.

Por otro lado, es importante destacar que en ninguna de las leguminosas se observó la formación de Nois o primordios nodulares y por consiguiente indicios de la FBN inherente a la familia *Rhizobiaceae*.

En relación a las etapas de anclaje radicular, el uso de la microscopía y la luz polarizada nos reveló que, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> es una gran colonizadora y formadora de biofilms llegando a envolver casi por completo las raíces de las leguminosas seleccionadas, observándose el fenotipo Roc así como la adhesión a la punta de los pelos radicales (“caps”). Debido a la gran cantidad de celulosa y por consiguiente a la gran capacidad de esta cepa de adherirse a través de la punta de los pelos radicales formando biofilms entre ellos, simulando “puentes de celulosa” se decidió definir a este fenotipo como *cellu-bridge*.

Los resultados obtenidos del comportamiento simbiótico de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* ponen de manifiesto, que parte de la maquinaria genética necesaria para la inducción de nódulos, así como para el establecimiento de una simbiosis efectiva se podrían haber perdido. Esta hipótesis podría ser debida a que el nicho del que se aisló dista con creces del típico nódulo de las leguminosas, y por lo tanto la supervivencia en ese ambiente requiere de otras estrategias metabólicas. No obstante, futuros estudios son necesarios para dilucidar esta hipótesis, teniendo como base un genoma completo, diferenciando previamente el ADN cromosómico de las potenciales secuencias plasmídicas.

A pesar de que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> no es capaz por sí sola de establecer una relación simbiótica efectiva, los estudios llevados a cabo mediante microscopía de fluorescencia mostraron un comportamiento endofítico en el caso de las raíces de *Phaseolus vulgaris*, penetrando a través de espacios intercelulares. Entre las diferentes vías de entrada utilizadas por los rizobios, la infección intercelular constituye una vía ancestral independiente de factores de nodulación (Madsen et al., 2010). Este mismo comportamiento se observó en **co-inoculación** con la cepa

## Discusión general

TPV08 identificada como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* aislada de nódulos efectivos por nuestro grupo de investigación (García-Fraile *et al.*, 2012). Las diferentes técnicas de microscopía empleadas mostraron que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> en presencia del endosimbionte TPV08 es capaz de llegar al interior de los nódulos y ocupar los espacios intercelulares. Asimismo, su presencia en el interior no daña la estructura de los nódulos tal y como muestran las microfotografías, obteniéndose nódulos determinados típicos. Destacadamente, la coinoculación de ambos rizobios en *Phaseolus vulgaris* mejora de manera estadísticamente significativa la producción así como el valor nutricional del grano de *Phaseolus vulgaris* (Díez-Mendez *et al.*, 2015). Estos resultados podrían ser debidos a un efecto sinérgico entre los dos rizobios, ya que ambos presentan mecanismos promotores del crecimiento vegetal.

La obtención de nódulos en el tratamiento inoculado con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> podría ser debido a la presencia de otros rizobios, ya que en los ensayos de invernadero el sustrato empleado no se esterilizó, y los ensayos de cámara iluminada realizados en condiciones estériles no mostraron la formación de nódulos. Asimismo, el interior de estos nódulos presentaban en su mayoría células vacías. Mientras que los nódulos procedentes del tratamiento inoculado con la cepa TPV08 como el tratamiento con ambos rizobios exhibían un interior celular mayoritariamente ocupado, siendo los nódulos de la co-inoculación los de mayor tamaño, lo cual también podría estar relacionado con los valores significativamente mayores obtenidos en relación a la producción.

Estos resultados nos sugieren que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> podría actuar como un potenciador o “helper” de otros microsimbiontes debido principalmente a su gran capacidad de formar biofilms, actuando de barrera protectora. A esto, habría que sumar sus potenciales mecanismos promotores vegetales descritos en la presente tesis doctoral.

Los resultados obtenidos de los ensayos de invernadero llevados a cabo con leguminosas como *Medicago sativa* y *Trifolium repens* podrían apoyar esta hipótesis, ya que se observó que los tratamientos inoculados con la cepa ALA10B2<sup>T</sup> junto con los endosimbiontes respectivos de cada una de las leguminosas empleadas, mostraron un incremento significativo en los parámetros relacionados con la longitud aérea y el peso seco. En cuanto a la producción de nódulos, estos fueron mayores en el caso de la co-inoculación en *Medicago sativa*.

El uso de consorcios bacterianos formados por bacterias simbiotes y bacterias PGPB no es algo nuevo. En este sentido, Pandey and Maheshwari, (2007) describieron que el uso de consorcios formados por bacterias PGPB pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Burkholderia* junto a simbiotes pertenecientes a las especies *Ensifer meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* mejoran la producción de *Cajanus cajan* debido a un incremento en el número de nódulos en comparación con las plantas control tratadas con las inoculaciones simples.

Resultados similares obtuvieron Subramanian *et al.*, (2015) mediante el uso de dos bacterias endofíticas, LNL6 aislada de nódulos de *Lespedeza* sp e identificada como *Bacillus megaterium* y la cepa *Methylobacterium oryzae* CBMB20 aislada de las hojas de *Oryza sativa*, junto a la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* MN110. Sus resultados muestran una mejora en el cultivo de *Glycine max* debido a un incremento en el número de nódulos, así como a los mecanismos promotores vegetales de las cepas endofíticas.



A pesar de que en el caso de *Trifolium repens*, el tratamiento inoculado con ambos rizobios presentara un menor número de nódulos que el tratamiento inoculado con la cepa ANU843, no afectó al desarrollo de las plantas, ya que las variables analizadas exhibieron un mejor resultado.

El uso de bacterias PGPB's para la mejora de la producción en cereales, reduciendo el uso de fertilizantes químicos es una tendencia cada vez más empleada para el desarrollo de una agricultura sostenible (Hayat *et al.*, 2010; Chaiharn and Lumyong 2011). El uso de bacterias diazotróficas de vida libre más empleadas pertenecen a los géneros *Azospirillum* (Islam *et al.*, 2002), *Acetobacter* (James *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 2004) y *Burkholderia* (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 2002), entre otros. Sin embargo, hay cada vez más autores que están centrando su atención en otros mecanismos promotores del crecimiento vegetal como son la solubilización de fosfato y la producción de fitohormonas, siendo las auxinas las de mayor importancia (Hayat *et al.*, 2010).

Conforme al potencial como bacteria PGPB observado por parte de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>, se decidió estudiar su **capacidad para interactuar con diferentes cereales** como *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *Avena sativa* (capítulo IV).

En una primera aproximación, se realizaron inoculaciones simples en los tres cereales. De manera similar a lo observado en las raíces de las plantas leguminosas, se observaron evidencias macroscópicas de interacción. Entre los diferentes cambios morfológicos de los pelos radicales, se observó deformaciones o fenotipo Had, el fenotipo RaT, y la rotura de la punta de los pelos radicales o fenotipo Hot. Además, se observó otro fenotipo relacionado con el crecimiento bidireccional de la punta apical en sendos cereales (fenotipo branching).

Este último fenotipo junto a las redirecciones, se han observado en plantas de maíz, trigo, tomate y otras plantas herbáceas tras la inoculación de *Azospirillum* (Dobbelaere and Okon 2007). Estos autores, ponen de manifiesto que la producción de fitohormonas como las pertenecientes al grupo de las auxinas por parte de la bacteria puede ser las responsables de los cambios morfológicos observados. Del mismo modo, estos cambios inducidos por *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en sendos cereales podrían estar relacionados con su gran capacidad para sintetizar ácido indolacético. En relación a los fenotipos RaT y Hot, no se ha encontrado en la literatura información sobre su observación en las raíces de estos cereales, siendo este trabajo la primera evidencia, pudiendo relacionar dichos cambios con la actividad celulásica.

Otro efecto derivado de la capacidad de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> para producir IAA, fue el incremento de la longitud radicular siendo mayor en el caso de la *Avena sativa* con respecto al control, y significativamente superior en las plantas de *Zea mays* y *Triticum aestivum*.

Diferentes autores determinan que el desarrollo radicular está relacionado con la producción de fitohormonas, siendo el ácido indolacético la que desempeña un papel más directo y crucial en la elongación de las raíces (Aloni *et al.*, 2006; Spaepen and Vanderleyden 2011). Los resultados obtenidos de los diferentes ensayos de cámara iluminada podrían estar relacionados con las habilidades PGPB de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>. Los resultados derivados de los ensayos de invernadero mantienen la tendencia de mejora de las plantas inoculadas en comparación con las plantas control, siendo significativamente mayor en el caso de *Triticum aestivum*.

Esta tendencia en la mejora del desarrollo vegetal se demostró en el caso de los ensayos de campo de *Zea mays*, los cuáles mostraron un incremento en la producción debido al incremento del peso de las mazorcas, como al número de semillas obtenidos por mazorca.

## Discusión general

Diversos trabajos muestran el efecto beneficioso de bacterias productoras de IAA mejorando el desarrollo vegetal de *Triticum aestivum* en comparación con plantas control por parte de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (Egamberdiyeva 2005), y diferentes rizobacterias (Khalid *et al.*, 2004). Estos efectos también se han descrito en el caso de la mejora de *Zea mays* (Egamberdiyeva 2005). En cuanto al empleo de bacterias PSB, se ha descrito el incremento hasta en un 96% la producción de *Triticum aestivum* en condiciones de invernadero y hasta un 80% en ensayo en campo (Zabihi *et al.*, 2011) tras la inoculación de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. No obstante y a pesar de que las bacterias del género *Rhizobium* presentan cualidades PGPBs su aplicación para la mejora del cultivo de cereales en condiciones de invernadero se reduce a técnicas de rotación de cultivos (Sanginga *et al.*, 2003). No obstante, las habilidades para formar biofilms mostradas por la cepa ALA10B2<sup>T</sup> también pueden influir en los efectos positivos observados, actuando como barrera protectora. Además, en el caso de *Zea mays*, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> exhibió un comportamiento endofítico en las raíces de dicha planta, estableciendo un contacto más íntimo y directo con la planta, traduciéndose en un incremento en la producción de los ensayos de campo en comparación con las plantas control, del 4% y 18% en la parcela sin fertilizar, y fertilizada respectivamente.

