
Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



IDENTIFICACION Y ANALISIS DE LA
DIVERSIDAD GENOTIPICA DE RIZOBIOS DE
LEGUMINOSAS QUE NODULAN EN TALLO
Caracterización de rizobios fotosintéticos nativos

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Marcela Susana Montecchia

Director: Dr. Augusto F. García

Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Fisiológicas
IBYF-CONICET

Buenos Aires, 2006

IDENTIFICACION Y ANALISIS DE LA DIVERSIDAD
GENOTIPICA DE RIZOBIOS DE LEGUMINOSAS QUE
NODULAN EN TALLO

Caracterización de rizobios fotosintéticos nativos

FIRMA DE LOS JURADOS

Nombre y apellido Firma Calificación

Nombre y apellido Firma Calificación

Nombre y apellido Firma Calificación

Identificación y análisis de la diversidad genotípica de rizobios de leguminosas que nodulan en tallo. Caracterización de rizobios fotosintéticos nativos

Resumen

Los rizobios fijan N₂ en asociación simbiótica con plantas leguminosas. En esta simbiosis, existen grupos con propiedades inusuales: las leguminosas que nodulan en tallo y los rizobios fotosintéticos.

En este trabajo se identificó y caracterizó a los rizobios de especies nativas de *Aeschynomene* y *Sesbania* que nodulan en tallo. Se analizó la diversidad genotípica entre las cepas, y en particular, las propiedades fotosintéticas de los rizobios de *Aeschynomene*. Las cepas aisladas se caracterizaron mediante rep-PCR (*repetitive sequence based-PCR*), análisis de restricción del gen ribosomal 16S y de la región intergénica ribosomal 16S-23S (ARDRA y 16S-23S rDNA IGS-RFLP, respectivamente) y análisis de secuencia del gen 16S rRNA.

Los rizobios de *Aeschynomene rudis* y *A. denticulata* son fotosintéticos y todos pueden clasificarse como *Bradyrhizobium* sp.. Los datos de rep-PCR revelaron una alta diversidad entre los aislamientos, con un grupo genotípicamente diferente correspondiente a las cepas que producen cantaxantina. El análisis de secuencia del 16S rDNA de una cepa representativa confirmó la posición de los rizobios fotosintéticos en un grupo filogenético diferente dentro del grupo *Bradyrhizobium*. La expresión del aparato fotosintético es regulada por oxígeno y luz en forma diferente a lo descrito en otras cepas de bradyrizobios fotosintéticos: la acumulación de bacterioclorofila (BChl) es mayor en condiciones microaeróbicas y producen pigmentos fotosintéticos en oscuridad. Sin embargo, bajo luz continua, condición en la que no se observa acumulación de BChl, la expresión de los polipéptidos de la antena del aparato fotosintético es alta, lo que sugiere una regulación a nivel postranscripcional.

Los rizobios aislados de *Sesbania* spp. son taxonómicamente diversos. Según el análisis de secuencia del 16S rDNA, los microsimbiontes de *Sesbania virgata* pueden clasificarse como *Azorhizobium doebereinae*, una especie nueva recientemente descrita, y los de *S. exasperata* como *Rhizobium* sp., relacionados a *Rhizobium giardinii*. Entre los aislamientos de cada una de las especies también existe una gran diversidad detectada por rep-PCR pero con una alta proporción de cepas hermanas. Las cepas de *Rhizobium* sp. probablemente representen una especie nueva entre los rizobios, ya que poseen solo un 97% de identidad de secuencia del 16S rDNA con las especies más relacionadas, además de diferencias fenotípicas en la utilización de sustratos carbonados y las condiciones de crecimiento.

Palabras clave: diversidad, simbiosis, nódulos de tallo, rizobios fotosintéticos, *Aeschynomene*, *Bradyrhizobium*, *Sesbania*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*.

Identification and analysis of genomic diversity of rhizobia from stem-nodulating legumes. Characterization of indigenous photosynthetic rhizobia

Abstract

Rhizobia fix N₂ in symbiosis with leguminous plants. In this symbiosis there are groups with unusual properties: stem-nodulating legumes and photosynthetic rhizobia.

In this work the rhizobia from stem-nodulating native legumes species of the genera *Aeschynomene* and *Sesbania* were characterized and identified. The genomic diversity among the isolates and the photosynthetic properties of *Aeschynomene* rhizobia were analyzed. The isolates were characterized by rep-PCR (repetitive sequence based-PCR) genomic fingerprinting, amplified 16S rDNA restriction analysis (ARDRA), 16S-23S intergenic spacer–restriction fragment length polymorphism (IGS-RFLP) analysis and 16S rDNA sequencing.

Rhizobia found in *Aeschynomene rudis* and *A. denticulata* are photosynthetic, and all of them could be classified as *Bradyrhizobium* sp.. The rep-PCR data uncovered a high diversity existing among the isolates including a genotypically different group of strains synthesizing canthaxanthin. The 16S rRNA gene sequence analysis of one representative isolate confirmed the position of photosynthetic rhizobia in a distinct phylogenetic group within the *Bradyrhizobium* cluster. The expression of their photosynthetic apparatus was regulated by oxygen and light in a manner which did not agree with earlier results in other photosynthetic bradyrhizobia: bacteriochlorophyll (BChl) accumulation is higher under microaerobic conditions and they produce photosynthetic pigments in the dark. However, under continuous light, condition in which no BChl was accumulated, the expression of the photosynthetic genes of the antenna is strong, suggesting a posttranscriptional regulation.

The rhizobia isolated from *Sesbania* spp. are taxonomically diverse. Based on 16S rDNA sequence analysis, the microsymbionts of *S. virgata* could be classified as *Azorhizobium doebereineriae*, a new species recently described, and those from *S. exasperata* could be classified as *Rhizobium* sp. related to *Rhizobium giardinii*. Among the isolates of those species there is a remarkable genetic diversity as evidenced by rep-PCR but including a high number of clonemates. The *Rhizobium* sp. strains nodulating *S. exasperata* probably represent a novel rhizobial species since they show a 16S rDNA sequence similarity with the most closely related species of as low as 97%. Additionally, they show phenotypic differences concerning the utilization of carbon sources and also growth conditions.

Key words: diversity, symbiosis, stem nodules, photosynthetic rhizobia, *Aeschynomene*, *Bradyrhizobium*, *Sesbania*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*.

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| Simbiosis entre plantas y bacterias..... | 2 |
| Leguminosas que nodulan en tallo: su importancia agronómica y ambiental..... | 3 |
| Clasificación de las leguminosas que nodulan en tallo..... | 4 |
| Propiedades inusuales de los rizobios que nodulan en tallo..... | 5 |
| Capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre y crecimiento en N ₂ | 6 |
| Clasificación y características de los rizobios de especies de Aeschynomene que nodulan en tallo..... | 7 |
| Propiedades fotosintéticas de los rizobios de Aeschynomene..... | 9 |
| Caracterización de los genes fotosintéticos..... | 11 |
| Complejos fotosintéticos y regulación de los genes fotosintéticos bacterianos | 13 |
| Clasificación y características de los rizobios de especies de Sesbania que nodulan en tallo..... | 16 |
| Clasificación e identificación de bacterias..... | 18 |
| OBJETIVOS..... | 22 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 23 |
| Obtención de los aislamientos..... | 24 |
| Ensayos de nodulación..... | 24 |
| Caracterización genotípica de las cepas..... | 25 |
| Preparación de DNA..... | 25 |
| rep-PCR..... | 26 |

| | |
|--|----|
| Análisis de restricción del gen ribosomal 16S amplificado por PCR (ARDRA)..... | 27 |
| Análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA (IGS-RFLP) | 28 |
| Análisis de los fingerprints..... | 28 |
| Análisis de secuencias del 16S rDNA..... | 28 |
| Determinación de actividad nitrogenasa en vida libre y crecimiento en medio de cultivo en N ₂ | 29 |
| Determinación de la producción de pigmentos fotosintéticos y preparación de membranas..... | 30 |
| Cultivos bajo distintas condiciones de oxigenación..... | 31 |
| Purificación de los complejos fotosintéticos..... | 31 |
| Determinación de bacterioclorofila y proteínas..... | 32 |
| Purificación de los polipéptidos antena..... | 32 |
| Electroforesis de proteínas en geles mono y bidimensionales..... | 32 |
| Ensayos de fotofosforilación en cromatóforos..... | 33 |
| Efecto de la iluminación con luz roja o rojo lejano en la expresión del aparato fotosintético..... | 34 |
| Experimentos de transferencia Northern..... | 35 |
| Detección de genes por PCR y análisis de secuencia de los productos amplificados..... | 36 |
| Perfil de utilización de sustratos carbonados..... | 37 |
| Pruebas bioquímicas y fisiológicas..... | 37 |
| Análisis del perfil de plásmidos..... | 38 |
| Apéndice..... | 39 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS..... | 46 |
| Obtención de rizobios simbios de especies nativas de <i>Aeschynomene</i> y <i>Sesbania</i> | 47 |
| Ensayos de nodulación..... | 48 |
| RIZOBIOS AISLADOS DE NODULOS DE <i>Aeschynomene</i> | 49 |
| TABLA 1. Origen de los aislamientos y resumen de algunas características fenotípicas..... | 49 |
| Pigmentos fotosintéticos y características de las membranas..... | 51 |
| Caracterización genotípica..... | 54 |
| rep-PCR..... | 54 |
| ARDRA..... | 58 |
| Análisis combinado de los fingerprints de rep-PCR y ARDRA..... | 60 |
| Análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA..... | 62 |
| Filogenia basada en el gen ribosomal 16S..... | 66 |
| Elección de la cepa C7T1 como representativa de los rizobios fotosintéticos nativos de <i>Aeschynomene</i> | 68 |
| Purificación de los complejos fotosintéticos RC-LH1 e identificación de los polipéptidos que forman parte de los complejos antena en la cepa C7T1..... | 68 |
| Síntesis de ATP inducida por la luz en cromatóforos..... | 73 |
| Expresión del aparato fotosintético en condiciones aeróbicas, semiaeróbicas y microaeróbicas..... | 73 |
| Regulación de la expresión del operón <i>puf</i> por oxígeno..... | 75 |
| Producción de pigmentos fotosintéticos bajo distintas condiciones de iluminación..... | 76 |
| Actividad nitrogenasa ex planta..... | 78 |
| Detección de genes de interés por PCR..... | 78 |

| | |
|--|-----|
| RIZOBIOS AISLADOS DE NODULOS DE Sesbania..... | 80 |
| TABLA 4. Aislamientos de Sesbania spp. y cepas de referencia..... | 80 |
| Caracterización genotípica..... | 81 |
| ARDRA..... | 81 |
| rep-PCR..... | 83 |
| Análisis combinado de los fingerprints de rep-PCR y ARDRA..... | 85 |
| IGS-RFLP..... | 86 |
| Relación filogenética de los aislamientos basada en el análisis de secuencia del gen 16S rRNA..... | 88 |
| Utilización de sustratos carbonados..... | 89 |
| Características fisiológicas..... | 94 |
| Determinación de actividad nitrogenasa y crecimiento en N ₂ | 95 |
| Detección de genes de fijación de N ₂ | 95 |
| Perfil de plásmidos..... | 96 |
| DISCUSION..... | 98 |
| Conclusiones | 108 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 109 |
| Divulgación de los resultados obtenidos | 124 |

INTRODUCCION

Simbiosis entre plantas y bacterias

Las bacterias diazotróficas tienen la capacidad biológica de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio para utilizarlo como nutriente para su crecimiento. Algunas establecen una asociación simbiótica con hospedadores específicos, y fijan nitrógeno formando estructuras especiales en el hospedador o en las bacterias mismas. Dos asociaciones simbióticas de gran importancia ambiental y agronómica, son aquellas entre las bacterias denominadas rizobios y las plantas leguminosas (*Fabaceae*), y entre los actinomicetes y las plantas actinorrícicas. Dentro del ciclo biológico del nitrógeno, en términos cuantitativos, la asociación simbiótica entre plantas y bacterias diazotróficas es el enlace biocatalítico más importante para el flujo de nitrógeno desde la atmósfera. Estas plantas son utilizadas como abonos verdes para restablecer o aumentar la fertilidad de suelos degradados, siendo una alternativa al uso de fertilizantes químicos nitrogenados.