Todo ello, pone de manifiesto que la cepa ALA10B2<sup>T</sup> no es sólo capaz de interactuar de un modo beneficioso en las leguminosas seleccionadas, sino que también es capaz de establecer una relación beneficiosa con cereales como *Zea mays*, *Triticum aestivum*, y *Avena sativa*. Esta capacidad de interacción con un amplio rango de hospedadores podría estar relacionado con sus mecanismos como bacteria PGPB, así como su capacidad para colonizar las superficies radiculares de un amplio rango de hospedadores, haciendo de ella una cepa muy competitiva en la rizosfera.

Probablemente, uno de los procesos bioquímicos más importante en las interacciones planta-microorganismo, y que peor se conoce a nivel molecular es la **biosíntesis de celulosa** (Capítulo V). Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, han determinado el papel importante de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa bacteriana, ya que mutantes defectivos o superproductores muestran comportamientos diferentes en la producción de celulosa y formación de biofilms tanto en superficies abióticas como bióticas (Robledo *et al.*, 2012). Este comportamiento parece ser específico de género, ya que la sobreexpresión heteróloga en varias cepas del género *Ensifer* como la cepa WSM419 de *Ensifer medicae* y la cepa 1021 de *Ensifer meliloti* no presentó modificaciones en la biosíntesis de celulosa ni en la formación de biofilms (Menéndez, TD, 2014). Asimismo, la cepa de *Ensifer medicae* WSM419 presenta una celulasa CelC con alta homología a la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 (Menéndez, TD, 2014). Sin embargo, la sobreexpresión homóloga de la celulasa CelC en *Ensifer medicae* WSM419 no presentó efectos similares a los observados en los mutantes superproductores de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843CelC2<sup>+</sup> (datos no publicados).

En relación a estos datos, se decidió evaluar el posible efecto que ambas celulasas podrían desencadenar en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. En los análisis relacionados con la detección de actividad celulásica de los transconjugantes, no apreciamos una mayor actividad en comparación con la cepa salvaje, lo cual no es concluyente ya que se trata de un método cualitativo. Sería conveniente realizar estudios de cuantificación de actividad celulolítica, mediante la valoración de grupos reductores o BCA. Sin embargo, con el empleo de la escala colorimétrica publicada por Robledo *et al.*, (2012), sí observamos cambios de coloración en los diferentes transconjugantes. La cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 exhibía un color más blanquecino,

seguida de la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 en comparación con las tonalidades rojizas observadas en las cepas ALA10B2<sup>T</sup>\_wt y la cepa ALA10B2<sup>T</sup>\_EV. Estos resultados proporcionan más evidencias sobre el papel de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa del género *Rhizobium*.

En contraposición, los ensayos *in planta* llevados a cabo en la presente tesis doctoral con los diferentes transconjugantes, indicaron un retraso en la formación de biofilms, y por consiguiente en la colonización de las raíces de ambas leguminosas por parte de la cepa que sobreexpresa de manera heteróloga la celulasa CelC2 (ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2), no observando una nula formación de biofilms como se describe en los mutantes superproductores de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 (Robledo et al., 2012). Estos resultados abren la puerta para futuros estudios, en los que sería necesario realizar ensayos enzimáticos, así como estudios de PCR cuantitativa para analizar si la producción de celulosa es debida al operón *celAB* o a una sinergia de ambos operones identificados en el genoma, ya que el único producto génico que mostró homología con la celulosa sintasa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 fue la subunidad catalítica de celulosa, *celA*, de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>, por lo que la continua formación de biofilms observada *in planta* por el transconjugante ALA10B2<sup>T</sup>\_pJZC2 podría ser debido a la celulosa sintasa confinada en el otro operón.

A pesar de que las colonias de ALA10B2<sup>T</sup>\_WSM419 exhibieron una coloración más blanquecina que los controles positivos, la capacidad para colonizar y formar biofilms *in planta* no se vio afectada concordando con los datos realizados por la Dra. Menéndez (comunicación personal). Asimismo, los cambios morfológicos observados en todos los transconjugantes fueron similares a la cepa salvaje como al control negativo.

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro grupo de investigación muestran que el operón *celABC* de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843 se transcribe formando un único fragmento de ARN mensajero policistrónico, demostrando que los genes *celA*, *celB* y *celC* constituyen un operón (Robledo, TD; 2010). Sin embargo, la predicción de una región reguladora interna del gen *celC* precedida de un motivo Shine-Dalgarno, junto con los resultados obtenidos con los mutantes por Ausmees *et al.*, (1999), así como los estudios llevados a cabo sobre la implicación de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ANU843, apoyan la posible existencia de algunos mecanismos de regulación interna o postranscripcional del gen *celC* independientemente de sus predecesores.

En este trabajo, se comprobaron las predicciones bioinformáticas, además, se clonó la regulación génica del operón completo, ubicada aguas arribas del gen *celA*. Con todas estas potenciales regiones promotoras se realizaron fusiones transcripcionales a una GFP sin promotor para evaluar la expresión de cada una de ellas. Como controles adicionales, se emplearon un plásmido constitutivo de expresión de la GFP, y como control negativo el plásmido vacío empleado para la construcción de las fusiones transcripcionales. En primer lugar, se evaluó, si dichas regiones promotoras se expresaban de manera constitutiva o por el contrario algunas de ellas eran inducibles en presencia de CMC (carboximetilcelulosa). Los resultados derivados de este estudio nos indicaron que aquella fusión transcripcional que contenía la secuencia reguladora aguas arribas del gen *celA* fue la única que mostró expresión tanto en cultivo puro como en presencia de CMC como en su ausencia. No obstante, el comportamiento de la expresión de dicha fusión transcripcional en contacto con su hospedador, *Trifolium repens* nos indicó una activación de la expresión durante los procesos de colonización e infección, no observándose dicha activación en los canales de infección. En referencia con el resto de las fusiones transcripcionales, ninguna de

## Discusión general

ellas mostró expresión en presencia de CMC o en su ausencia, al igual que en los primeros estadios del desarrollo simbiótico.

Estos resultados ponen de manifiesto que la expresión del gen *ce/A* es activa en los procesos relacionados con la formación de biofilms, es decir, con la fase sésil del microorganismo. Esta activación se bloquea o se interrumpe para un cambio a fase móvil, como es la entrada del rizobio por vía canónica en el interior de las raíces de *Trifolium repens*. Asimismo, los resultados obtenidos de las fusiones transcripcionales de las secuencias promotoras del gen *ce/C* indican que la regulación de ese gen, no es debida a la presencia de una región promotora interna, ya que los resultados no mostraron fluorescencia en la infección primaria donde se ha descrito la necesidad de dicha enzima (Robledo *et al.*, 2008). Por lo tanto, proponemos que la regulación de dicho gen podría ser debido a procesos postranscripcionales.

**Conclusiones**



A continuación, se exponen las principales conclusiones extraídas de la presente Tesis Doctoral:

1. Los resultados observados para la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> en relación a la colonización y formación de biofilms sobre la superficie radicular de diferentes cultivos de gran interés agronómico como son *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa* y *Zea mays* indican que esta cepa es un competidor eficaz por la superficie radicular en diferentes tipos de cultivos.
2. La ausencia de genes simbióticos relacionados con la capacidad para establecer una simbiosis efectiva, provocan que la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> penetre en el interior de las raíces de *Phaseolus vulgaris* mediante vías de infección intercelular y se comporte como un endófito.
3. La inoculación conjunta de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* junto con un endosimbionte compatible en el caso de *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *Phaseolus vulgaris* potencia la producción de estos cultivos por lo que esta cepa es susceptible de ser usada como co-inoculante en leguminosas.
4. La inoculación de la cepa ALA10B2<sup>T</sup> de *Rhizobium cellulosilyticum* en cultivos de *Triticum aestivum*, *Avena sativa* y *Zea mays* incrementa el desarrollo vegetal, por lo que es susceptible de ser usada como bioinoculantes en cereales.
5. Los estudios genómicos permiten obtener una gran cantidad de información relacionada con la presencia de rutas metabólicas implicadas en el desarrollo vegetal, por lo que se erigen como una potente herramienta a la hora de seleccionar bioinoculantes microbianos.
6. La sobreexpresión de la celulasa CelC2 de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* en la cepa de *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup> disminuye la producción de celulosa *in vitro* traduciéndose en un retraso en la formación de biofilms *in planta*, no observándose dicho efecto en los transconjugantes que sobreexpresan heterológamente la celulasa CelC de WSM419 de *Ensifer medicae*. Estos datos corroboran la especificidad de la celulasa CelC2 en el género *Rhizobium*.
7. Los resultados obtenidos en este estudio relacionado con las fusiones transcripcionales permiten corroborar la importancia de la regulación del operón *celABC* en el proceso simbiótico.





# Referencias



- Aguado-Santacruz G, Moreno-Gomez B, Jimenez-Francisco B, et al (2012) Impact of the Microbial Siderophores and Phytosiderophores on the Iron Assimilation by Plants: a Synthesis
- Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J King Saud Univ - Sci* 26:1–20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ahmad M, Nadeem SM, Naveed M, Zahir ZA (2016) Potassium-Solubilizing Bacteria and Their Application in Agriculture. In: Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer India, New Delhi, pp 293–313
- Ahmad M, Zahir ZA, Khalid M, et al (2013) Efficacy of Rhizobium and Pseudomonas strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol Biochem* 63:170–176. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.024
- Ahmed E, Holmström SJM (2014a) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* 7:196–208. doi: 10.1111/1751-7915.12117
- Ahmed E, Holmström SJM (2014b) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* 7:196–208. doi: 10.1111/1751-7915.12117
- Alexander DB, Zuberer D a (1991) Use of chrome azurol-S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39–45
- Alexandratos N, Bruinsma J (2012) World Agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision
- Alkhalaf LM, Ryan KS (2015) Biosynthetic Manipulation of Tryptophan in Bacteria: Pathways and Mechanisms. *Chem Biol* 22:317–328. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2015.02.005
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* 97:883–93. doi: 10.1093/aob/mcl027
- Amara U, Khalid R, Hayat R (2015) Soil Bacteria and Phytohormones for Sustainable Crop Production. pp 87–103
- Aoki S, Ito M, Iwasaki W (2013) From  $\beta$ - to  $\alpha$ -Proteobacteria: The Origin and Evolution of Rhizobial Nodulation Genes nodJ. *Mol Biol Evol* 30:2494–2508. doi: 10.1093/molbev/mst153
- Ardourel M, Demont N, Debelle F, et al (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* 6:1357–74. doi: 10.1105/tpc.6.10.1357
- Arruda L, Beneduzi A, Martins A, et al (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Appl Soil Ecol* 63:15–22. doi: 10.1016/J.APSOIL.2012.09.001
- Assmann SM (2010) Abscisic Acid Signal Transduction in Stomatal Responses. In: Plant Hormones. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 399–426
- Ausmees N, Jacobsson K, Lindberg M, et al (2001) A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. *Microbiology* 147:549–559. doi: 10.1099/00221287-147-3-549
- Baek JH, Lee SY (2006) Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 264:104–109. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00440.x
- Bashan Y, Kamnev AA, de-Bashan LE (2013) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils* 49:465–479. doi: 10.1007/s00374-012-0737-7
- Belimov AA, Dodd IC, Safronova VI, et al (2014) Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth. *Plant Physiol Biochem* 74:84–91. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2013.10.032
- Bellenger JP, Wichard T, Kustka AB, Kraepiel AML (2008) Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. doi: 10.1038/ngeo161
- Bellenger JP, Xu Y, Zhang X, et al (2014) Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by

## Referencias

- asymbiotic N<sub>2</sub>-fixing bacteria in soils. *Soil Biol Biochem* 69:413–420. doi: 10.1016/J.SOILBIO.2013.11.015
- Berlemont R, Delsaute M, Pipers D, et al (2009) Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples. *ISME J* 3:1070–1081. doi: 10.1038/ismej.2009.48
- Bernardelli CE, Luna MF, Galar ML, Boiardi JL (2001) Periplasmic PQQ-Dependent Glucose Oxidation in Free-Living and Symbiotic Rhizobia *Current Microbiology An International Journal*. *Curr Microbiol* 42:310–315. doi: 10.1007/s002840010222
- Bhagwat AA, Tully RE, Keister DL (1992) Isolation and characterization of an ndvB locus from *Rhizobium fredii*. *Mol Microbiol* 6:2159–2165. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01389.x
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9
- Biederbeck VO, Bouman OT, Campbell CA, et al (1996) Nitrogen benefits from four green-manure legumes in dryland cropping systems. *Can J Plant Sci* 76:307–315. doi: 10.4141/cjps96-053
- Biswas Bhattacharjee R, Jourand P, Chaintreuil C, et al Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. doi: 10.1007/s00374-011-0614-9
- Biswas J, Ladha J, Dazzo F (2000) *Rhizobia* inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice
- Bloemberg G V, Lugtenberg BJ. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* 4:343–350. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00183-7
- Bobik C, Meilhoc E, Batut J (2006) FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 188:4890–902. doi: 10.1128/JB.00251-06
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, et al (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:874–880. doi: 10.1007/s00253-006-0731-9
- Borthakur D, Johnston AW (1987) Sequence of psi, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by psr, another gene on the symbiotic plasmid. *Mol Gen Genet* 207:149–54
- Bottini R, Casson F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:497–503. doi: 10.1007/s00253-004-1696-1
- Braud A, Hoegy F, Jezequel K, et al (2009a) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol* 11:1079–1091. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T (2009b) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74:280–286. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.013
- Braun V, Braun M (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 529:78–85. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03185-X
- Breedveld1 MW, Milleri KJ (1994) Cyclic ,B-Glucans of Members of the Family Rhizobiaceae
- Brewin NJ, Hirsch A (2004) Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. *CRC Crit Rev Plant Sci* 23:293–316. doi: 10.1080/07352680490480734
- Broek A Vande, Gysegom P, Ona O, et al (2005) Transcriptional Analysis of the *Azospirillum brasilense* Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene and Identification of a *cis* -Acting Sequence Involved in Auxin Responsive Expression. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:311–323. doi: 10.1094/MPMI-18-0311
- Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X (2000) Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* 182:5641–52
- Brown A. (1886) XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *J Chem Soc Trans* 49:432–439
- Brown Jr RM, Saxena IM (2000) Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol Biochem* 38:57–67. doi: 10.1016/S0981-9428(00)00168-6

- Buol SW, Eswaran H (1999) Oxisols. *Adv Agron* 68:151–195. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60845-7
- Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y (2000) Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *Microb Interact Agric For* (Volume II) 229–250
- Burland V, Plunkett G, Daniels DL, Blattner FR (1993) DNA Sequence and Analysis of 136 Kilobases of the *Escherichia coli* Genome: Organizational Symmetry around the Origin of Replication. *Genomics* 16:551–561. doi: 10.1006/geno.1993.1230
- by Khush EG, Bennett J (1992) Nodulation and Nitrogen Fixation in Rice POTENTIAL AND PROSPECTS
- Cárdenas L, Holdaway-Clarke TL, Sánchez F, et al (2000) Update on Signaling Ion Changes in Legume Root Hairs Responding to Nod Factors 1
- Carlton TM, Sullivan JT, Stuart GS, et al (2007) Ferrichrome utilization in a mesorhizobial population: microevolution of a three-locus system. *Environ Microbiol* 9:2923–2932. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01402.x
- Carson KC, Meyer J-M, Dilworth MJ (2000) Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biol Biochem* 32:11–21. doi: 10.1016/S0038-0717(99)00107-8
- Cegelski L, Smith CL, Hultgren SJ (2017) Microbial Adhesion ☆. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier
- Celador-Lera L, Menendez E, Peix A, et al (2017) *Rhizobium zeae* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:2306–2311. doi: 10.1099/ijsem.0.001944
- Celador Lera L (2017) Selección de bioinoculantes agrícolas mediante la caracterización molecular y funcional de bacterias asociadas a *Zea mays* y su análisis práctico en la mejora del rendimiento de cultivos de maíz, canónigos, albahaca, berros y rúcula
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant Soil* 184:311–321. doi: 10.1007/BF00010460
- Chaiham M, Lumyong S (2011) Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. *Curr Microbiol* 62:173–181. doi: 10.1007/s00284-010-9674-6
- Chandler D, Davidson G, Grant WP, et al (2008) Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends Food Sci Technol* 19:275–283. doi: 10.1016/J.TIFS.2007.12.009
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, et al (2007) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol* 25:1007–1014. doi: 10.1038/nbt1325
- Cheng HP, Walker GC (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180:5183–5191. doi: 10.1105/TPC.10.5.781
- Chi F, Shen S-H, Cheng H-P, et al (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl Environ Microbiol* 71:7271–8. doi: 10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005
- Clausen CA (1996) Bacterial associations with decaying wood: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 37:101–107. doi: 10.1016/0964-8305(95)00109-3
- Cohen AC, Bottini R, Piccoli P (2015) Role of Abscisic Acid Producing PGPR in Sustainable Agriculture. Springer, Cham, pp 259–282
- Cohen AC, Bottini R, Piccoli PN (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *arabidopsis* plants. *Plant Growth Regul* 54:97–103. doi: 10.1007/s10725-007-9232-9
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, et al (2005) Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71:1685–1693. doi: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005