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de inducir la formación de nuevos órganos en las plantas, denominados nódulos, en los cuales reducen el nitrógeno atmosférico a amonio para el beneficio de la planta hospedante. En ausencia de las plantas leguminosas, las poblaciones de rizobios se encuentran comúnmente en los suelos, donde pueden sobrevivir saprofiticamente. Además, se ha encontrado que su hábitat natural se ha extendido a un tercer nicho: las raíces de las gramíneas, en las cuales no forman ninguna estructura similar al nódulo. El hábitat dentro de las raíces de estas plantas, es un reservorio importante para varias bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno, conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR. De la misma manera que lo hacen la mayoría de estas PGPR en sus plantas gramíneas hospedantes, estos rizobios promueven eficientemente el crecimiento del arroz (Yanni *et al*, 1997; Chaintreuil *et al*, 2000).

Hay más de 44 especies reconocidas de bacterias que nodulan leguminosas. La filogenia basada en el análisis comparativo de las secuencias del gen ribosomal 16S las clasifica dentro de distintos géneros pertenecientes a las clases *Alphaproteobacteria* (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) y *Betaproteobacteria* (*Burkholderia* y *Ralstonia*) (Sawada *et al*, 2003). La sistemática de los rizobios se encuentra en revisión, en los últimos años fueron descritas nuevas especies y algunas especies

han sido reclasificadas, aunque no todas validadas. La taxonomía actualizada de los rizobios puede encontrarse en http://www.rhizobia.co.nz/Rhizobia_Taxonomy.html.

El nódulo es una estructura que se establece luego de un complejo intercambio de señales químicas entre la bacteria y la planta. Su función es permitir a los rizobios residentes fijar N_2 para exportarlo a la planta a cambio de carbono fijado. Los rizobios invaden las raíces, y finalmente entran a las células vegetales donde se diferencian en bacteroides, que es la forma endosimbiótica de los rizobios. Generalmente, la sacarosa formada fotosintéticamente en las hojas, es translocada a los nódulos donde se convierte en ácidos dicarboxílicos. Los bacteroides usan los ácidos dicarboxílicos como sustrato para la fosforilación oxidativa y como fuente de electrones necesaria para la reducción del N_2 en amonio. El nitrógeno del amonio es incorporado en moléculas orgánicas como amidas y ureidos, los cuales son transportados por la planta vía xilema. La fijación de N_2 es energéticamente costosa, requiere al menos 8 moles de ATP por mol de NH_4^+ formado y 4 equivalentes de electrones de donantes de bajo potencial. Tanto como la mitad de los fotosintatos producidos por las plantas puede ser asignado a la fijación de N_2 , y debido al alto costo energético de este proceso, hay mecanismos de regulación que lo inhiben si hay nitrógeno disponible en las raíces (van Rhijn *et al*, 1995).

Leguminosas que nodulan en tallo: su importancia agronómica y ambiental

La simbiosis entre rizobios y leguminosas lleva a la formación de nódulos fijadores de N_2 que, por lo general, aparecen exclusivamente en las raíces. Sin embargo, algunas especies de leguminosas forman nódulos no solo en la raíz sino también en primordios de raíz ubicados en el tallo. El primer ejemplo de este fenómeno fue divulgado en 1928 en *Aeschynomene afraspera* y posteriormente en otras especies de *Aeschynomene* y en *Neptunia oleracea* (Eaglesham y Szalay, 1983; Alazard, 1985; Ladha *et al*, 1992). El interés en las leguminosas que nodulan en tallo y sus rizobios se renovó cuando se informó el descubrimiento de la nodulación profusa en tallo de *Sesbania rostrata*, una leguminosa anual de rápido crecimiento originaria de Africa (Dreyfus y Dommergues, 1981). Desde entonces, la nodulación aérea espontánea ha sido descrita en otras cuatro especies de *Sesbania*, en especies de *Aeschynomene*, y también se han encontrado nódulos fijadores de N_2 en los tallos de *Discolobium pulchellum*.

Todas las leguminosas conocidas que nodulan en tallo pertenecen solo a 4 géneros: *Aeschynomene* (22 especies), *Sesbania* (5 especies), *Discolobium* (1 especie) y *Neptunia* (1 especie) (Boivin *et al*, 1997b). Estas leguminosas son generalmente hierbas o arbustos anuales o perennes, que crecen en riberas, pantanales y suelos anegadizos de regiones tropicales y subtropicales de Africa, América del Sur y Central y Asia.

Sesbania y *Aeschynomene* son utilizadas como abonos verdes en campos con cultivos de arroz, ya que son plantas de rápido crecimiento que fijan gran cantidad de nitrógeno atmosférico aún en presencia de nitrógeno combinado en el suelo y condiciones de anegamiento (Eaglesham y Szalay, 1983; Becker *et al*, 1988; Ladha *et al*, 1992). También son utilizadas como forrajeras debido a su alto contenido proteico, y para la recuperación de suelos degradados o disturbados, ya que existen especies tolerantes a condiciones de estrés como salinidad, inundación, deficiencia de nutrientes, metales pesados, acidez y sequía.

La simbiosis entre *S. rostrata* y su microsimbionte *Azorhizobium caulinodans* se ha convertido en uno de los modelos más estudiados de las interacciones planta-microorganismo (de Bruijn, 1989; Dénarié *et al*, 1996), donde los mecanismos moleculares que llevan a la formación del nódulo han sido estudiados en detalle. Además, el uso agronómico potencial de estas plantas como abono verde en campos de arroz, uno de los cultivos más importantes en países en desarrollo, las convierte en la única alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados.

Clasificación de las leguminosas que nodulan en tallo

La característica que distingue a las leguminosas que nodulan en tallo es la presencia de sitios de nodulación predeterminados en el tallo. La formación de estos sitios es totalmente independiente de la infección por parte de los rizobios. Los sitios de nodulación corresponden a primordios de raíces en dormición localizados en el tallo (Tsien *et al*, 1983). Estudios anatómicos mostraron que estos primordios poseen una estructura típica de raíz, que se confirma por la capacidad de los mismos de desarrollar raíces adventicias cuando los tallos están sumergidos en agua (Eaglesham y Szalay, 1983).

Dependiendo de la planta hospedante, estos primordios pueden estar distribuidos a lo largo de todo el tallo o solo en la parte inferior de éste. Permanecen

ocultos bajo la corteza del tallo, frecuentemente formando un domo epidermal, o atraviesan ligeramente esta estructura mostrando un ápice saliente que forma una cavidad circular en la epidermis del tallo. Solo los primordios salientes o apenas penetrantes son accesibles a la infección por los rizobios, que entran al primordio por invasión intercelular. La naturaleza y la localización de los sitios de nodulación son utilizadas para clasificar las leguminosas que nodulan en tallo en tres grupos (Alazard y Duhoux, 1988; Ladha *et al*, 1992). El grupo I comprende a las leguminosas acuáticas que fácilmente nodulan a lo largo de todo el tallo. En este grupo los primordios de raíz siempre sobresalen a través de la corteza, permitiendo una fácil infección bacteriana aérea. En el grupo II, considerado intermedio, los primordios son menos desarrollados que aquellos del grupo I, y frecuentemente están localizados cerca de lenticelas penetrando apenas la epidermis, siendo aún accesibles a la infección por rizobios. En el grupo III, los primordios de raíz permanecen embutidos en el tejido cortical del tallo, siempre y cuando la dormición de los primordios no sea interrumpida por anegamiento. Los nódulos nunca se encuentran en tallos aéreos, sino que están restringidos a la parte baja y sumergida del tallo. El anegamiento es un prerrequisito para la inducción de los primordios en raíces adventicias típicas, susceptibles de formar nódulos en su base.

En resumen, la presencia de primordios de raíz localizados en el tallo y accesibles a la infección, es clave en la clasificación de las leguminosas que nodulan en tallo. Además, solo los nódulos que tienen una conexión vascular con el tallo (sumergido o no), son considerados verdaderos nódulos de tallo.

Bajo estas condiciones, las leguminosas pertenecientes a los grupos I y II de los géneros *Sesbania* y *Aeschynomene*, son las únicas especies clasificadas inequívocamente como verdaderas leguminosas que nodulan en tallo.

Propiedades inusuales de los rizobios que nodulan en tallo

Comparados con otros rizobios, las bacterias que nodulan en tallo tienen que enfrentar una amplia variedad de condiciones bajo las cuales tienen que ser capaces de sobrevivir y crecer, tanto fuera como dentro del nódulo en el tallo en las plantas. Existen tres factores importantes que difieren notablemente de los que se encuentran en la rizósfera o en los nódulos de raíz: la concentración de oxígeno ambiental, la casi ausencia de nitrógeno combinado para sobrevivir en el tallo o en las hojas, y la presencia de luz y fotosíntesis vegetal en la corteza del nódulo.

Estas condiciones ambientales diferentes pueden explicar porqué las cepas de *Azorhizobium caulinodans* de *Sesbania rostrata* y las cepas de *Bradyrhizobium* sp. de *Aeschynomene*, tienen la capacidad de fijar N₂ en vida libre, una propiedad inusual entre los rizobios.

Capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre y crecimiento en N₂

La mayoría de los rizobios reduce el nitrógeno atmosférico a amonio solamente durante la simbiosis, cuando se diferencian en bacteroides dentro del nódulo. Sin embargo, un número limitado de cepas de rizobios, en su mayoría pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, expresan la actividad nitrogenasa *ex planta* cuando crecen en cultivos puros en baja tensión de oxígeno. Pero a pesar de su actividad nitrogenasa en cultivos puros, ninguna de estas cepas es capaz de utilizar el nitrógeno fijado para su metabolismo y aún requieren el agregado de nitrógeno combinado en el medio de cultivo para su crecimiento.

Sin embargo, la cepa ORS571 de *Azorhizobium caulinodans* no solo fija N₂ *ex planta*, sino que es capaz de crecer en vida libre con N₂ como única fuente de nitrógeno. Los requisitos para la fijación de N₂ son: una baja tensión de oxígeno (3% O₂ en la fase gaseosa), la ausencia de nitrógeno combinado en el medio, y además, es esencial el agregado de biotina, pantotenato y ácido nicotínico al medio definido (Dreyfus *et al*, 1983). La cepa ORS571 ha sido utilizada como modelo para estudios de fisiología, genética y regulación del proceso de fijación de nitrógeno en los rizobios.

Con pocas excepciones, todas las demás cepas de rizobios capaces de crecer con N₂ como única fuente de nitrógeno, pertenecen a bradyrizobios aislados de nódulos de tallo de diferentes especies de *Aeschynomene*. Esta propiedad es una característica extendida en los bradyrizobios que nodulan en tallo, pero la actividad nitrogenasa en vida libre requiere de una concentración de oxígeno mas baja (0,5% O₂ en la fase gaseosa) que en *A. caulinodans* (Alazard, 1990).

Por lo tanto, la capacidad de crecer a expensas de N₂ en cultivo puede considerarse una característica general de los rizobios que nodulan en tallo.

Clasificación y características de los rizobios de especies de *Aeschynomene* que nodulan en tallo

Algunos de los aislamientos que nodulan determinadas especies de *Aeschynomene*, tienen la capacidad de producir pigmentos fotosintéticos, una característica única entre los rizobios. La primera cepa descrita fue aislada de un nódulo de tallo de *A. indica*, y se denominó BTAi1 (Eaglesham y Szalay, 1983; Eaglesham *et al*, 1990). La presencia inusual de un sistema fotosintético en la cepa BTAi1 hizo que se le asignara el nombre tentativo de *Photorhizobium thompsonianum*, pero el análisis de secuencia del gen ribosomal 16S mostró que estaba estrechamente relacionada con *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhodopseudomonas palustris* (Young *et al*, 1991).

Análisis de homología DNA-DNA de BTAi1 y *B. japonicum* USDA 110 con aislamientos de suelo de rizobios capaces de nodular *A. indica*, indicaron que la mayoría de los aislamientos están estrechamente relacionados unos con otros pero no con *B. japonicum*. También se observó que el DNA de todos los rizobios productores de pigmentos fotosintéticos, e incluso el de algunos no productores, hibridiza con DNA que contiene los genes del aparato fotosintético de *Rhodobacter capsulatus* (van Berkum *et al*, 1995).

De estudios de taxonomía numérica que determinaron una relación basada en el fenotipo, surgió que los rizobios fotosintéticos forman un grupo separado de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Azorhizobium* (Ladha y So, 1994). Sin embargo, un nuevo estudio de esos aislamientos, basado en el análisis de secuencia del 16S rDNA, mostró que pertenecen al mismo grupo que *Bradyrhizobium* (So *et al*, 1994; Wong *et al*, 1994).