## Referencias

- Conway GR, Barbie EB (1988) After the Green Revolution: Sustainable and equitable agricultural development. *Futures* 20:651–670. doi: 10.1016/0016-3287(88)90006-7
- Cooper JE (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: Disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* 103:1355–1365. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x
- Cooper JE (2004) Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. *Adv Bot Res* 41:1–62. doi: 10.1016/S0065-2296(04)41001-5
- Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1637–1645. doi: 10.1007/s00253-010-2550-2
- Costacurta A, Vanderleyden J (1995) Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. *Crit Rev Microbiol* 21:1–18. doi: 10.3109/10408419509113531
- Coste S, Baraloto C, Leroy C, et al (2010) Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Ann For Sci* 67:607–607. doi: 10.1051/forest/2010020
- Crespo-Rivas JC, Margaret I, Hidalgo Á, et al (2009) *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* Mutants Are Unable to Nodulate Determinate- and Indeterminate Nodule-Forming Legumes and Overproduce an Altered EPS. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:575–588. doi: 10.1094/MPMI-22-5-0575
- Crews TE (1999) The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations
- D'Antuono AL, Ott T, Krusell L, et al (2008) Defects in Rhizobial Cyclic Glucan and Lipopolysaccharide Synthesis Alter Legume Gene Expression During Nodule Development. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:50–60. doi: 10.1094/MPMI-21-1-0050
- D Oldroyd GE (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Da Re S, Ghigo J-M (2006) A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188:3073–87. doi: 10.1128/JB.188.8.3073-3087.2006
- Datta C, Basu PS (2000) Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiol Res* 155:123–127. doi: 10.1016/S0944-5013(00)80047-6
- David M, Daveran ML, Batut J, et al (1988) Cascade Regulation of *nif* Gene-Expression in *Rhizobium-Meliloti*. *Cell* 54:671–683
- Dazzo F, Yanni Y (2006) The Natural *Rhizobium*–Cereal Crop Association as an Example of Plant–Bacteria Interaction. pp 109–127
- Dazzo FB, Hrabak EM (1981) Presence of trifoliin A, a rhizobium-binding lectin, in clover root exudate. *J Supramol Struct Cell Biochem* 16:133–138. doi: 10.1002/jssc.1981.380160204
- Dazzo FB, Orgambide GG, Philip-Hollingsworth S, et al (1996) Modulation of development, growth dynamics, wall crystallinity, and infection sites in white clover root hairs by membrane chitolipooligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *J Bacteriol* 178:3621–3627. doi: 10.1128/jb.178.12.3621-3627.1996
- Dazzo FB, Truchet GL, Sherwood JE, et al (1984) Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 48:1140–50
- De Iannino NI, Couso RO, Dankert MA (1988) Lipid-linked Intermediates and the Synthesis of Acetan in *Acetobacter xylinum*. *Microbiology* 134:1731–1736. doi: 10.1099/00221287-134-6-1731
- de Philip P, Batut J, Boistard P (1990) *Rhizobium meliloti* Fix L is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172:4255–62. doi: 10.1128/jb.172.8.4255-4262.1990
- Devine KM (2018) Activation of the PhoPR-Mediated Response to Phosphate Limitation Is Regulated by Wall Teichoic Acid Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol* 9:2678. doi: 10.3389/fmicb.2018.02678
- Diaz M, Esteban A, Fernández-Abalos JM, Santamaría RI (2005) The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 151:2583–2592. doi: 10.1099/mic.0.27983-0

- Diez-Mendez A, Menéndez E, García-Fraile P, et al (2015) *Rhizobium cellulosilyticum* as a co-inoculant enhances *Phaseolus vulgaris* grain yield under greenhouse conditions. *Symbiosis* 67:135–141. doi: 10.1007/s13199-015-0372-9
- Dimpka C, Weinand T, Asch F (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682–1694. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
- Ding Y, Kalo P, Yendrek C, et al (2008) Abscisic Acid Coordinates Nod Factor and Cytokinin Signaling during the Regulation of Nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 20:2681–2695. doi: 10.1105/tpc.108.061739
- Dobbelaere S, Okon Y (2007) The Plant Growth-Promoting Effect and Plant Responses. In: Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 145–170
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:107–149. doi: 10.1080/713610853
- Downie JA (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34:150–170. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x
- Duan J, Jiang W, Cheng Z, et al (2013) The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLoS One* 8:e58640. doi: 10.1371/journal.pone.0058640
- Duan J, Müller KM, Charles TC, et al (2009) 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Genes in Rhizobia from Southern Saskatchewan. *Microb Ecol* 57:423–436. doi: 10.1007/s00248-008-9407-6
- Egamberdieva D, Berg G, Lindström K, Räsänen LA (2010) Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *Eur J Soil Biol* 46:269–272. doi: 10.1016/J.EJSOBI.2010.01.005
- Egamberdiyeva D (2005) Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *J Plant Nutr Soil Sci* 168:94–99. doi: 10.1002/jpln.200321283
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR (1996) Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium* Nodulation Signals. *Cell* 85:673–681. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81234-9
- Eid J, Fehr A, Gray J, et al (2009) Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* (80- ) 323:133–138. doi: 10.1126/science.1162986
- Eisenhauer HA, Shames S, Pawelek PD, Coulton JW (2005) Siderophore Transport through *Escherichia coli* Outer Membrane Receptor FhuA with Disulfide-tethered Cork and Barrel Domains. *J Biol Chem* 280:30574–30580. doi: 10.1074/jbc.M506708200
- Estes JA, Terborgh J, Brashares JS, et al (2015) Trophic Downgrading of Planet Earth. *Science* (80- ) 333:301–306. doi: 10.1126/science.1205106
- Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J (2001) *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* 67:2790–8. doi: 10.1128/AEM.67.6.2790-2798.2001
- Fernández-Martínez LT, Santos-Beneit F, Martín JF (2012) Is PhoR–PhoP partner fidelity strict? PhoR is required for the activation of the pho regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Genet Genomics* 287:565–573. doi: 10.1007/s00438-012-0698-4
- Finan TM, Weidner S, Wong K, et al (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci* 98:9889–9894. doi: 10.1073/pnas.161294698
- Finnan JM, Burke JI, Jones MB (1997) A Note on a Non-Destructive Method of Chlorophyll Determination in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Irish J. Agric. Food Res.* 36:85–89
- Fischer H-M (1994) Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia Genomic Organization of nif and fix Gene Clusters. 58:352–386
- Fisher R, Egelhoff T, ... JM-G&, 1988 undefined (1988) Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free

## Referencias

- extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev* 2:282–293
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496–512
- Flores-Félix J, Menéndez E, Marcos-García M, et al (2015a) Calcofluor white, an Alternative to Propidium Iodide for Plant Tissues Staining in Studies of Root Colonization by Fluorescent-tagged Rhizobia. *J Adv Biol Biotechnol* 2:65–70. doi: 10.9734/JABB/2015/12444
- Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP, et al (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr Soil Sci* 176:876–882. doi: 10.1002/jpln.201300116
- Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, et al (2015b) Plants Probiotics as a Tool to Produce Highly Functional Fruits: The Case of *Phyllobacterium* and Vitamin C in Strawberries. *PLoS One* 10:e0122281. doi: 10.1371/journal.pone.0122281
- Forman S, Nagiec MJ, Abney J, et al (2019) Analysis of the aerobactin and ferric hydroxamate uptake systems of *Yersinia pestis*. doi: 10.1099/mic.0.2006/004275-0
- Foucher F, Kondorosi E (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol* 43:773–86
- Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321:35–59. doi: 10.1007/s11104-008-9833-8
- Frankenberger WT. J, Arshad M (1995) Phytohormones in soils: microbial production and function. *Phytohormones soils Microb Prod Funct*
- Fraysse N, Couderc F, Poinot V (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem* 270:1365–80
- Fujishige NA, Kapadia NN, De Hoff PL, Hirsch AM (2006a) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56:195–206. doi: 10.1111/j.1574-6941.2005.00044.x
- Fujishige NA, KAPADIA NN, HIRSCH AM (2006b) A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots*. *Bot J Linn Soc* 150:79–88. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00492.x
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:280–300. doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004
- Galibert F, Finan TM, Long SR, et al (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293:668–72. doi: 10.1126/science.1060966
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, et al (2012) *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLoS One* 7:. doi: 10.1371/journal.pone.0038122
- García-Fraile P, Menéndez E, Celador-Lera L, et al (2017) Bacterial Probiotics: A Truly Green Revolution. In: *Probiotics and Plant Health*. Springer Singapore, Singapore, pp 131–162
- García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. 2:183–205. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183
- García-Fraile P, Rivas RL, Willems A, et al (2007) *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. doi: 10.1099/ijs.0.64680-0
- García-Rodríguez FM, Toro N (2000) *Sinorhizobium meliloti* nfe (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol Plant Microbe Interact* 13:583–591. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.6.583
- García de Salamone IE, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47:404–11
- Gay-Fraret J, Ardisson S, Kambara K, et al (2012) Cyclic- $\beta$ -glucans of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. strain NGR234 are required for hypo-osmotic adaptation, motility, and efficient symbiosis with host plants. *FEMS Microbiol Lett* 333:28–36. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02595.x



- Geremia R, Cavaignac S, (1987) A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1----2) glucan. *Am Soc Microbiol* 169:880–884
- Geurts R, Bisseling T (2002) Rhizobium Nod Factor Perception and Signalling. *Plant Cell* 14:s239. doi: 10.1105/TPC.002451
- Ghio S, Lorenzo GS Di, Lia V, et al (2012) Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *Int J Biochem Mol Biol* 3:352–64
- Ghosh S, Penterman JN, Little RD, et al (2003) Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem* 41:277–281. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00019-6
- Ghyselinck J, Pfeiffer S, Heylen K, et al (2013) The Effect of Primer Choice and Short Read Sequences on the Outcome of 16S rRNA Gene Based Diversity Studies. *PLoS One* 8:e71360. doi: 10.1371/journal.pone.0071360
- Gilles-Gonzalez MA, Ditta GS, Helinski DR (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350:170–172. doi: 10.1038/350170a0
- Gladys A, Colette J, Denis F, Rena B (1996) Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 19:271–278. doi: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00219.x
- Glaser P, Kunst F, Arnaud M, et al (1993) *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325 degrees to 333 degrees. *Mol Microbiol* 10:371–84
- Glazebrook J, Walker GC (1989) A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56:661–672. doi: 10.1016/0092-8674(89)90588-6
- Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica (Cairo)* 2012:1–15. doi: 10.6064/2012/963401
- Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* 169:30–39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009
- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *J Theor Biol* 190:63–68. doi: 10.1006/JTBI.1997.0532
- Gómez MI, Barrett CB, Raney T, et al (2013) Post-Green Revolution food systems and the triple burden of malnutrition
- Gong F, Wu X, Zhang H, et al (2015) Making better maize plants for sustainable grain production in a changing climate. *Front Plant Sci* 6:835. doi: 10.3389/fpls.2015.00835
- González V, Santamaría RI, Bustos P, et al (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons
- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, et al (2015) Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* 5:355–377. doi: 10.1007/s13205-014-0241-x
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review-promoting rhizobacteria (PGPR); indole acetic acid (IAA); phos-phate solubilization; siderophore production; antibiotic production; induced systematic resistance (ISR); ACC deam. *Cogent Food Agric* 19:1127500. doi: 10.1080/23311932.2015.1127500
- Govindasamy V, Senthilkumar M, Gaikwad K, Annapurna K (2008) Isolation and Characterization of ACC Deaminase Gene from Two Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Curr Microbiol* 57:312–317. doi: 10.1007/s00284-008-9195-8
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395–412. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.08.030
- Gray JX, Djordjevic MA, Rolfe BG (1990) Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *J Bacteriol* 172:193–203
- Gulash M, Ames P, Larosiliere RC, Bergman K (1984) Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl*

## Referencias

- Environ Microbiol 48:149–52
- Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A n, et al (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 111:206–211. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x
- Gutiérrez-Zamora M., Martínez-Romero E (2001) Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* 91:117–126. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00332-7
- Haag AF, Balaban M, Sani M, et al (2011) Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. *PLoS Biol* 9:e1001169. doi: 10.1371/journal.pbio.1001169
- Hafeez FY, Hassan Z, Naeem F, et al (2008) *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Strain LC-31: Analysis of Novel Bacteriocin and ACC Deaminase Gene(s). In: *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 247–248
- Hahm M-S, Sumayo M, Hwang Y-J, et al (2012) Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions. *J Microbiol* 50:380–385. doi: 10.1007/s12275-012-1477-y
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98
- Han SH, Lee SJ, Moon JH, et al (2006) GacS-Dependent Production of 2R, 3R-Butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Is a Major Determinant for Eliciting Systemic Resistance Against *Erwinia carotovora* but not Against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:924–930. doi: 10.1094/MPMI-19-0924
- Han TX, Wang ET, Wu LJ, et al (2008) *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1693–1699. doi: 10.1099/ijs.0.65568-0
- Hannauer M, Barda Y, Mislin GLA, et al (2010) The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol* 192:1212–20. doi: 10.1128/JB.01539-09
- Hayat R, Ali S, Amara U, et al (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579–598. doi: 10.1007/s13213-010-0117-1
- Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5:523–530. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01790-8
- Hershey DM, Lu X, Zi J, Peters RJ (2014) Functional conservation of the capacity for ent-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. *J Bacteriol* 196:100–6. doi: 10.1128/JB.01031-13
- Heydarian Z, Gruber M, Glick BR, Hegedus DD (2018) Gene Expression Patterns in Roots of *Camelina sativa* With Enhanced Salinity Tolerance Arising From Inoculation of Soil With Plant Growth Promoting Bacteria Producing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase or Expression the Corresponding *acdS* Gene. *Front Microbiol* 9:1297. doi: 10.3389/fmicb.2018.01297
- Hirsch S, Kim J, Munoz A, et al (2009) GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *PLANT CELL ONLINE* 21:545–557. doi: 10.1105/tpc.108.064501
- Hossam Abdelhamed, Jingjun Lu MLL and MLL (2016) Ferric hydroxamate uptake system contributes to *Edwardsiella ictaluri* virulence. *Microb Pathog* 195–200
- Hove-Jensen B, Zechel DL, Jochimsen B (2014) Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. doi: 10.1128/MMBR.00040-13
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425. doi: 10.1007/s11104-009-0262-0
- Hunter WJ, Kuykendall LD, Manter DK (2007) *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: A Selenite-Reducing  $\alpha$ -Proteobacteria Isolated From a Bioreactor. *Curr Microbiol* 55:455–460. doi: 10.1007/s00284-007-9020-9
- Ibáñez F, Fabra A (2011) Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic

- programme of the Aeschynomeneae legume Arachis. Plant Biol 13:794–800. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00439.x
- Islam N, Rao C, Rural IK-B in action., 2002 undefined (2002) Facilitating a N<sub>2</sub>-fixing symbiosis between diazotrophs and wheat. In: Kennedy IR, Choudhury ATMA (eds) Biofertilisers in action. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, pp 84–93
- Iyer B, Rajput MS, Jog R, et al (2016) Organic acid mediated repression of sugar utilization in rhizobia. Microbiol Res 192:211–220. doi: 10.1016/J.MICRES.2016.07.006
- Jackson CA, Couger MB, Prabhakaran M, et al (2017) Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. strain YS-1r that degrades lignin in plant biomass. J Appl Microbiol 122:940–952. doi: 10.1111/jam.13401
- James EK, Reis VM, Olivares FL, et al (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium. J Exp Bot 45:757–766. doi: 10.1093/jxb/45.6.757
- Jameson PE (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. Plant Growth Regul 32:369–380. doi: 10.1023/A:1010733617543
- Jha C, And MS-J of AR, 2015 U (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. pdfs.semanticscholar.org
- Jiao Nimaichand Salam Lan Liu Manik Prabhu J et al (2018) Genome sequence and comparative analysis of *Jiangella alba* YIM 61503 T isolated from a medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis*. Antonie Van Leeuwenhoek 111:667–678. doi: 10.1007/s10482-017-1010-8
- Jiménez-Gómez A, David Flores-Félix J, García-Fraile P, et al (2018) Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. Sci RePoRTS | 8:295. doi: 10.1038/s41598-017-18632-z
- John PCL, Qi R (2008) Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. Trends Plant Sci 13:121–127. doi: 10.1016/j.tplants.2008.01.004
- Jonas R, Farah LF (1998) Production and application of microbial cellulose. Polym Degrad Stab 59:101–106. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00197-3
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, et al (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. Nat Rev Microbiol 5:619–633. doi: 10.1038/nrmicro1705
- Jones TJ (2009) Maize Tissue Culture and Transformation: The First 20 Years. In: Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 7–27
- Jung I, Park D-H, Park K (2002) A Study of the Growth Condition and Solubilization of Phosphate from Hydroxyapatite by *Pantoea agglomerans*
- Kamat SS, Raushel FM (2013) The enzymatic conversion of phosphonates to phosphate by bacteria. Curr Opin Chem Biol 17:589–596. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.006
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. J Mol Biol 428:726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al (2000) Complete Genome Structure of the Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res 7:331–338. doi: 10.1093/dnares/7.6.331
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al (2002) Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res 9:189–197. doi: 10.1093/dnares/9.6.189
- Kaur G, Reddy MS (2013) Phosphate solubilizing rhizobacteria from an organic farm and their influence on the growth and yield of maize (*Zea mays* L.). J Gen Appl Microbiol 59:295–303
- Kaur J, Verma M, Lal R (2011) *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 61:1218–1225. doi: 10.1099/ijs.0.017491-0
- Kawaharada Y, Eda S, Minamisawa K, Mitsui H (2007) A *Mesorhizobium loti* mutant with reduced glucan content shows defective invasion of its host plant *Lotus japonicus*. Microbiology 153:3983–3993. doi: 10.1099/mic.0.2007/008631-0

## Referencias

- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Boil Biochem* 3. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.006
- Kereszt A, Slaska-Kiss K, Putnoky P, et al (1995) The *cycHJKL* genes of *Rhizobium meliloti* involved in cytochrome *c* biogenesis are required for &quot;respiratory&quot; nitrate reduction *ex planta* and for nitrogen fixation during symbiosis. *Mol Gen Genet* 247:39–47
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96:473–80
- Khan MS, Ahmad E, Zaidi A, Oves M (2013a) Functional Aspect of Phosphate-Solubilizing Bacteria: Importance in Crop Production. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 237–263
- Khan R, Bhawana P, Fulekar MH (2013b) Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12:75–97. doi: 10.1007/s11157-012-9287-6
- Khush GS (2001) Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* 2:815–822. doi: 10.1038/35093585
- Kimura S, Chen HP, Saxena IM, et al (2001) Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 183:5668–74. doi: 10.1128/JB.183.19.5668-5674.2001
- Kneen BE, Larue TA (1983) Congo Red Absorption by *Rhizobium leguminosarum*
- Kneip C, Lockhart P, Voß C, Maier U-G (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evol Biol* 7:55. doi: 10.1186/1471-2148-7-55
- Kononova S V, Nesmeyanova MA (2002) Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Mosc)* 67:184–95
- Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, et al (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16:800–2
- Kumar Ghosh P, Saha P, Mayilraj S, Maiti TK (2013) Role of IAA metabolizing enzymes on production of IAA in root, nodule of *Cajanus cajan* and its PGP *Rhizobium* sp. doi: 10.1016/j.bcab.2013.04.002
- Kumar Jha C, Saraf M (2015) Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 J Agric Res Dev* 5:108–0119
- Laguerre le, Nour SM, Macheret R, et al (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts
- Lambrecht JA, Downs DM (2013) Anthranilate phosphoribosyl transferase (TrpD) generates phosphoribosylamine for thiamine synthesis from enamines and phosphoribosyl pyrophosphate. *ACS Chem Biol* 8:242–8. doi: 10.1021/cb300364k
- Latati M, Bargaz A, Belarbi B, et al (2016) The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *Eur J Agron* 72:80–90. doi: 10.1016/J.EJA.2015.09.015
- Lau CKY, Krewulak KD, Vogel HJ (2016) Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev* 40:273–298. doi: 10.1093/femsre/fuv049
- Leang C, Krushkal J, Ueki T, et al (2009) Genome-wide analysis of the RpoN regulon in *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Genomics* 10:331. doi: 10.1186/1471-2164-10-331
- Lee B, Farag MA, Park HB, et al (2012) Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One* 7:e48744. doi: 10.1371/journal.pone.0048744
- Leveau JHJ, Lindow SE (2005) Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl Environ Microbiol* 71:2365–71. doi: 10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005
- Li L-L, Taghavi S, McCorkle SM, et al (2011) Bioprospecting metagenomics of decaying wood: mining for new glycoside hydrolases. *Biotechnol Biofuels* 4:23. doi: 10.1186/1754-6834-4-23