Posteriormente, un estudio de hibridización DNA-DNA entre cepas de *Bradyrhizobium*, determinó que los bradyrizobios fotosintéticos son heterogéneos y pertenecen, al menos, a dos genoespecies entre las once descritas para este género (Willems *et al*, 2001c). Las genoespecies o especies genómicas, son grupos de microorganismos cultivables para los cuales los datos comparativos de hibridización DNA-DNA indican que constituyen una nueva especie pero no se han encontrado propiedades fenotípicas que los distinguan.

Si bien los estudios realizados en diferentes colecciones de cepas aisladas de *Aeschynomene* llevan al consenso de la clasificación de los rizobios fotosintéticos

como *Bradyrhizobium*, su posición taxonómica no es del todo clara. Puede aceptarse que pertenecen al género *Bradyrhizobium*, pero el número de especies que representa este grupo aún es impreciso. Además, el descubrimiento reciente de que *Blastobacter denitrificans*, una especie relacionada a los bradyrizobios fotosintéticos, puede también establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con *Aeschynomene*, y que además tiene en su genoma el gen que codifica para una de las subunidades del centro de reacción fotosintético, suma una complejidad adicional (van Berkum y Eardly, 2002; van Berkum *et al*, 2006).

En la simbiosis rizobio-leguminosa se define el concepto de grupos de inoculación cruzada, que refleja la especificidad de nodulación. Estos grupos de inoculación son grupos de leguminosas, cualquiera de las cuales desarrolla nódulos cuando es inoculada con rizobios aislados de otra leguminosa perteneciente al grupo.

Entre las especies de *Aeschynomene* se han descrito 3 grupos de inoculación cruzada (Alazard, 1985). Las especies de *Aeschynomene* que no nodulan en tallo o solo lo hacen en la parte baja y sumergida del mismo, pertenecen al grupo 1. Las especies de este grupo son noduladas por bradyrizobios no específicos, que también forman nódulos efectivos en la raíces de *Macroptillum atropurpureum* y *Acacia albida*, que son plantas hospedadoras de ensayo para *Bradyrhizobium* spp. del grupo misceláneo del caupí. Ninguna de estas cepas es fotosintética y pocas forman nódulos en especies que pertenecen al grupo 2 de inoculación cruzada.

El grupo 2 es más específico y los bradyrizobios incluyen cepas fotosintéticas y no fotosintéticas. Solo las cepas fotosintéticas, incapaces de nodular plantas del grupo 1, pueden formar nódulos en especies de los grupos 2 y 3.

El grupo 3 es nodulado por bradyrizobios altamente específicos, la mayoría de ellos son fotosintéticos e incapaces de nodular plantas del grupo 1.

Los bradyrizobios fotosintéticos se encuentran exclusivamente en los grupos 2 y 3, los cuales corresponden a las especies de *Aeschynomene* clasificadas como verdaderas leguminosas que nodulan en tallo (grupos I y II). A diferencia de los aislamientos no fotosintéticos, las cepas fotosintéticas poseen una alta especificidad de nodulación.

No se ha encontrado inoculación cruzada entre *Sesbania rostrata* y especies de *Aeschynomene* (Alazard, 1985).

En la interacción rizobio-leguminosa, la especificidad de nodulación es controlada principalmente por moléculas señal bacterianas, extracelulares, denominadas factores Nod (Dénairé *et al*, 1996; Perret *et al*, 2000). Todos los factores Nod son quitinolígomeros mono N-acetilados en el extremo no reductor y diversamente sustituidos en ambos extremos de la molécula. Los genes comunes de nodulación, *nod ABC*, presentes en todos los rizobios descritos hasta ahora, determinan la síntesis del esqueleto del lipooligosacárido. El gen *nodA*, involucrado en la transferencia de la cadena acilo al esqueleto del factor Nod, mostró ser un buen marcador de nodulación (Roche *et al*, 1996). El análisis filogenético de secuencias *nodA* de cepas de *Bradyrhizobium*, mostró que la secuencia de este gen en los bradyrizobios fotosintéticos del grupo de inoculación 2 constituye una nueva rama, relacionada a los genes *nodA* de otros bradyrizobios. Sin embargo, aún no ha sido posible obtener la secuencia del gen *nodA*, como tampoco de *nodB* o *nodC*, para los bradyrizobios fotosintéticos del grupo 3, lo que sugiere que existe divergencia entre los genes *nod* comunes de los bradyrizobios fotosintéticos de los grupos 2 y 3 (Chaintreuil *et al*, 2001).

Propiedades fotosintéticas de los rizobios de *Aeschynomene*

La cepa BTAi1, aislada de un nódulo de tallo de *A. indica*, fue el primer rizobio fotosintético descrito. Esta cepa produce bacterioclorofila *a* (BChl *a*) y carotenos solo cuando crece en condiciones aeróbicas y bajo ciclos de luz-oscuridad (Evans *et al*, 1990). Debido a la expresión de un aparato fotosintético funcional, a la cepa BTAi1 se la considera fotosintética, al igual que a todos los rizobios que producen BChl (Fleischman y Kramer, 1998). Sin embargo, a diferencia de las bacterias fotosintéticas púrpuras que crecen en forma fotoautótrofa en anaerobiosis, la cepa BTAi1, como todos los rizobios, es estrictamente aeróbica, realiza una fotosíntesis heterotrófica y es incapaz de crecer sin una fuente de carbono orgánica aún en presencia de luz. Por esto, pertenece al grupo de las bacterias aeróbicas que sintetizan bacterioclorofila, también conocidas como bacterias fotótrofas aeróbicas, una categoría fisiológica distinta de las clásicas bacterias fotótrofas púrpuras anoxigénicas (Yurkov y Beatty, 1998).

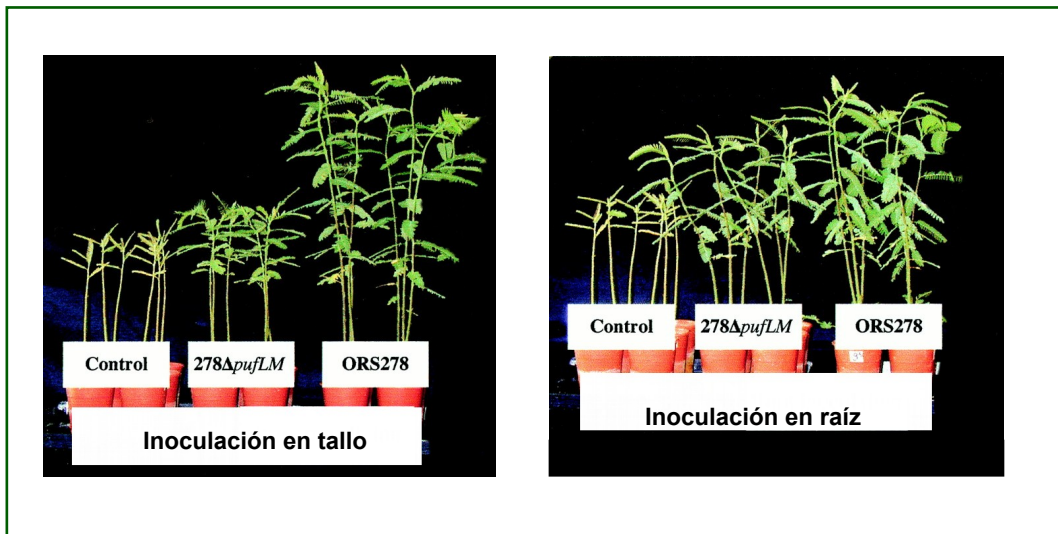
A diferencia de las bacterias púrpuras que forman su sistema fotosintético bajo condiciones de iluminación continua u oscuridad, la mayoría de los bradyrizobios fotosintéticos requieren de determinadas condiciones de luz para iniciar la síntesis de

su aparato fotosintético. La cepa BTAi1 produce pigmentos solo cuando crece bajo ciclos de luz-oscuridad, y no bajo luz u oscuridad continua (Evans *et al*, 1990).

El efecto de la intensidad de luz y la tensión de oxígeno sobre la acumulación de BChl han sido estudiados inicialmente en la cepa BTAi1 (Wettlaufer y Hardy, 1995). Los resultados de estos estudios indican que esta cepa produce la máxima cantidad de BChl a la concentración de oxígeno atmosférica (21%) y requiere de fotoperíodo (16 horas luz-8 horas oscuridad), con un flujo de fotones de aproximadamente 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La acumulación de BChl ocurre predominantemente en la oscuridad, siempre y cuando haya habido exposición a un mínimo umbral de luz. Mientras que la acumulación de BChl es estimulada por la luz, ésta también inhibe su acumulación durante la exposición a los sucesivos ciclos luz-oscuridad. Utilizando una serie de filtros se determinó que la acumulación de BChl se inicia por luz de longitud de onda menor a 750 nm, y se inhibe por luz de longitud de onda menor a 650 nm. Esto sugiere que la luz ejerce su efecto regulador mediante la conversión de un posible fotorreceptor, y que el fotorreceptor responsable de esta regulación involucraría un tetrapirrol que podría ser un fitocromo (Fleischman *et al*, 1995).

La mayoría de los rizobios fotosintéticos producen pigmentos solo cuando crecen bajo ciclos luz-oscuridad, una condición similar a la que encuentran dentro de los nódulos en el tallo de las plantas, y no bajo luz u oscuridad continua. Sin embargo, algunos también lo hacen en oscuridad o producen otros pigmentos que no tienen una función conocida en el aparato fotosintético bacteriano (van Berkum *et al*, 1995; Lorquin *et al*, 1997; Molouba *et al*, 1999). Entre los bradyrizobios fotosintéticos pueden diferenciarse dos grupos de pigmentación. La mayoría, como BTAi1, produce espiriloxantina como único caroteno, mientras que otros producen cantaxantina como pigmento principal. La cantaxantina es un caroteno de gran importancia en las industrias agroalimentaria, farmacéutica y cosmética, debido a su uso como colorante y a sus propiedades fotoprotectoras.

El rizobio fotosintético *Bradyrhizobium* sp. ORS278, aislado de *Aeschynomene sensitiva* en Senegal, es la cepa en la que se caracterizaron los genes de biosíntesis de cantaxantina y la que se utilizó en estudios recientes de fisiología y genética de los rizobios que producen BChl (Lorquin *et al*, 1997; Hannibal *et al*, 2000; Giraud *et al*, 2000, 2002, 2004a; Jaubert *et al*, 2004). Con la obtención de la cepa mutante no fotosintética, se determinó que la fotosíntesis bacteriana tiene un rol importante en la eficiencia de la nodulación en tallo en *Aeschynomene* (Figura 1).



Reproducido de Giraud *et al* (2000).

FIGURA 1. Comparación del crecimiento de plantas de *Aeschynomene sensitiva* inoculadas en tallo o en raíz, con la cepa ORS278 y la cepa mutante no fotosintética 278 Δ pufLM.

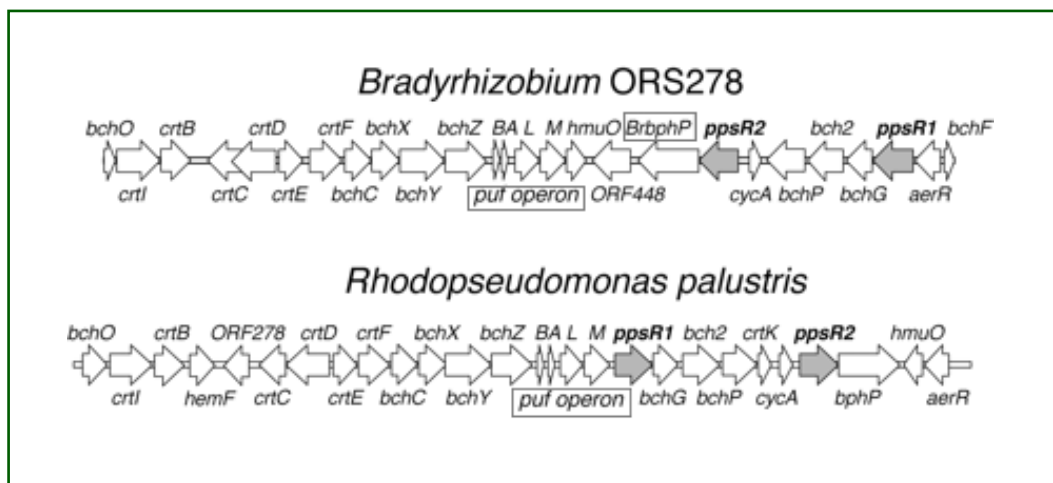
Esta cepa es una de las bacterias elegidas para la secuenciación de genomas completos bacterianos que actualmente se encuentra en realización (http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projects/Project_MA/MA.html).