- Li M, Guo R, Yu F, et al (2018) Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis Pathways in the Plant-Beneficial Bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *Int J Mol Sci* 19:443. doi: 10.3390/ijms19020443
- Li S, Assmann SM, Albert R (2006) Predicting Essential Components of Signal Transduction Networks: A Dynamic Model of Guard Cell Abscisic Acid Signaling. *PLoS Biol* 4:e312. doi: 10.1371/journal.pbio.0040312
- Lilly D, Stillwell R (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* (80- ) 147 (3659):
- Lin L, Xu X (2013) Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic *Streptomyces* sp. En-1 Isolated from Medicinal Plants. *Curr Microbiol* 67:209–217. doi: 10.1007/s00284-013-0348-z
- Liu F, Xing S, Ma H, et al (2013) Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9155–9164. doi: 10.1007/s00253-013-5193-2
- Lohar D, Stiller J, Kam J, et al (2009) Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann Bot* 104:277–285. doi: 10.1093/aob/mcp132
- Loman NJ, Pallen MJ (2015) Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat Rev Microbiol* 13:787–794. doi: 10.1038/nrmicro3565
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, et al (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490-5. doi: 10.1093/nar/gkt1178
- López-López A, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, et al (2010) *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 33:322–327. doi: 10.1016/J.SYAPM.2010.07.005
- López D, Vlamakis H, Kolter R (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000398. doi: 10.1101/cshperspect.a000398
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg G V. (2002) Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:373–383. doi: 10.1023/A:1020596903142
- Lupwayi NZ, Clayton GW, Hanson KG, et al (2004) Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. *Can J Plant Sci* 84:37–45. doi: 10.4141/P03-087
- Lynd L, Zyl W, McBride J, Laser M (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol* 16:577–583. doi: 10.1016/j.copbio.2005.08.009
- Machuca A, Pereira G, Aguiar A, Milagres AMF (2007) Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. *Lett Appl Microbiol* 44:7–12. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02046.x
- MacLean AM, Finan TM, Sadowsky MJ (2007) Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol* 144:615–22. doi: 10.1104/pp.107.101634
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa T (2006) Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224:268–278. doi: 10.1007/s00425-005-0211-y
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, et al (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1:10. doi: 10.1038/ncomms1009
- Maekawa-Yoshikawa M, Murooka Y (2009) Root hair deformation of symbiosis-deficient mutants of *Lotus japonicus* by application of Nod factor from *Mesorhizobium loti*. *Microbes Environ* 24:128–34
- Maheshwari DK, Dheeman S, Agarwal M (2015) *Phytohormone-Producing PGPR for Sustainable Agriculture*. Springer, Cham, pp 159–182
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* 45:D200–D203. doi: 10.1093/nar/gkw1129
- Marczak M, Mazur A, Koper P, et al (2017) Synthesis of Rhizobial Exopolysaccharides and Their Importance for Symbiosis with Legume Plants. *Genes (Basel)* 8:. doi: 10.3390/genes8120360

## Referencias

- Martínez-Romero E (2003) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives
- Masaoka S, Ohe T, Sakota N (1993) Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. J Ferment Bioeng 75:18–22. doi: 10.1016/0922-338X(93)90171-4
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol 17:458–466. doi: 10.1016/J.TIM.2009.07.004
- Mateos PF, Baker DL, Petersen M, et al (2001) Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Can J Microbiol 47:475–87
- Mateos PF, Baker DL, Philip-Hollingsworth S, et al (1995) Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. Can J Microbiol 41:202–207. doi: 10.1139/m95-028
- Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, et al (1992) Cell-Associated Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifolii*. Appl Environ Microbiol 1816–1822
- Mateos PF, Rivas R, Robledo M, et al (2011) The Path of Rhizobia : From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation. 167–194
- Matthews JF, Skopec CE, Mason PE, et al (2006) Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. Carbohydr Res 341:138–152. doi: 10.1016/j.carres.2005.09.028
- Matthysse AG, Thomas DL, White AR (1995) Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 177:1076–81. doi: 10.1128/jb.177.4.1076-1081.1995
- Mayer R, Ross P, Weinhouse H, et al (1991) Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. Proc Natl Acad Sci 88:5472–5476. doi: 10.1073/pnas.88.12.5472
- Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, et al (1982a) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol 149:114–22
- Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, et al (1982b) Physical and Genetic Characterization of Symbiotic and Auxotrophic Mutants of *Rhizobium meliloti* Induced by Transposon TnS Mutagenesis
- Mehnaz S, Lazarovits G (2006) Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. Microb Ecol 51:326–335. doi: 10.1007/s00248-006-9039-7
- Méndez C, Baginsky C, Hedden P, et al (2014) Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. Phytochemistry 98:101–109. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.11.013
- Merino E, Jensen RA, Yanofsky C (2008) Evolution of bacterial trp operons and their regulation. Curr Opin Microbiol 11:78–86. doi: 10.1016/J.MIB.2008.02.005
- Mhuantong W, Charoensawan V, Kanokratana P, et al (2011) Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities. doi: 10.1186/s13068-015-0200-8
- Micaela Marcela; Membrillo Hernández J (2004) TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas. División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
- Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N, et al (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. FEMS Microbiol Ecol 26:193–205. doi: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00505.x
- Miethke M, Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev 71:413–51. doi: 10.1128/MMBR.00012-07
- Miller DD, Klooster HBL, Emons AMC (2000) Lipochito-Oligosaccharide Nodulation Factors Stimulate Cytoplasmic Polarity with Longitudinal Endoplasmic Reticulum and Vesicles at the Tip in Vetch Root Hairs. Mol Plant-Microbe Interact 13:1385–1390. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1385
- Miller SH, Browne P, Prigent-Combaret C, et al (2009) Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. Environ Microbiol Rep 2:403–411. doi: 10.1111/j.1758-

2229.2009.00105.x

- Miller SH, Elliot RM, Sullivan JT, Ronson CW (2007) Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Microbiology* 153:3184–3195. doi: 10.1099/mic.0.2007/006924-0
- Miller SH, Mark GL, Franks A, O’Gara F (2008) *Pseudomonas*–Plant Interactions. In: *Pseudomonas*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 353–376
- Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, et al (2009) Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol* 25:753–761. doi: 10.1007/s11274-009-9963-z
- Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, et al (2006) *Rhizobium*-Mediated Induction of Phenolics and Plant Growth Promotion in Rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol* 52:383–389. doi: 10.1007/s00284-005-0296-3
- Moniri M, Boroumand Moghaddam A, Azizi S, et al (2017) Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering. *Nanomaterials* 7:257. doi: 10.3390/nano7090257
- Monteiro C, Saxena I, Wang X, et al (2009) Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences. *Environ Microbiol* 11:1105–1116. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01840.x
- Mrudula S, Murugammal R (2011) Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Braz J Microbiol* 42:1119–27. doi: 10.1590/S1517-838220110003000033
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56:165–185. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046
- Nehra V, Choudhary M (2015) A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. *J Appl Nat Sci* 7:540–556. doi: 10.31018/jans.v7i1.642
- Nett RS, Montanares M, Marcassa A, et al (2017) Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nat Chem Biol* 13:69–74. doi: 10.1038/nchembio.2232
- Netto AT, Campostrini E, Oliveira JG de, Bressan-Smith RE (2005) Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Sci Hortic (Amsterdam)* 104:199–209. doi: 10.1016/J.SCIENTA.2004.08.013
- O’gara F, Shanmugam KT (1976) Control of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobia*. Regulation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation. *Biochim Biophys Acta* 451:342–52
- O’hara GW, Goss TJ, Dilworth MJ, Glenn AR (1989) Maintenance of Intracellular pH and Acid Tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 55:1870–1876
- Oberhansli T, Defago G, Haas D (1991) Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J Gen Microbiol* 137:2273–2279. doi: 10.1099/00221287-137-10-2273
- Okazaki S, Sugawara M, Minamisawa K (2004) Bradyrhizobium elkanii rxC gene is required for expression of symbiotic phenotypes in the final step of rhizobitoxine biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70:535–41. doi: 10.1128/aem.70.1.535-541.2004
- Oldroyd GED, Downie JA (2008) Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, et al (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front Microbiol* 6:745. doi: 10.3389/fmicb.2015.00745
- Ouyang Z, Isaacson R (2006) Identification and Characterization of a Novel ABC Iron Transport System, fit, in *Escherichia coli* †. *Infect Immun* 74:6949–6956. doi: 10.1128/IAI.00866-06
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, et al (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. doi: 10.1093/nar/gkt1226
- Pal KK, Tilak K V, Saxena AK, et al (2001) Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*,

## Referencias

- Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 156:209–23
- Pandey P, Maheshwari DK (2007) Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Can J Microbiol* 53:213–222. doi: 10.1139/w06-118
- Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, et al (2006) *Sinorhizobium fredii* HH103 Mutants Affected in Capsular Polysaccharide (KPS) are Impaired for Nodulation with Soybean and *Cajanus cajan*. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:43–52. doi: 10.1094/MPMI-19-0043
- Parsons C V., Harris DMM, Patten CL (2015) Regulation of indole-3-acetic acid biosynthesis by branched-chain amino acids in *Enterobacter cloacae* UW5. *FEMS Microbiol Lett* 362:fnv153. doi: 10.1093/femsle/fnv153
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207–220. doi: 10.1139/m96-032
- Pawelek PD, Croteau N, Ng-Thow-Hing C, et al (2006) Structure of TonB in Complex with FhuA, E. coli Outer Membrane Receptor. *Science* (80- ) 312:1399–1402. doi: 10.1126/science.1128057
- Pearson WR (2014) BLAST and FASTA Similarity Searching for Multiple Sequence Alignment. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 75–101
- Peix A, Rivas-Boyer AA, Mateos PF, et al (2001) Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol Biochem* 33:103–110. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00120-6
- Peña-Cortés H, Sánchez-Serrano JJ, Mertens R, et al (1989) Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9851–5
- Peng S, Biswas JC, Ladha JK, et al (2002) Influence of Rhizobial Inoculation on Photosynthesis and Grain Yield of Rice. *Agron J* 94:925. doi: 10.2134/agronj2002.9250
- Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, et al (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169:325–336. doi: 10.1016/J.MICRES.2013.09.011
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C (2003) Tales from the underground: molecular . plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell Environ* 26:189–199. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x
- Piccoli P, Lucangeli CD, Schneider G, et al (1997) Hydrolysis of [17,17-2H<sub>2</sub>]gibberellin A<sub>20</sub>-glucoside and [17,17-2H<sub>2</sub>]gibberellin A<sub>20</sub>-glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-Based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul* 23:179–182. doi: 10.1023/A:1005925925127
- Pii Y, Crimi M, Cremonese G, et al (2007) BMC Plant Biology Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. doi: 10.1186/1471-2229-7-21
- Ping L, Boland W (2004) Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 9:263–266. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2004.04.008
- Pingali PL (2012) Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12302–8. doi: 10.1073/pnas.0912953109
- Poinsot V, Couderc F (2017) Formation of Lipochitin Oligosaccharide Signaling Molecules. *Biog Fat Acids, Lipids Membr* 1–23. doi: 10.1007/978-3-319-43676-0\_64-1
- Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK (2004) Microbial Populations and Activities in the Rhizoplane of Rock-Weathering Desert Plants. I. Root Colonization and Weathering of Igneous Rocks. *Plant Biol* 6:629–642. doi: 10.1055/s-2004-821100
- Quinn JP, Kulakova AN, Cooley NA, McGrath JW (2007) New ways to break an old bond: the bacterial carbon?phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling. *Environ Microbiol* 9:2392–2400. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01397.x
- Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, et al (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R.*



- leguminosarum DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2484–2490. doi: 10.1099/ijs.0.65621-0
- Rashid M, Khalil S, Ayub N, et al (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci* 7(2):187–196
- Redondo-Nieto M, Barret M, Morrissey JP, et al (2012) Genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* 194:1273–4. doi: 10.1128/JB.06601-11
- Reeve W, O'Hara G, Chain P, et al (2010) Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. *Stand Genomic Sci* 2:66–76. doi: 10.4056/sigs.44642
- Ren DW, Chen WF, Sui XH, et al (2011) *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:580–586. doi: 10.1099/ijs.0.023143-0
- Renshaw JC, Robson GD, Trinci APJ, et al (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol Res* 106:1123–1142. doi: 10.1017/S0953756202006548
- Rice CD, Pollard JE, Lewis ZT, McCleary WR (2009) Employment of a Promoter-Swapping Technique Shows that PhoU Modulates the Activity of the PstSCAB2 ABC Transporter in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 75:573–582. doi: 10.1128/AEM.01046-08
- Rincon-Rosales R, Villalobos-Escobedo JM, Rogel MA, et al (2013) *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3423–3429. doi: 10.1099/ijs.0.048249-0
- Rivas R, Peix A, Mateos PF, et al (2006) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. 287:23–33. doi: 10.1007/s11104-006-9062-y
- Rivas R, Velázquez E, Palomo J-L, et al (2002) Rapid Identification of *Clavibacter michiganensis* Subspecies *sepedonicus* Using Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA (TP-RAPD) Fingerprints. *Eur J Plant Pathol* 108:179–184. doi: 10.1023/A:1015044911913
- Rö Mling U, Galperin MY (2015) Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. doi: 10.1016/j.tim.2015.05.005
- Robledo, Marta; García-Triguero. Carmen;P.Rivera, Lina; Manyani, Hamid; F.Mateos, Pedro y Megías M (2011) El viaje de *Rhizobium* hacia una simbiosis eficiente. In: *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp 141–170
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, et al (2011) Development of Functional Symbiotic White Clover Root Hairs and Nodules Requires Tightly Regulated Production of Rhizobial Cellulase CelC2. *Mol Plant-Microbe Interact* MPMI 24:798–807. doi: 10.1094/MPMI
- Robledo M, Jimenez-Zurdo JI, Velazquez E, et al (2008) *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci* 105:7064–7069. doi: 10.1073/pnas.0802547105
- Robledo M, Rivera L, Jiménez-Zurdo JI, et al (2012) Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces
- Robledo M, Velázquez E, Ramírez-Bahena MH, et al (2011b) The *celC* gene, a new phylogenetic marker useful for taxonomic studies in *Rhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 34:393–399. doi: 10.1016/J.SYAPM.2011.01.010
- Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruíz-Sá-nz JE (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272:127–136. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x
- Rodríguez-Santiago B, Armengol L (2012) Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenat* 23:56–66. doi: 10.1016/j.diapre.2012.02.001
- Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15–21. doi: 10.1007/s11104-006-9056-9
- Rolfe BG, Gresshoff PM, Shine J, et al (1980) Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Sci Lett* 19:277–284. doi: 10.1016/0304-4211(80)90082-6

## Referencias

- Rome S, Fernandez MP, Brunel B, et al (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from Annual Medicago spp. *Int J Syst Bacteriol* 46:972–980. doi: 10.1099/00207713-46-4-972
- Römmling U (2002) Molecular biology of cellulose production in bacteria
- Römmling U, Galperin MY (2015) Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* 23:545–57. doi: 10.1016/j.tim.2015.05.005
- Rosegrant MW, Ringler C, Sulser TB, et al (2009) Agriculture and Food Security under Global Change: Prospects for 2025/2050
- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325:279–281. doi: 10.1038/325279a0
- Roth E, Jeon K, Stacey G (1988) Homology in endosymbiotic systems: the term 'symbiosome'. *Mol Genet Plant Microbre Interact Minnesota American Phytopathol Soc Press*
- Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, et al (2003) Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* 100:4927–4932. doi: 10.1073/pnas.0730845100
- Saghir Khan M, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agron Sustain Dev* 27:29–43. doi: 10.1051/agro:2006011
- Saharan B, Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci Med Res* 2011:
- Sajeed Ali S, Vidhale N (2013) Review Article Bacterial Siderophore and their Application: A review
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497–502. doi: 10.1038/415497a
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol cloning a Lab manual*
- Sanginga N, Dashiell K., Diels J, et al (2003) Sustainable resource management coupled to resilient germplasm to provide new intensive cereal–grain–legume–livestock systems in the dry savanna. *Agric Ecosyst Environ* 100:305–314. doi: 10.1016/S0167-8809(03)00188-9
- Sant'Anna FH, Almeida LG, Cecagno R, et al (2011) Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics* 12:409. doi: 10.1186/1471-2164-12-409
- Santi C, Bogusz D, Franche C (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot* 111:743–767. doi: 10.1093/aob/mct048
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5:301–307. doi: 10.1038/nchembio.165
- Santos-Beneit F (2015) The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6:402. doi: 10.3389/fmicb.2015.00402
- Saqan Naqvi SM, Rasheed MH, Jilani G, Saleem Akhtar M (2009) Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production Germin like proteins View project exploration of in planta Agrobacterium mediated transformation in lentil (*Lens culinaris Medik*) View project
- Sashidhar B, Podile AR (2010) Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J Appl Microbiol* 109:1–12. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x
- Sathya A, Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S (2017) Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech* 7:102. doi: 10.1007/s13205-017-0736-3
- Sayyed R, Naphade B, Chincholkar S (2004) Ecologically competent rhizobacteria for plant growth promotion and disease management
- Sayyed RZ, Chincholkar SB, Reddy MS, et al (2013) Siderophore Producing PGPR for Crop Nutrition and Phytopathogen Suppression. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 449–471

- Schalk IJ, Guillon L (2013) Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. doi: 10.1007/s00726-013-1468-2
- Schalk IJ, Hannauer M, Braud A (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* 13:2844–2854. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x
- Schell MA (1993) Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators. *Annu Rev Microbiol* 47:597–626. doi: 10.1146/annurev.mi.47.100193.003121
- Schenk PM, Carvalhais LC, Kazan K (2012) Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends Biotechnol* 30:177–184. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.11.002
- Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM (1987) Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. *Annu Rev Phytopathol* 25:339–358. doi: 10.1146/annurev.py.25.090187.002011
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56
- Serra DO, Richter AM, Hengge R (2013) Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol* 195:5540–54. doi: 10.1128/JB.00946-13
- Shaw SL, Dumais J, Long SR (2000) Cell Surface Expansion in Polarly Growing Root Hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 124:959–970. doi: 10.1104/pp.124.3.959
- Shen X, Hu H, Peng H, et al (2013) Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics* 14:271. doi: 10.1186/1471-2164-14-271
- Shenoy VV, Kalagudi GM (2005) Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnol Adv* 23:501–513. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2005.01.004
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217–223. doi: 10.1016/S1369-5266(00)80068-0
- Sieberer B, Emons AMC (2000) Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* 214:118–127. doi: 10.1007/BF02524268
- Simon LD, Randolph B, Irwint N, Binkowski G (1983) Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli* (protein degradation/interferon). *Microbiology* 80:2059–2062
- Singh AK (2018) Potential and Prospect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Lentil
- Skorov G (1973) The green revolution and social progress. *World Dev* 1:13–21. doi: 10.1016/0305-750X(73)90252-0
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, et al (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact* 5:7. doi: 10.1186/1475-2859-5-7
- Smit G, Kijne JW, Lugtenberg BJ (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* 169:4294–4301. doi: 10.1128/jb.169.9.4294-4301.1987
- Smit G, Swart S, Lugtenberg BJ, Kijne JW (1992) Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* 6:2897–903
- Smit P, Raedts J, Portyanko V, et al (2005) NSP1 of the GRAS Protein Family Is Essential for Rhizobial Nod Factor-Induced Transcription. *Science* (80- ) 308:1789–1791. doi: 10.1126/science.1111025
- Solano C, García B, Valle J, et al (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43:793–808. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x
- Solovyev V V, Salamov A, Bachinsky A (2011) Automatic Annotation of Bacterial Community Sequences and Application to Infections Diagnostic. Prediction of Prokaryotic and Eukaryotic Promoters Using Convolutional Deep Learning Neural Networks View project Identification and characterization of different classes of HIV-1 RT