El genoma de la cepa *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 también está siendo secuenciado (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/bra_b/bra_b.home.html)

Caracterización de los genes fotosintéticos

Los genes necesarios para la formación del aparato fotosintético han sido caracterizados en varias bacterias púrpuras (*Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum centenum* y *Rubrivivax gelatinosus*). Estos siempre se encuentran en una región de 45 kb del cromosoma, denominada PGC (*Photosynthetic gene cluster*). El PGC incluye varios operones de genes involucrados en la biosíntesis de bacterioclorofila (*bchl*), carotenos (*crt*), polipéptidos de las antenas (*pufBA* y *pucBAC*), centros de reacción (*pufLM*, *puhA*) y sus reguladores (*ppsR*, *tspO* y *ppaA*).

Entre los bradyrizobios fotosintéticos, el PGC de la cepa *Bradyrhizobium* sp. ORS278 ha sido recientemente aislado (Giraud *et al*, 2002). Su secuenciación parcial reveló un arreglo de genes similar al de las bacterias fotosintéticas púrpuras, con una estructura de superoperón conservada: *bchCXYZpufBALM* (Figura 2)



Reproducido de Jaubert *et al* (2004).

FIGURA 2. Arreglo de los genes localizados en el PGC en *Bradyrhizobium* sp. ORS278 y *Rhodopseudomonas palustris*.

El operón *puf* de la cepa ORS278 incluye solo a los genes *pufB*, *pufA*, *pufL* y *pufM*, siendo una de las organizaciones más simples de las que hasta ahora se han descrito para una bacteria fotosintética. El análisis filogenético de las secuencias de *pufM* y *pufL* mostró una relación cercana con *Rhodopseudomonas palustris*, al igual que lo establecido por el análisis de secuencias del 16S rDNA (Giraud *et al*, 2000).

La congruencia del análisis filogenético basado en las secuencias del gen ribosomal 16S y los genes *pufL* y *pufM* sugiere que el carácter fotosintético de la cepa ORS278 no es resultado de transferencia lateral de genes fotosintéticos como en otras bacterias (Nagashima *et al*, 1997; Igarashi *et al*, 2001), sino que evolucionó de un antecesor común con *Rps. palustris*. Esto indicaría que *Bradyrhizobium* pudo haber evolucionado de ser una bacteria fotosintética de vida libre a una simbiótica, por la adquisición de genes de nodulación por transferencia lateral. Hay varios ejemplos de este tipo de transferencia lateral de genes: genes de nodulación entre rizobios, y también entre rizobios y betaproteobacterias (Suominen *et al*, 2001; Chen *et al* 2003; Moulin *et al*, 2003).

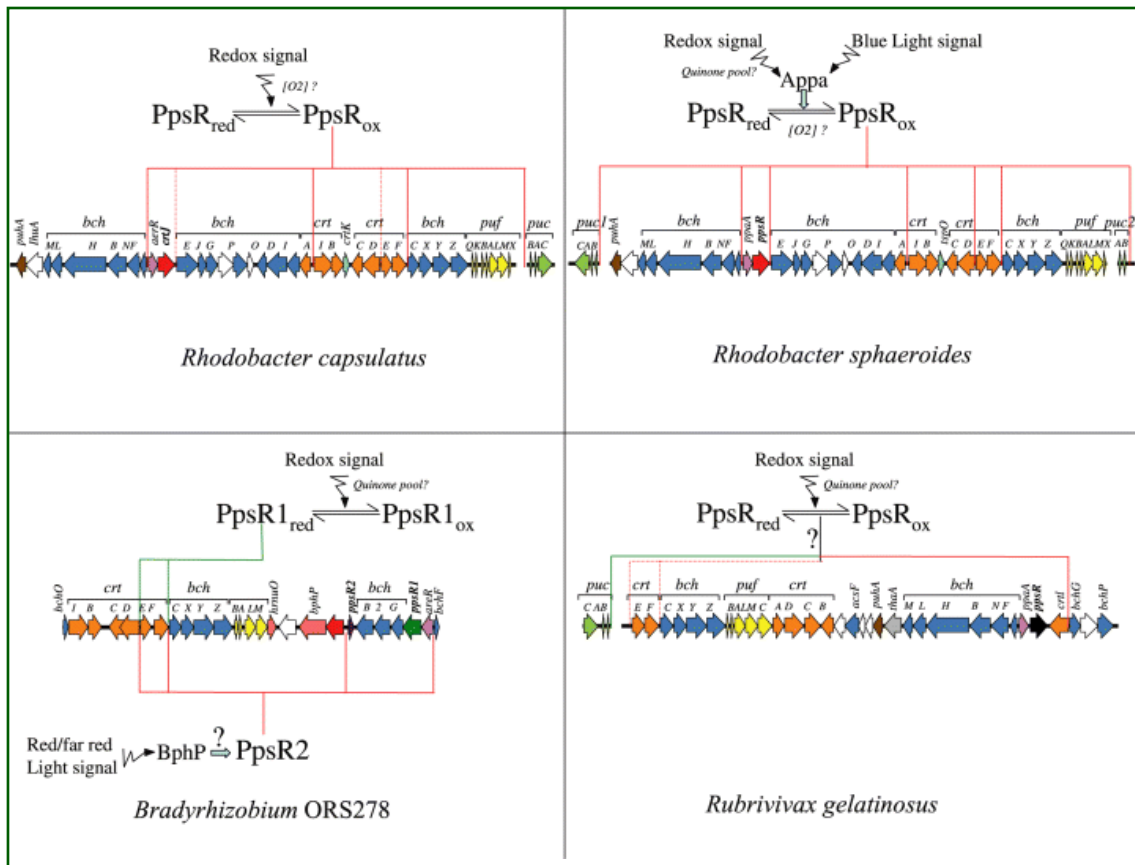
Complejos fotosintéticos y regulación de los genes fotosintéticos bacterianos

En las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, la conversión de energía lumínica en energía química requiere de varios complejos membranosos especializados denominados complejos antena (LH), del centro de reacción fotosintético (RC) y del complejo citocromo bc_1 . Luego de la absorción de luz por las moléculas de bacterioclorofila y de carotenos asociados con los complejos antena, la energía es transferida al centro de reacción. En éste ocurre una separación de cargas, que inicia así una transferencia de electrones que genera una fuerza protón motriz a través de la membrana, utilizada finalmente para la síntesis de ATP.

La mayoría de las bacterias púrpuras anaeróbicas tienen, además de la membrana citoplasmática (CM), un sistema de membranas intracitoplasmáticas (ICM), de morfología especie-específica, en el cual se localiza el aparato fotosintético. Las ICM se forman por invaginación de la CM y permanecen conectadas a la misma, no son un compartimiento independiente en las células fotosintéticas sino una porción especializada del sistema de membranas. Ambos tipos de membranas presentan claras diferencias en estructura, composición química, propiedades físicas y función, y pueden separarse por sedimentación diferencial, luego de desintegrar las células por ultrasonido o presión. Las ICM pueden tener forma de vesículas, túbulos, lamelas planas semejantes a los tilacoides, o ser membranas irregulares. La intensidad de luz y la tensión de oxígeno regulan la formación de las ICM, de manera tal que su síntesis se induce cuando la tensión de oxígeno disminuye y su desarrollo es máximo durante el crecimiento anaeróbico.

La síntesis del aparato fotosintético es altamente regulada en respuesta a la tensión de oxígeno y la intensidad de la luz (Klug 1993; Oh y Kaplan 2001; Bauer *et al*, 2003). Bajo condiciones aeróbicas la expresión de los genes fotosintéticos es baja y las bacterias fotosintéticas se desarrollan a partir de la energía derivada de la respiración aeróbica, mientras que bajo condiciones semiaeróbicas o anaeróbicas en la luz, se sintetiza el aparato fotosintético, permitiendo así el crecimiento a través de la utilización de la energía de la luz. El control fino de la síntesis del fotosistema por oxígeno recae en la acción combinada de varios factores de transcripción, los cuales activan o reprimen la expresión de los genes de fotosíntesis en respuesta a las condiciones redox (Gregor y Klug, 1999; Bauer *et al*, 2003). Un regulador bien caracterizado es el represor aeróbico PpsR en *Rhodobacter sphaeroides* o su homólogo CrtJ en *Rhodobacter capsulatus* (Penfold y Pemberton, 1994;

Ponnampalam *et al*, 1995). Ambas proteínas comparten el mismo modo de acción: bajo condiciones oxidantes, PpsR/CrtJ bloquean la transcripción uniéndose a las regiones promotoras de los genes *bch*, *crt* y *puc*. Su actividad puede ser modulada por las condiciones redox gracias a su percepción mediante la formación de puentes disulfuro intramoleculares promovidas por el oxígeno, lo cual estimula su unión a los promotores blanco. Además, puede interactuar con otros reguladores específicos involucrados en diferentes circuitos regulatorios. Las propiedades de PpsR como regulador multifacético de la expresión de genes fotosintéticos y la diversidad en sus mecanismos de acción en distintas especies de bacterias fotosintéticas han sido recientemente revisadas (Ákos *et al*, 2005; Elsen *et al*, 2005). La figura 3 muestra un diagrama de los circuitos regulatorios que involucran a PpsR en el control de la expresión de genes de fotosíntesis, caracterizados en *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Bradyrhizobium* sp. ORS 278 y *Rubrivivax gelatinosus*.

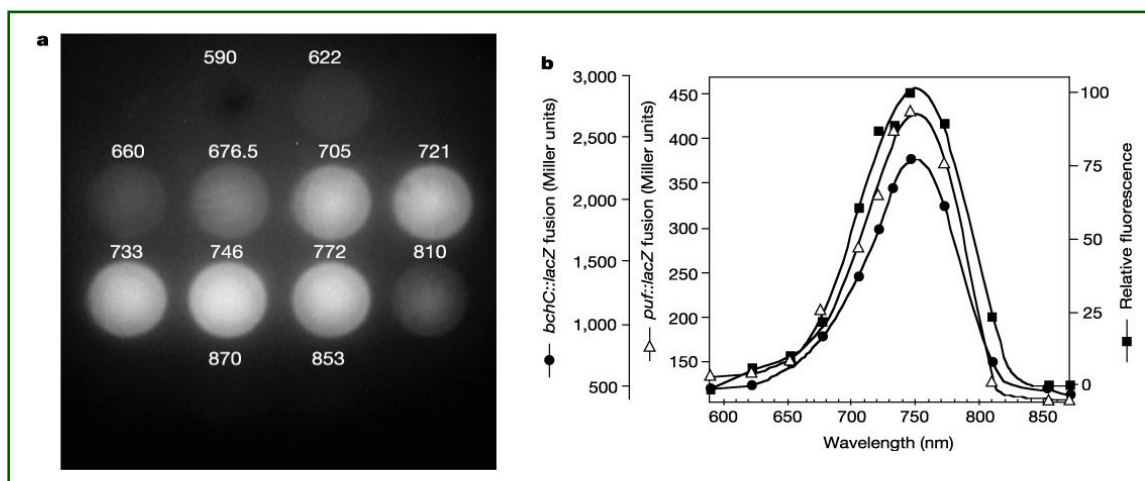


Reproducido de Elsen *et al* (2005)

FIGURA 3. Control de la expresión de genes de fotosíntesis mediada por PpsR. Las líneas rojas y verdes indican, respectivamente, control negativo y positivo ejercido directamente por PpsR.

La intensidad de la luz también controla la expresión de los genes fotosintéticos con un efecto represivo menos drástico que el oxígeno. El mecanismo molecular de esta regulación, descrito en *Rhodobacter sphaeroides*, involucra las acciones antagonistas del represor PpsR y de la flavoproteína AppA. AppA es un fotorreceptor de luz azul que modula la actividad de unión al DNA de PpsR en respuesta a señales mediadas por oxígeno y luz, utilizando dos mecanismos diferentes: puede romper el puente disulfuro de la forma oxidada de PpsR o formar un complejo inactivo AppA-PpsR₂ (Braatsch *et al*, 2002; Masuda y Bauer, 2002).