## Referencias

- non-nucleoside inhibitors of natural origin View project
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205–240. doi: 10.1080/10408410490468786
- Spaepen S, Vanderleyden J (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a001438. doi: 10.1101/cshperspect.a001438
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Spaenk HP (2002) A receptor in symbiotic dialogue. *Nature* 417:910–911. doi: 10.1038/417910a
- Spira B, Meire Aguenta •, Velasco J, et al (2010) Alternative promoters in the pst operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* 284:489–498. doi: 10.1007/s00438-010-0584-x
- Sprent JI (2001) Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens
- Sprent JI (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* 174:11–25. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x
- Staehelein C, Forsberg LS, Gao M-Y, et al (2006) Exo-Oligosaccharides of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Are Required for Symbiosis with Various Legumes. *J Bacteriol* 188:6168–6178. doi: 10.1128/JB.00365-06
- Stajković O, Delić D, Jošić D, et al (2011) Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria
- Stevens JB, Carter RA, Hussain H, et al (1999) The fhu genes of *Rhizobium leguminosarum*, specifying siderophore uptake proteins: fhuDCB are adjacent to a pseudogene version of fhuA. *Microbiology* 145:593–601. doi: 10.1099/13500872-145-3-593
- Šturcová A, His I, Apperley DC, et al (2004) Structural Details of Crystalline Cellulose from Higher Plants. *Biomacromolecules* 5:1333–1339. doi: 10.1021/bm034517p
- Sturz A., Nowak J (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl Soil Ecol* 15:183–190. doi: 10.1016/S0929-1393(00)00094-9
- Subramanian P, Kim K, Krishnamoorthy R, et al (2015) Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regul* 76:327–332. doi: 10.1007/s10725-014-9993-x
- Syu M-J (2001) Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:10–18. doi: 10.1007/s002530000486
- Szczygłowski K, Amyot L, Gorzelak M, et al (2003) Symbiosis, Inventiveness by Recruitment? *PLANT Physiol* 131:935–940. doi: 10.1104/pp.017186
- Tahir HAS, Gu Q, Wu H, et al (2017a) Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front Microbiol* 8:171. doi: 10.3389/fmicb.2017.00171
- Tahir HAS, Gu Q, Wu H, et al (2017b) *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Sci Rep* 7:40481. doi: 10.1038/srep40481
- Tal R, Wong HC, Calhoon R, et al (1998) Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 180:4416–25
- TAO G-C, TIAN S-J, CAI M-Y, XIE G-H (2008) Phosphate-Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. *Pedosphere* 18:515–523. doi: 10.1016/S1002-0160(08)60042-9
- Thakker JN, Patel S, Dhandhukia PC (2013) Induction of Defense-Related Enzymes in Banana Plants: Effect of Live and Dead Pathogenic Strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *ISRN Biotechnol* 2013:1–6. doi: 10.5402/2013/601303
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, et al (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671–677. doi: 10.1038/nature01014

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115–e115. doi: 10.1093/nar/gks596
- Van Rhijn P, Vanderleyden J (1995) *The Rhizobium-Plant Symbiosis*
- Van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AA, Kijne JW (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* 64:88–94
- Vance CP (1983) Rhizobium Infection and Nodulation: A Beneficial Plant Disease? *Annu Rev Microbiol* 37:399–424. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.002151
- Vandamme P, Goris J, Chen W-M, et al (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Syst Appl Microbiol* 25:507–512. doi: 10.1078/07232020260517634
- Vandeir FG, Marcelo A, Jeferson K (2017) Agronomic efficiency of inoculant based on *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen fertilization at maize. *African J Agric Res* 12:1940–1948. doi: 10.5897/AJAR2016.11978
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, et al (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 21:573. doi: 10.3390/molecules21050573
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91:127–41
- Verma VC, Singh SK, Prakash S (2011) Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *J Basic Microbiol* 51:550–556. doi: 10.1002/jobm.201000155
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586. doi: 10.1023/A:1026037216893
- Vincent JM (1970) The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In: *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. pp 1–13
- Viruel E, Erazzú LE, Martínez Calsina L, et al (2014) Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *J soil Sci plant Nutr* 0–0. doi: 10.4067/S0718-95162014005000065
- Wada H, Satoh N, Williams M, et al (1994) Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1801–4. doi: 10.1073/pnas.91.5.1801
- Wall LG (2000) The Actinorhizal Symbiosis. *J Plant Growth Regul* 19:167–182. doi: 10.1007/s003440000027
- Wang D, Griffiths J, Starker C, et al (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* 327:1126–9. doi: 10.1126/science.1184096
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H (2012) Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* 14:334–342. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x
- Wanner BL, Chang BD (1987) The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 169:5569–74
- Weinhouse H, Sapir S, Amikam D, et al (1997) c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett* 416:207–11
- Wen Y, Zhang J, Yan Q, et al (2011) *Rhizobium phenanthrenilyticum* sp. nov., a novel phenanthrene-degrading bacterium isolated from a petroleum residue treatment system. *J Gen Appl Microbiol* 57:319–29
- Whitmee S, Haines A, Beyrer C, et al (2015) Safeguarding human health in the Anthropocene epoch: report of The Rockefeller Foundation–Lancet Commission on planetary health. *Lancet* 386:1973–2028. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60901-1
- Willett W, Rockström J, Loken B, et al (2019) Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet (London, England)* 393:447–492. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4
- Winkelman G (2017) *Handbook of Microbial Iron Chelates*
- Winkelman G (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals* 20:379–392. doi: 10.1007/s10534-006-9076-1

## Referencias

- Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, et al (2011) *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. doi: 10.1371/journal.pgen.1002430
- Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E, et al (2012) Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and Comparative Analyses of *Azospirillum* Core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. *Genes (Basel)* 3:576–602. doi: 10.3390/genes3040576
- Wong HC, Fear AL, Calhoon RD, et al (1990) Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci* 87:8130–8134. doi: 10.1073/pnas.87.20.8130
- Wong WS, Tan SN, Ge L, et al (2015) The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. Springer, Cham, pp 105–158
- Wright GSA, Saeki A, Hikima T, et al (2018) Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system. doi: 10.1126/scisignal.aag0825
- Yamada Y, Yukphan P, (2012) Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *J Gen Appl Microbiol* 58:397–404
- Yang S, Zhang Q, Guo J, et al (2007) Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Appl Environ Microbiol* 73:1079–88. doi: 10.1128/AEM.01770-06
- Yanni YG, Rizk RY, Corich V, et al (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. Kluwer Academic Publishers
- Yanni YG, Rizk RY, El-Fattah FKA, et al (2001) The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Funct Plant Biol* 28:845. doi: 10.1071/PP01069
- Yi H-S, Ahn Y-R, Song GC, et al (2016) Impact of a Bacterial Volatile 2,3-Butanediol on *Bacillus subtilis* Rhizosphere Robustness. *Front Microbiol* 7:993. doi: 10.3389/fmicb.2016.00993
- Yin Y, Mao X, Yang J, et al (2012) dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. doi: 10.1093/nar/gks479
- Young JM (1999) Correction to the authority of *Rhizobium leguminosarum*. *Int J Syst Bacteriol* 49:1943–1943. doi: 10.1099/00207713-49-4-1943
- Young JM, Kuykendall LD, Martínez-Romero E, et al (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:89–103. doi: 10.1099/00207713-51-1-89
- Young JPW, Crossman LC, Johnston AW, et al (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* 7:R34. doi: 10.1186/gb-2006-7-4-r34
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G (2011a) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol* 47:138–145. doi: 10.1016/J.EJSOBI.2010.11.001
- Yu X, Liu X, Zhu TH, et al (2011b) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol Fertil Soils* 47:437–446. doi: 10.1007/s00374-011-0548-2
- Yuan Z-C, Zaheer R, Finan TM (2006) Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 188:1089–102. doi: 10.1128/JB.188.3.1089-1102.2006
- Zabihi HR, Savaghebi GR, Khavazi K, et al (2011) *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta Physiol Plant* 33:145–152. doi: 10.1007/s11738-010-0531-9
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:439–473. doi: 10.1146/annurev.pp.39.060188.002255
- Zeng R-Y, Liu Y, Wang R-P, et al (2015) *Rhizobium marinum* sp. nov., a malachite-green-tolerant bacterium isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4449–4454. doi: 10.1099/ijsem.0.000593
- Zerbino DR, Birney E (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*

- 18:821–9. doi: 10.1101/gr.074492.107
- Zevenhuizen LPTM, Bertocchi C, Van Neerven ARW (1986) Congo red absorption and cellulose synthesis by Rhizobiaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek*. doi: 10.1007/BF00393465
- Zhang H, Kim M-S, Krishnamachari V, et al (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839–851. doi: 10.1007/s00425-007-0530-2
- Zhang H, Yohe T, Huang L, et al (2018) dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res* 46:W95–W101. doi: 10.1093/nar/gky418
- Zhang X, Li B, Wang H, et al (2012) *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1871–1876. doi: 10.1099/ijs.0.026880-0
- Zhu ME, Chen WX, Wang, et al (2002) *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2231–2239. doi: 10.1099/00207713-52-6-2231