Un tipo nuevo de regulación por luz ha sido descrito en *Bradyrhizobium* sp. ORS278 y también en *Rhodopseudomonas palustris* (Giraud *et al* 2002; Giraud *et al*, 2004b). En estas dos bacterias, dependiendo de la tensión de oxígeno, la luz rojo lejano es necesaria para desencadenar la expresión de genes de fotosíntesis. El mecanismo de esta regulación por luz ha sido parcialmente dilucidado en la cepa ORS278 e involucra un bacteriofitocromo (denominado BrBphP por *Bradyrhizobium bacteriophytochrome photoreceptor*). Esta cromoproteína ejerce su actividad regulatoria por medio de la interconversión de las formas Pr y Pfr que absorben luz roja y rojo lejano, respectivamente. El espectro de acción de la luz sobre la síntesis del aparato fotosintético es característico de la absorción de la forma Pfr, e indica que Pr es la forma activa del BrBphP.



Reproducido de Giraud *et al* (2002)

FIGURA 4. Espectro de acción de la luz en la síntesis de fotosistema en *Bradyrhizobium* sp. ORS278. a, Imagen de fluorescencia de bacterioclorofila de las células crecidas en placas de Petri bajo luz de diferentes longitudes de onda. b, Dependencia de la longitud de onda de la síntesis del aparato fotosintético y de la expresión de proteínas de fusión en genes fotosintéticos.

En base al análisis del fenotipo de distintas mutantes y al espectro de acción de la luz en la síntesis del fotosistema, se propuso que la forma activa Pr del bacteriofitocromo antagoniza el efecto represivo de PpsR2.

Tanto en *Bradyrhizobium* sp. ORS278 como en *Rps. palustris*, se han encontrado dos genes *ppsR*, denominados *ppsR1* y *ppsR2* (Jaubert *et al*, 2004). En *Bradyrhizobium*, ambas proteínas PpsR ejercen efectos antagónicos en la regulación de la formación del fotosistema, con un rol represor clásico de PpsR2, y un rol activador de PpsR1. La regulación de la síntesis del fotosistema involucra a los dos PpsR, que compiten por la unión a los mismos genes fotosintéticos. Esta competencia estaría modulada por dos factores: la luz por medio de la acción antagónica del BphP sobre PpsR2, y el potencial redox por medio de cambios en el estado de oligomerización de PpsR1. Sin embargo, el conocimiento actual sobre la regulación del fotosistema en los bradyrizobios fotosintéticos, no explica la ausencia de fotosistema en condiciones de iluminación continua.

La secuenciación del genoma completo de *Rps. palustris* (Larimer *et al*, 2003) reveló la presencia de 6 genes que codifican para BphP, 4 de ellos localizados cerca de genes fotosintéticos. Sus propiedades y su relación con la expresión del aparato fotosintético en esta bacteria están siendo estudiadas (Evans *et al*, 2005; Giraud *et al*, 2005).

En los bradyrizobios fotosintéticos, la acumulación de BChl también es influenciada por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo (Wetlauffer y Hardy, 1992; Hungría *et al*, 1993). Las células forman el aparato fotosintético cuando la fuente de carbono está agotándose o no hay una buena fuente disponible, y la fotosíntesis puede, entonces, proveer una fuente de energía alternativa. Este tipo de inducción del sistema fotosintético por limitación de carbono ha sido observado en al menos otras dos bacterias fotosintéticas aeróbicas (Kolber *et al*, 2001; Suyama *et al*, 2002).

Clasificación y características de los rizobios de especies de *Sesbania* que nodulan en tallo

De las 5 especies descritas, todas originarias de Africa o Asia, *Sesbania rostrata* es prácticamente la única y la más estudiada. Los rizobios aislados de nódulos de tallo pertenecen en su mayoría a *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus *et al*, 1988).

Sin embargo, debido a la diversidad genética entre aislamientos de *S. rostrata* tanto de tallo como de raíz, se han descrito dos genopecies dentro del género (Rinaudo *et al*, 1991).

Las cepas de *A. caulinodans* tienen una alta especificidad de nodulación, estableciendo una simbiosis efectiva solo con *S. rostrata* y *S. punctata*. Sin embargo, las distintas especies de *Sesbania* que nodulan o no en tallo, establecen relaciones simbióticas con rizobios de distintos géneros: *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium*. La mayoría de los aislamientos de *Sinorhizobium* que nodulan *S. rostrata* (*S. saheli* y *S. terangae* bv. *sesbaniae*) poseen un rango de hospedador reducido limitado a especies de *Sesbania*, aunque también forman nódulos efectivos otras especies de *Acacia*, *Leucaena* y *Neptunia* (Boivin *et al*, 1997a). Entre los microsimbiontes de *Sesbania*, solo las cepas de *Azorhizobium* poseen como característica distintiva la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre.

En base al análisis de secuencia del gen 16S rRNA, las cepas aisladas de distintas especies de *Sesbania* han sido clasificadas como: *A. caulinodans*, *Azorhizobium* sp., *M. plurifarum*, *M. amorphae*, *Rhizobium* sp., *R. huautlense*, *R. gallicum*, *R. tropici*, *R. leguminosarum*, *Sinorhizobium* sp., *S. saheli*, *S. terangae*, *S. meliloti* y *S. fredii* (de Lajudie *et al*, 1994, 1998; Debashis y Krishnan, 1995; Boivin *et al*, 1997a; Moreira *et al*, 1998; Wang *et al*, 1998, Bala *et al*, 2002; Odee *et al*, 2002; Zurdo-Piñeiro *et al*, 2004; Sharma *et al*, 2005; Vinuesa *et al*, 2005a; Wolde-meskel *et al*, 2005). Si bien se considera que los rizobios que nodulan *Sesbania* tienen un rango de hospedador restringido y son específicos del género, éstos están distribuidos en la mayoría de los grupos filogenéticos de *Rhizobiales*.

Muy recientemente se ha propuesto una nueva especie de *Azorhizobium*, *A. doebereineriae*, para los microsimbiontes de *S. virgata* (Moreira *et al*, 2006) pero aún no es una especie válidamente publicada.

La habilidad de las distintas especies de *Sesbania* para colonizar diversos ambientes con distintos tipos de estreses bióticos y abióticos, y el hecho de establecer una simbiosis efectiva con diferentes especies de rizobios, hace posible su uso como abono verde y en la recuperación de suelos degradados o disturbados. Sin embargo, para que su uso sea exitoso, es necesario utilizar como inoculante a los rizobios apropiados para cada una de las especies de *Sesbania* y para los distintos ambientes.

Clasificación e identificación de bacterias

La identificación y clasificación de bacterias es de crucial importancia en microbiología ambiental, industrial, médica y agronómica, así como en ecología microbiana.

Tradicionalmente se emplearon diversos métodos fenotípicos, bioquímicos y serológicos para la clasificación e identificación de rizobios y en estudios de diversidad: ELISA, electroforesis mono o bidimensional de proteínas totales, patrones de utilización de sustratos, electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), perfiles de ácidos grasos (FAME), resistencia a antibióticos, sensibilidad a bacteriófagos y la compatibilidad simbiótica con plantas hospedantes (rango de hospedador).

Actualmente, la sistemática bacteriana se basa en la taxonomía polifacética (Vandamme *et al*, 1996), y la clasificación de los rizobios también incluye métodos genotípicos como la determinación de las secuencias del DNA ribosomal, estudios de hibridación DNA-DNA, determinación del porcentaje de bases del DNA (% mol G+C) y técnicas de *fingerprinting* genómico.

Las técnicas de *fingerprinting* genómico son muy utilizadas ya que son métodos confiables, rápidos, simples, y algunos de ellos muy útiles para determinar relaciones filogenéticas entre los microorganismos y clasificarlos en grupos coherentes. Algunas de estas técnicas están basadas en la amplificación de fragmentos de DNA específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas con respecto a la facilidad de aplicación, reproducibilidad, requerimiento de equipos y nivel de resolución.

Básicamente hay dos clases de protocolos que usan PCR para la clasificación e identificación de bacterias. La primera clase se basa en la amplificación de uno o pocos fragmentos de DNA específicos seguido de análisis de restricción, y en la segunda clase se utilizan *primers* arbitrarios o específicos para amplificar numerosos fragmentos distintos, que luego se separan por tamaño para dar un patrón de bandas específico o *fingerprint*. Dentro de la primera clase se encuentran las técnicas ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*) y 16S-23S rDNA IGS-RFLP (*intergenic spacer restriction fragment length polymorphism*) (Laguerre *et al*, 1994, 1996; Heyndrickx *et al*, 1996), y en la segunda clase las técnicas AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y rep-PCR (*repetitive sequence based-PCR*) (Versalovic *et al*, 1994; Vos *et al*, 1995).

El *fingerprinting* genómico mediante rep-PCR hace uso de *primers* complementarios a secuencias de DNA repetitivas, altamente conservadas, presentes en copias múltiples en la mayoría de las bacterias Gram negativas y en varias Gram positivas (Versalovic *et al*, 1991, 1994; Koeuth *et al*, 1995). Varias familias de secuencias repetitivas han sido descritas y caracterizadas (Lupsky y Weinstock, 1992), entre las cuales se encuentran las secuencias REP (*Repetitive Extragenic Palindromes*) (Stern *et al*, 1984; Versalovic *et al*, 1991), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (Hulton *et al*, 1991; Versalovic *et al*, 1991), y los elementos BOX (Martin *et al*, 1992). Estas tres familias no están relacionadas a nivel de secuencia del DNA. Las secuencias REP (38 pb) son unidades palindrómicas, al igual que la estructura central de las secuencias ERIC (126 pb). El consenso de los elementos BOX (154 pb) posee una estructura modular compuesta por tres subunidades: boxA (59 pb), boxB (45 pb) y boxC (50 pb). Este tipo de secuencias repetitivas son transcritas pero no traducidas y están presentes en ambas orientaciones y bien distribuidas en todo el genoma bacteriano. Todas tienen el potencial de formar estructuras secundarias del tipo horquilla y podrían tener un rol importante en la organización del genoma bacteriano. Debido a que se piensa que la organización genómica es moldeada por la selección, la distribución de las secuencias REP, ERIC y BOX podría ser un indicador de la estructura y evolución del genoma bacteriano.

Los elementos REP y la secuencia central conservada de ERIC, contienen repeticiones invertidas altamente conservadas. La técnica de rep-PCR se basa en el hecho de que las regiones conservadas dentro de estas secuencias y la de la subunidad boxA de los elementos BOX, sirven como sitios de unión para *primers* específicos diseñados de modo tal que permiten la amplificación de fragmentos de DNA localizados entre dos de estos elementos. Luego esos fragmentos de DNA de distinto tamaño se separan mediante electroforesis generando un patrón de bandas específico. Estos *fingerprints* permiten distinguir bacterias no relacionadas ya que cada una varía con respecto a la distribución, número de copias y distancia entre las distintas secuencias repetitivas. Sus posiciones relativas en el genoma o las de secuencias muy similares (ej. "REP *like*") parecen estar conservadas en cepas estrechamente relacionadas y ser distintas en especies diferentes (Versalovic *et al*, 1991; Lupski y Weinstock, 1992).

La técnica de rep-PCR demostró ser un método útil para identificar, caracterizar e inferir relaciones filogenéticas entre rizobios, y para distinguir cepas no diferenciables por otros métodos (Judd *et al*, 1993; Laguerre *et al*, 1996, 1997;

Schneider y de Bruijn, 1996; Rademaker y de Bruijn, 1997; Nick *et al*, 1999; Vinuesa *et al*, 1998, 2005b; Aguilar *et al*, 2001; Ferreira y Hungria 2002). El nivel de resolución taxonómica de esta técnica es mayor que el alcanzado por otros métodos de *fingerprinting* genómico y es particularmente útil para identificar y diferenciar bacterias a nivel de subespecie o cepa. Esta es una característica importante para su aplicación en el análisis de diversidad genotípica de rizobios orientado a estudios ecológicos. En esta área, se requiere un nivel de resolución más alto que el alcanzado por el análisis de secuencia del 16S rDNA, ya que aislamientos de la misma especie y aún del mismo serotipo pueden diferir significativamente en la eficiencia de fijación de N₂ y en su habilidad competitiva en la ocupación de nódulos.

Varios estudios de diversidad, caracterización genotípica y filogenia de rizobios, en los cuales se utilizó rep-PCR como método de *fingerprinting* genómico junto a otras técnicas como el análisis de secuencia del 16S rDNA, ARDRA, IGS-RFLP, MLEE o RAPD, mostraron que los resultados obtenidos con las distintas técnicas son en la mayoría de los casos acordes entre sí, y que los obtenidos mediante rep-PCR son más informativos y discriminativos para las cepas analizadas (de Bruijn, 1992; Leung *et al*, 1994; Selenska-Pobell *et al*, 1996; Vinuesa *et al*, 1998; Santos *et al*, 1999).

Para la clasificación de las bacterias la tendencia actual es considerar varias características genéticas junto con características fenotípicas, pero en el caso de los rizobios, los resultados obtenidos por métodos basados en características genotípicas no siempre concuerdan con los obtenidos con métodos fenotípicos (So *et al*, 1994; van Rossum *et al*, 1995; Vinuesa *et al*, 1998).

En estudios que involucran el análisis de un gran número de aislamientos, el uso de distintos métodos de *fingerprinting* genómico como rep-PCR, AFLP, ARDRA y 16S-23S rDNA IGS-RFLP, permiten la identificación de las cepas con un grado de clasificación taxonómica desde el nivel de cepa al de género (Laguerre *et al*, 1996, 1997; Doignon Boucier *et al*, 1999, 2000; Vinuesa *et al*, 1998; Willems *et al*, 2000; Zakhia *et al*, 2004; Gomes Germano *et al*, 2005; Wolde-meskel *et al*, 2004, 2005; Romdhane *et al*, 2006). Por esta razón, son generalmente los métodos elegidos para una rápida y confiable caracterización de aislamientos bacterianos.

Además, utilizando *Xanthomonas* como sistema modelo, se determinó que las técnicas de *fingerprinting* genómico como rep-PCR y AFLP revelan correctamente la relación genotípica y filogenética entre los organismos. Se observó una alta correlación entre las relaciones derivadas de las técnicas de *fingerprinting* y los valores

de homología DNA-DNA (Rademaker *et al*, 2000). Actualmente, la similitud DNA-DNA sigue siendo el criterio principal para el delineamiento de especies en bacteriología (Wayne *et al*, 1987; Stackebrandt *et al*, 2002).

OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis se centra en el estudio de la diversidad y las características de los rizobios asociados simbióticamente con leguminosas nativas que nodulan en tallo, y en particular, de los rizobios fotosintéticos.

Varias especies nativas de los géneros conocidos de leguminosas que nodulan en tallo, *Aeschynomene* y *Sesbania*, están presentes en la Argentina, pero los rizobios asociados a estas plantas no han sido estudiados.

Los objetivos son:

- Identificar las especies de rizobios asociados a especies nativas de *Aeschynomene* y *Sesbania*.
- Analizar la diversidad de los rizobios aislados mediante la caracterización genotípica y fenotípica de cepas representativas.
- Dentro de las características fenotípicas de los rizobios de *Aeschynomene*, evaluar la capacidad de producir bacterioclorofila y carotenos bajo distintas condiciones de crecimiento, principalmente en relación a la luz y a la tensión de oxígeno.
- Determinar el efecto de la tensión de oxígeno en la expresión del aparato fotosintético.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de los aislamientos

Se realizaron muestreos de plantas de *Aeschynomene* spp. y *Sesbania* spp. en distintas regiones del país entre los años 2000 y 2005, de acuerdo a la distribución geográfica de estas leguminosas (Zuloaga y Morrone, 1999). Ejemplares de plantas completas se procesaron como material de herbario para la confirmación de su especie.

Se colectaron las plantas con nódulos en tallo y/o raíz, se transportaron al laboratorio, y los nódulos se almacenaron en glicerol 30% a -20°C.

Los aislamientos se realizaron a partir de los nódulos por los métodos convencionales (Somasegaran y Hoben, 1994). Los nódulos se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en etanol 70° durante 3 minutos, en hipoclorito de sodio al 3% durante 3 a 5 minutos, y luego se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril. Cada nódulo se aplastó sobre una gota de agua estéril y la suspensión resultante se estrió sobre medio de cultivo agarizado en placas de Petri.

Los aislamientos de *Aeschynomene* spp. se realizaron en placas con medio YMA y los de *Sesbania* spp. en medio YLA. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias. Se obtuvieron cultivos puros de los aislamientos por al menos dos pasajes sucesivos de una colonia aislada en el mismo medio. Las cepas aisladas se crecieron en medios líquidos (YMB y TY para las cepas de *Aeschynomene* e YLB para las de *Sesbania*) y se almacenaron en medio de cultivo suplementado con 30% de glicerol a -80°C. (ver apéndice para la composición de los medios de cultivo).

Ensayos de nodulación

Con todos los aislamientos se realizaron ensayos de nodulación en las especies hospedadoras originales. Además, para los ensayos de especificidad de hospedador, los aislamientos de *Aeschynomene* spp. se inocularon en plantas de *A. indica*, *A. americana*, *A. rudis* y *A. denticulata*, los de *Sesbania virgata* en *S. rostrata*, *S. sesban*, *S. speciosa*, *S. punicea* y *A. rudis*, y los de *S. exasperata* en *S. virgata*, *S. rostrata*, *Phaseolus vulgaris* y *Macroptillum lathyroides*. Las semillas de *Aeschynomene* spp. y *Sesbania* spp. se escarificaron y esterilizaron superficialmente sumergiéndolas en H₂SO₄ 98% durante 30 minutos, y se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. Las semillas de *P. vulgaris* se desinfectaron superficialmente de igual forma que los

nódulos. En forma aséptica se pusieron en cámara húmeda por 2 o 3 días y luego de inocularlas, se transfirieron a tubos con medio Jensen sin nitrógeno modificado (ver apéndice). El inóculo provino de cultivos líquidos en YMB o YLB en fase exponencial. Las semillas germinadas se sumergieron unos minutos en el cultivo del inóculo y se transfirió una semilla a cada tubo para su desarrollo.

Las plantas crecieron en cámara de cultivo con condiciones ambientales controladas: ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 30°C. Para los ensayos de nodulación en tallo, las plantas se cultivaron en macetas con vermiculita estéril, regándolas según lo requirieran, con solución de Fahraeus con nitrógeno diluida al cuarto (ver apéndice). Luego de 10 días se inocularon pincelando los cultivos inóculo sobre el tallo, y se cultivaron en cámara por 20 días adicionales, cambiando el riego por solución de Fahraeus sin nitrógeno. En el caso de *Sesbania virgata*, parte de las plantas se mantuvieron inundadas antes y después de la inoculación.

A los 30 días se determinó la aparición de nódulos y se estimó la efectividad de la nodulación mediante observación visual del color del follaje y el vigor de las plantas con respecto a los controles sin inocular. Se cosecharon los nódulos de las raíces primarias y secundarias y de los tallos, y se almacenaron a -20°C en glicerol 30%. De algunos de los nódulos se realizaron aislamientos para confirmar que la cepa presente en los nódulos correspondía a la cepa inoculada. La identificación se realizó por BOX-PCR.

Caracterización genotípica de las cepas

Preparación de DNA

La extracción de DNA genómico total se realizó a partir de cultivos líquidos puros en medio TY (cepas de *Aeschynomene* spp.) o YLB (cepas de *Sesbania* spp.), originados de colonias aisladas en placas de YMA o YLA. Cada aislamiento se inoculó en 5 ml de medio líquido y se incubó a 28°C con agitación (300 rpm) por 3-6 días. La pureza de los cultivos se comprobó por crecimiento en placa y tinción de Gram.

Para la preparación de DNA se utilizó el protocolo estándar de CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) (Ausubel *et al*, 1994) o el kit comercial Wizard genomic DNA (Promega), en ambos casos se partió del *pellet* de 1,5 ml de cultivo.

La concentración y pureza del DNA obtenido se estimó midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm en un cuantificador RNA/DNA (Genequant, Pharmacia Biotech), y se ajustó la concentración a 50 ng/μl haciendo diluciones apropiadas. También se analizó la integridad del DNA aislado mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (ver apéndice). Las preparaciones de DNA se conservaron a 4°C hasta su uso.

rep-PCR

Los aislamientos se caracterizaron mediante rep-PCR con los *primers* BOXA1R, REP1R-I/REP2-I y ERIC1R/ERIC2 (ver apéndice).

El protocolo de rep-PCR utilizado es básicamente el descrito por Versalovic *et al* (1994), pero con algunas modificaciones surgidas de ensayos de optimización (detalladas en los párrafos que siguen). En la mezcla de reacción se disminuyó la concentración de MgCl₂, se aumentó la de *primers*, se agregó glicerol en lugar de seroalbúmina bovina (BSA), y se redujo la cantidad de DNA molde utilizado. En las condiciones de amplificación se aumentó el tiempo de *annealing* para dos de los *primers* utilizados y se disminuyó el número de ciclos de amplificación.

Los *primers* utilizados fueron sintetizados por DNAgency (Malvern, Pa) o Invitrogen. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 25 μl conteniendo: 2,5 μM de cada *primer*, 1,25 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 50 ng de DNA, 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa, DMSO 10% v/v, glicerol 5% v/v, Tris-HCl 67 mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, EDTA 6,7 μM, β-mercaptoetanol 30 mM y MgCl₂ 6,7 mM (REP-PCR y ERIC-PCR) o 5 mM (BOX-PCR).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (MJ Research PTC-100) con un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), *annealing* (REP 40°C, 2 min; ERIC 52°C 2 min; BOX 52°C, 1 min) y extensión (65°C, 8 min), y una extensión final a 65°C por 8 minutos.

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

Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% en buffer TBE. Se utilizaron geles de 20 x 24 cm en los

cuales se sembraron 6 μ l de muestra con 2 μ l de buffer de siembra (Ficoll[®]400 15%, azul de bromofenol 0,03%, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 50 mM). La corrida electroforética se realizó a 5 V/cm (constante) a temperatura ambiente durante 4,6 horas. En cada gel, en la calle central y en las de los extremos, se incluyeron los marcadores de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega) y Lambda DNA/*Hind*III Markers (Promega), o 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen), como referencias.

Las bandas se revelaron sumergiendo los geles en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,6 μ g/ml) por 30 minutos y luego se los lavó con agua milliQ por otros 30 minutos.

Los geles teñidos se observaron con un transiluminador de luz UV (Spectroline) y se fotografiaron usando una cámara Polaroid DS 34 y película Polaroid 667, o el sistema de documentación Kodak EDAS120.

Análisis de restricción del gen ribosomal 16S amplificado por PCR (ARDRA)

Para amplificar los genes 16S rRNA se utilizaron los *primers* fD1 y rD1 universales para eubacterias (Weisburg *et al*, 1991). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo: 50 ng de DNA, 5% de DMSO, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 μ M de cada *primer*, 1,25U de *Taq* DNA polimerasa y el buffer provisto con la enzima. El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94°C 1 min), *annealing* (57°C, 40 seg) y extensión (72 °C, 2 min), y una extensión final a 72°C por 8 min.

Los productos de PCR se purificaron con un kit comercial (QIAquick PCR purification columns, Quiagen), y alícuotas de 10 μ l se incubaron a 37°C por 2 horas con 5U de la enzima de restricción (*Ddel*, *Hha*I, *Hinf*I y *Msp*I o *Sau*3A1, Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa de alta resolución al 2% (agarosa MetaPhor[®]) de 10 cm de largo en buffer TBE. Se corrieron a 5V/cm durante 2,5 horas, incluyendo en la calle central y en las de ambos extremos de cada gel, el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega).

Análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA (IGS-RFLP)

Para amplificar la región intergénica 16S-23S rDNA se utilizaron los *primers* FGPS1490 y FGPS132' (Laguerre *et al*, 1996). Las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas para la amplificación del gen 16S rRNA, excepto la temperatura de *annealing* que fue de 55°C. Los productos de PCR obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción *Ddel*, *HaeIII*, *Hinfl* y *MspI* (Promega) y se analizaron del mismo modo que lo descrito para ARDRA.

Análisis de los *fingerprints*

Las imágenes digitales de los *fingerprints* se normalizaron con los marcadores de peso molecular utilizados como referencias, y se analizaron con el programa GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), según lo descrito por el fabricante.

Los *fingerprints* obtenidos por BOX-, ERIC- y REP-PCR se analizaron por separado y combinados en forma lineal como un único conjunto de datos. El grado de similitud entre los *fingerprints* se determinó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) y los dendrogramas se construyeron utilizando el método de pares de grupos con media aritmética (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973; Häne *et al*, 1993).

Los patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con las distintas enzimas, así como aquellos de la región intergénica 16S-23S rDNA, se combinaron linealmente para su comparación. Se utilizó el coeficiente de similitud de Dice (S_D) para la construcción de la matriz de similitud, y UPGMA para la obtención de los dendrogramas.

Para integrar la información filogenética provista por los *fingerprints* de rep-PCR y el análisis de restricción del 16S rDNA, éstos se combinaron en forma lineal y se analizaron utilizando r y UPGMA.

Análisis de secuencias del 16S rDNA

La determinación de la secuencia del gen ribosomal 16S de aislamientos representativos se realizó en MIDI Labs (Newark, USA). Para determinar las secuencias mas relacionadas a las obtenidas se realizó una búsqueda en la base de

datos GeneBank, utilizando el programa BLASTN 2.2.13 (Altschul *et al*, 1990) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Las secuencias determinadas y las de bacterias relacionadas obtenidas del GeneBank se alinearon utilizando el programa ClustalX (Thompson *et al*, 1997). Para el análisis filogenético de los aislamientos de *Aeschynomene* y *Sesbania* spp. se utilizaron 1388 ó 1370 posiciones de bases alineadas incluyendo *gaps*, respectivamente. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), a partir de una matriz de distancia obtenida utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura, y el análisis de confianza se realizó por análisis de *bootstrap* (1000 réplicas), utilizando los programas SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR y CONSENSE del paquete de inferencia filogenética (PHYLIP, versión 3.57c) (Felsenstein, 1995). Para la visualización de los árboles se utilizó el programa NJplot (Perrière y Gouy, 1996).

Determinación de actividad nitrogenasa en vida libre y crecimiento en medio de cultivo en N₂

En cepas representativas aisladas de nódulos de *Aeschynomene* spp. y *Sesbania* spp. se determinó la capacidad de crecer en medios de cultivo con N₂ como única fuente de nitrógeno. Para la determinación de la actividad nitrogenasa *ex planta* se utilizó medio de cultivo semisólido en viales, en los que se sembró, por punción, la cepa a evaluar. Para las cepas de *Sesbania* se utilizó el medio LO (Dreyfus *et al*, 1983) y en el caso de las cepas de *Aeschynomene*, los medios SA y SAG (Alazard, 1985) y el medio LO modificado descrito por Hungria *et al* (1993). Luego de 3 a 7 días de incubación a 28°C se evaluó el crecimiento bacteriano en los viales y se determinó la actividad nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno por cromatografía gaseosa. Para ello se reemplazó el 10% del volumen de la atmósfera de los viales por acetileno, y luego de 24 h de incubación a 28°C en oscuridad se determinó producción de etileno con un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890 serie II, con una columna Porapack 80/100 en el laboratorio de servicios analíticos especiales de la FAUBA. Para el aislamiento fotosintético de *Aeschynomene*, la actividad nitrogenasa se determinó en cultivos crecidos en oscuridad e incubados en oscuridad luego de la inyección de acetileno y en cultivos crecidos bajo ciclos luz/oscuridad e incubados en luz luego del agregado del acetileno.

Las cepas que mostraron actividad nitrogenasa *ex planta*, se cultivaron en medios líquidos en fermentador con N₂ como única fuente de nitrógeno, según las condiciones descritas para el crecimiento en cada género bacteriano (Dreyfus *et al* 1983; Alazard, 1985). En ambos casos la cepa se cultivó en aerobiosis en su medio respectivo con nitrógeno, y las células se lavaron 2 veces con medio sin nitrógeno antes de su inoculación en el fermentador. Se utilizaron diferentes mezclas de gases en los cultivos en fermentador: 3% O₂ para el rizobio de *S. virgata* y 0,5% O₂ para el de *Aeschynomene*, ambos en balance de N₂ 5.0 (mezclas preparadas por AGA S.A.). El crecimiento bacteriano se siguió mediante la lectura de la absorbancia del cultivo, a 570 nm en el caso de la cepa de *S. virgata*, y a 680 nm para la cepa de *Aeschynomene*. En esta última también se determinó la acumulación de BChl en células y membranas.

Determinación de la producción de pigmentos fotosintéticos y preparación de membranas

Se determinó la producción de pigmentos en todos los aislamientos de *Aeschynomene* spp.. Las cepas se crecieron en medio líquido MAG modificado (van Berkum *et al*, 1995) con agitación, a 28°C, durante 7 días, bajo ciclos luz/oscuridad (16h/8h) o en oscuridad o luz continua.

Se extrajeron los pigmentos de células enteras con una mezcla de acetona:metanol (7:2 v/v), y se determinaron las características de absorción de los pigmentos extraídos, en el rango de 350 nm a 900 nm en un espectrofotómetro (Schimadzu UV-VIS 1601 PC).

Alternativamente, las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con buffer Tris-HCl 5 mM pH 8, y se rompieron por sonicación en frío, con 4 ciclos de 15 segundos cada uno. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 2000 g por 10 minutos, el sobrenadante se colocó sobre sacarosa 50% en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, y se centrifugó a 100000 g durante 2 horas a 4°C. Se recuperaron las fracciones coloreadas producidas correspondientes a dos fracciones de membrana diferentes, denominadas H (*pellet*) y L (36-38% sacarosa), y se registró su espectro de absorción en el rango de 350 nm a 900 nm.

Cultivos bajo distintas condiciones de oxigenación

Para los estudios de crecimiento y expresión del aparato fotosintético bajo distintas tensiones de oxígeno, la cepa se cultivó por lote en un fermentador de 5L Bio Flo III (New Brunswick Scientific Co. Inc.) en medio MAG modificado. El cultivo se burbujeó continuamente con aire o con diferentes mezclas de N₂ y O₂ para alcanzar la concentración de oxígeno deseada. Las mezclas utilizadas fueron: O₂ 3% ± 0,06% en balance N₂ 5.0, y O₂ 0,5% ± 0,008%, balance N₂ 5.0 (mezclas AGA S.A.). La concentración de oxígeno disuelto (DO₂) se monitoreó continuamente con un electrodo de O₂ (Ingold, Mettler), que se calibró a 0% DO₂ en el medio de cultivo saturado con N₂ y a 100% DO₂ en el medio saturado con aire.

Los cultivos crecieron durante 4 días bajo ciclos de luz-oscuridad (16/8 horas) con una irradiancia de aproximadamente 35 μmol/m²s (1750 lux, medida en la superficie de la vasija).

De cada cultivo en fermentador se tomaron muestras para la determinación del contenido de BChl en las células y en las membranas, y para los experimentos de transferencia Northern. Además, durante el cultivo se evaluó el crecimiento mediante lecturas de absorbancia y se determinó el título final alcanzado por medio de recuento en placa de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

El contenido de BChl y proteínas en las células se determinaron en 10 ml del cultivo (por cuatuplicado). La preparación de membranas se realizó de igual modo que lo descrito anteriormente, y se determinó su contenido de BChl y proteínas.

Los experimentos para cada una las condiciones de oxigenación se realizaron por lo menos dos veces.

Purificación de los complejos fotosintéticos

Para la purificación de los complejos fotosintéticos, las membranas resuspendidas en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8 se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora con LDAO 1% (*lauryl dimethylamine N-oxide*), a una concentración final de 1 mg de LDAO por mg de proteína. La suspensión se centrifugó a 4500 g, y una capa del sobrenadante se centrifugó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (10-40% sacarosa en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, conteniendo 0,04% de LDAO) durante 16 horas a 100000 g a 4°C. Se recuperaron las fracciones coloreadas,

se lavaron en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, y se registró su espectro de absorción. El perfil proteico de las fracciones obtenidas se analizó mediante Tricina-SDS-PAGE (ver apéndice).

Determinación de bacterioclorofila y proteínas

Los pigmentos se extrajeron de células enteras o de membranas con una mezcla de acetona:metanol 7:2 (v/v), y la cantidad de bacterioclorofila total se determinó según lo descrito por Clayton (1966). La concentración de proteínas en el *pellet* extraído o en las membranas se determinó por el método de Lowry *et al* (1951), utilizando BSA como estándar.

Purificación de los polipéptidos antena

La purificación de estas proteínas se realizó según la metodología descrita por Tadros *et al* (1982). Las membranas liofilizadas se extrajeron 2 veces con una mezcla de cloroformo:metanol (1:1 v/v) conteniendo 0,1 M de acetato de amonio. Se centrifugaron por 5 minutos a 9000 g y el sobrenadante se sembró en una columna de Sephadex LH-60 equilibrada en el mismo sistema de solventes. La siembra y la corrida cromatográfica se realizaron a un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 2 ml y todas fueron analizadas para determinar el contenido de proteínas midiendo su absorbancia a 280 nm. El patrón proteico de las fracciones se analizó mediante Tricina-SDS-PAGE (ver apéndice).

Electroforesis de proteínas en geles mono y bidimensionales

Los perfiles proteicos de las membranas y las fracciones purificadas a partir de éstas se analizaron por electroforesis en geles disociantes (Tricina-SDS-PAGE) (Schägger y von Jagow, 1987). Las muestras se prepararon diluyéndolas con buffer de siembra (ver apéndice) y se sembraron en geles de poliacrilamida de 20 cm de largo y 1 mm de espesor. La corrida electroforética se hizo en un equipo Protean II (BIO RAD) a 22 mA constante durante 17 horas.

Las proteínas se revelaron por métodos estándar de tinción con nitrato de plata o con azul de Coomassie (ver apéndice).

Para determinar la pureza de la fracción conteniendo los polipéptidos antena se realizaron corridas electroforéticas en geles con gradiente de pH en condiciones de no equilibrio (NEPHGE: *nonequilibrium pH gradient electrophoresis*) (O'Farrell *et al*, 1977). Fue necesario realizar modificaciones en los protocolos descritos debido a la naturaleza de las proteínas analizadas (bajo peso molecular, hidrofólicas, alto punto isoeléctrico para una de ellas). A las muestras resuspendidas en buffer de siembra se les agregó el doble de su volumen de buffer Cuanf (ver apéndice) y se corrieron en la primera dimensión en tubos capilares con un rango de pH de 3 a 10, durante 1,5 h a 400 V. La electroforesis de la segunda dimensión se hizo en geles de 10 cm de largo (Tricina-SDS-PAGE, equipo Mini Protean II, BIO RAD), corridos a 150 V durante 1,5 horas. Para revelar las proteínas los geles se tiñeron alternativamente con nitrato de plata o con azul de Coomassie.

Para el análisis de la secuencia de los polipéptidos antena purificados, éstos se separaron mediante Tricina-SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon P^{SO}, Millipore) con buffer de transferencia (ver apéndice) a 2 mA/cm². Luego de revelar los polipéptidos en la membrana con AmidoBlack 10B, se recortaron las bandas correspondientes y se enviaron a un laboratorio de secuenciación (TopLab Proteomics-Division, Alemania) para la determinación de su secuencia aminoacídica.

Ensayos de fotofosforilación en cromatóforos

Se determinó la velocidad de síntesis de ATP inducida por la luz mediante la medición de la incorporación de fósforo radiactivo (³²Pi) a ADP para formar ATP (γ ³²P-ATP) en una suspensión de cromatóforos (membranas L) bajo iluminación continua a 30°C. Para iluminar se utilizaron 3 lámparas reflectoras de 150W ubicadas a 15 cm de los tubos con las mezclas de reacción. La velocidad de fotofosforilación se determinó a partir de una curva de tiempo con 6 puntos experimentales. La incorporación de ³²P se midió luego de detener la reacción con una solución ácida de molibdato de amonio y trietilamina (Sugino y Miyoshi, 1964).

La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: tricina 29 mM, acetato de magnesio 3,6 mM, fosfato de potasio 2 mM, ADP 0,2 mM, glucosa 18 mM, hexoquinasa 0,1 mg/ml, y ³²Pi 1x10⁶ cpm (pH 8). Un mililitro de la mezcla de reacción

se incubó con membrana equivalente a 1 mg de proteína, por distintos tiempos en presencia de luz y con el agregado o no del mediador redox artificial metasulfato de fenazina (PMS). La reacción se detuvo por el agregado de reactivo de trietilamina (ver apéndice) para precipitar cuantitativamente el fosfato y separarlo del fosfato orgánico que permaneció en solución. Luego de centrifugar, se determinó la cantidad de radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido Pharmacia Wallac 1214 Rackbeta (Gould *et al*, 1972).

Para estudiar la dependencia de la fotofosforilación al oxígeno, se realizó el mismo ensayo pero en condiciones de anaerobiosis. Para alcanzar esta condición se agregó succinato 20mM a la suspensión de cromatóforos en la mezcla de reacción sin ^{32}Pi , se cubrió la superficie de la mezcla en el tubo con parafina líquida y se incubó en oscuridad por 30 minutos antes del agregado del ^{32}Pi a la mezcla de reacción. Esta mezcla se vuelve fácilmente anaeróbica debido al consumo de oxígeno por respiración de las membranas. Luego se agregó el ^{32}Pi y se procedió de igual forma que lo descrito mas arriba.

Efecto de la iluminación con luz roja o rojo lejano en la expresión del aparato fotosintético

La cepa se inoculó en forma homogénea en 4 placas de Petri conteniendo medio MAG agarizado (40% de su volumen) y se cerraron con Parafilm. Cada placa se incubó a 30°C durante 7 días bajo diferentes condiciones de iluminación: iluminación continua con luz monocromática de 660 nm o de 760 nm (irradiancia: 6,6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ medida en la superficie de las placas de Petri), oscuridad o ciclos luz/oscuridad (1750 lux).

Para la iluminación con luz monocromática se utilizaron LEDs (*Ligth emmiting diodes*, LED750 y LED660, Roithner Lasertechnik, Viena, Austria). Se determinó el espectro de emisión, la longitud de onda de máxima emisión y la irradiancia de ambos LEDs con un espectrorradiómetro. El máximo de emisión no correspondió exactamente al informado en las especificaciones técnicas del producto. El máximo de emisión para el LED660 fue 665 nm y para el LED750, 760 nm. El ancho de banda con respecto al máximo de emisión fue menor a 25 nm en ambos casos.

Se recolectaron las células de la zona iluminada, se extrajeron los pigmentos con acetona:metanol (7:2 v/v), y se determinó el espectro de absorción del extracto, la cantidad de bacterioclorofila y la de proteínas en las células extraídas.

Experimentos de transferencia Northern

Para la extracción de RNA, los cultivos de la cepa crecidos en fermentador bajo diferentes condiciones de oxigenación e iluminación, se cosecharon por centrifugación a 4°C, los *pellets* se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Las preparaciones de RNA total se realizaron a partir de 50 ml de cultivo, según el protocolo de extracción con fenol caliente (Ausubel *et al*, 1994) con las siguientes modificaciones: se resuspendió el *pellet* en 2 ml de buffer TE conteniendo lisozima (2 mg/ml), se agitó con vortex y se dividió en 4 microtubos de 1,5 ml. A cada tubo se le agregó 50 µl de SDS 10%, se agitó con vortex y se incubó en baño de agua a 64°C por 2 min. Luego se agregaron 5,5 µl de NaAcO 1M pH 5,2 y 500 µl de fenol ácido. Se mezcló con vortex y se incubó durante 6 min a 64°C con agitación. Se incubaron los tubos en hielo por 3 minutos, luego de lo cual se centrifugaron por 10 minutos a 15000 g a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción con fenol. Nuevamente la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le agregó igual volumen de cloroformo. Se centrifugó por 10 min a 15000 g a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Luego se agregaron 1/10 volúmenes de NaAcO 3M, 1mM EDTA pH 8, y 2,5 volúmenes de etanol 100° para precipitar el RNA a -80°C durante al menos una noche. Luego se centrifugó la preparación durante 25 minutos a 15000 g a 4°C y los 4 *pellets* correspondientes a cada cultivo se juntaron en 1 tubo y se lavó con 1 ml de etanol 70°. El *pellet* obtenido se dejó secar al aire por 10-15 minutos, se resuspendió en H₂O libre de RNasas y se almacenó a -80°C.

En todas las muestras se midieron los valores de absorbancia a 260 nm y a 280 nm, para determinar la cantidad y calidad del RNA extraído, mediante los valores de A₂₆₀ y la relación A₂₆₀/A₂₈₀, respectivamente.

A cada muestra (10 µg) se le agregó igual volumen de buffer de siembra para RNA (ver apéndice) y sembraron en geles de agarosa-formaldehído de 10 cm de largo (ver apéndice). La corrida electroforética se hizo a 2 V/cm durante 12 horas. En los geles se incluyó el estándar 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen).

Luego de la corrida electroforética los geles se lavaron 4 veces con H₂O milliQ durante 15 minutos cada vez, se sumergieron en NaOH 50 mM durante 30 minutos, y luego en Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 durante 20 minutos. Finalmente se sumergieron en SSC 10X (ver apéndice) por 20-30 minutos y se los transfirió durante una noche a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham).

Las membranas con el RNA transferido se incubaron a 80°C durante 2 horas, y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su hibridización y revelado.

Las sondas se obtuvieron por PCR a partir de DNA genómico de la cepa C7T1 utilizando los *primers* pufBf-pufAr (sonda BA), pufLf-pufMr (sonda LM) y Y1/Y2 (sonda 16S rDNA) (ver apéndice). Se purificaron con un kit comercial (QIAquick PCR purification kit, Quiagen) y 25 ng de cada sonda se marcaron con [α -³²P]dCTP utilizando el kit *Random primers DNA Labelling system* (Invitrogen).

Las membranas se incubaron en solución de prehibridización/hibridización (NorthernMax™ Prehyb/Hyb Buffer, Ambion) a 42°C por 2 h, luego de lo cual se agregó la sonda marcada y se incubó en un horno de hibridización a 42°C durante toda la noche. Luego las membranas se lavaron 2 veces durante 15 min con SSC 2X con SDS 0,1% a temperatura ambiente, y 2 veces más a 55°C. Las membranas se revelaron a distintos tiempos por autorradiografía (placas AGFA ORTHO CP-G plus).

Detección de genes por PCR y análisis de secuencia de los productos amplificados

Los genes de la antena *pufB* y *pufA* de la cepa C7T1 se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico con los *primers* pufBf y pufAr.

En los bradyrizobios fotosintéticos, para la detección del gen *ppsR2* se utilizaron los *primers* ppsR2F y ppsR2R, complementarios a las regiones 1011-1029 y 1352-1371 del gen *ppsR2* de *Bradyrhizobium* sp. ORS278, respectivamente. Para la detección del gen bacteriofitoromo se utilizaron *primers* complementarios al dominio de unión al cromóforo del gen *bphP* de la cepa ORS278 (*primers* CBDf y CBDr).

En las cepas aisladas de *Sesbania* se amplificó el gen *nifH* con los *primers* nifH1 y nifH2 (Eardly *et al*, 1992).

En todos los casos se utilizaron condiciones de amplificación estándar teniendo en cuenta el tamaño del producto de amplificación esperado y las distintas temperaturas de *annealing* para cada par de *primers*.

Los productos de PCR se purificaron con un kit comercial (QIAquick PCR purification columns, Quiagen) y se secuenciaron ambas cadenas mediante el método de Sanger en un secuenciador de DNA automático ABI 373A (servicio de secuenciación automática de ADN-IBBM, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

Perfil de utilización de sustratos carbonados

La caracterización metabólica de los aislamientos de *Sesbania* se realizó en cepas representativas de cada grupo de rep-PCR y la cepa de referencia de *A. caulinodans* ORS571. Se utilizaron microplacas BIOLOG GN2™, que poseen 95 fuentes de carbono diferentes.

Las cepas se cultivaron en placas con medio YLA durante 2 días a 30°C. Las colonias se resuspendieron en NaCl 0,5% y se ajustó la absorbancia (590nm) a 0,19. Para cada cepa se utilizaron 1 ó 2 microplacas en las que se sembraron 150 µl de la suspensión por pocillo, se incubaron a 30°C y se determinó la A_{590} en un lector de microplacas (Thermo MultiskanEX) a las 24, 48 y 72 horas.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas

La capacidad de crecer en anaerobiosis en presencia de nitratos se determinó en medio YMB suplementado con 10 mM de KNO_3 .

Para los ensayos de crecimiento a distintas temperaturas, pH y concentración salina se utilizaron los medios YLA e YMA. Se realizaron las distintas combinaciones posibles entre pH y concentración salina ajustando el pH del medio a pH 9 o pH 10, y el agregado de 1% a 4% de NaCl.

La actividad ureasa se determinó utilizando medio base de agar urea (Christensen). La capacidad de degradar almidón se realizó en medio TY con el agregado de 1% de almidón soluble.

La resistencia a antibióticos se determinó en medio TY (ácido nalidíxico 40 µg/ml, kanamicina 10 µg/ml y espectinomicina 5 µg/ml).

Análisis del perfil de plásmidos

Se determinó el perfil de plásmidos de cepas representativas de los rizobios de *S. exasperata* mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa según el método descrito por Plazinski *et al* (1985), excepto que la electroforesis se realizó a 2V/cm durante 90 min, a 3V/cm durante 60 min y a 6V/cm durante 3,5 horas.

Apéndice

MEDIOS DE CULTIVO (composición por litro)

YMB-YMA

| | |
|--|--------|
| Manitol | 10 g |
| K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 0,66 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g |
| Extracto de levadura | 0,5 g |
| Agar (solo para YMA) | 15 g |
| pH 6,8 | |

YLB-YLA

| | |
|--|---------|
| K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 0,66 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 0,1 g |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,006 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Acido nicotínico | 0,02 g |
| Lactato de sodio | 10 g |
| Agar (solo para YLA) | 15 g |
| pH 6,8 | |

MAG modificado

| | |
|--|--------|
| HEPES | 1,3 g |
| MES | 1,1 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Glutamato de sodio | 1,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,22 g |
| Na ₂ SO ₄ | 0,25 g |
| NH ₄ Cl 16% | 2 ml |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O 0,67% | 1 ml |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O 1,5% | 1 ml |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O 18% | 1 ml |
| NaMoO ₄ ·2H ₂ O 1% | 1 ml |
| NiCl ₂ 1,2% | 0,1 ml |
| Agar (para medio sólido) | 15 g |
| pH 6,6 | |

TY

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Triptona | 5 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1 g |
| pH 6,8-7,2 | |

LO

| | |
|--|--------|
| Lactato de sodio | 10 g |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 1,67 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,87 g |
| NaCl | 0,05 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 40 mg |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 4 mg |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 5 mg |
| Biotina | 10 mg |
| Acido nicotínico | 20 mg |
| Acido pantotético | 10 mg |
| pH 6,8 | |

SA-SAG

| | |
|--|---------|
| D-arabinosa | 6 g |
| Succinato de sodio | 11 g |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,8 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,04 g |
| NaCl | 0,05 g |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 4 mg |
| NaMoO ₄ | 10 mg |
| ZnSO ₄ | 0,22 mg |
| MnSO ₄ | 3 mg |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,08 mg |
| Solución de vitaminas | 1 ml |
| Glutamato de sodio (solo para SAG) | 0,5 g |
| pH 6,8 | |

Solución de vitaminas (constituyentes por litro)

| | |
|------------------------|---------|
| Colina | 550 mg |
| Tiamina | 165 mg |
| Acido nicotínico | 1200 mg |
| Pantotenato de sodio | 630 mg |
| Biotina | 600 mg |
| Acido p-amino benzoico | 160 mg |
| Meso-inositol | 600 mg |
| Vitamina B12 | 40 mg |
| Riboflavina | 100 mg |

SOLUCIONES NUTRITIVAS PARA PLANTAS

Medio Jensen sin nitrógeno modificado (constituyentes por litro)

| | |
|--------------------------------------|-------|
| CaHPO ₄ | 1 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g |

| | |
|--------------------------------------|-------|
| NaCl | 0,2 g |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0,1 g |
| Solución de micronutrientes | 1 ml |
| Agar | 7 g |

Solución de Fahraeus (constituyentes por litro)

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,132 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,12 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,12 g |
| Solución de Fe-EDTA | 10 ml |
| Solución de micronutrientes | 2 ml |
| KNO ₃ | 1 g (solo para solución con N) |

Solución Fe-EDTA

| | |
|--------------------------------------|---------|
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,075 g |
| EDTA-Na ₂ | 0,2 g |
| H ₂ O c.s.p. | 250 ml |

Solución de micronutrientes (constituyentes por litro)

| | |
|---|--------|
| H ₃ BO ₄ | 2,86 g |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 2,03 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,22 g |
| CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0,08 g |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,14 g |
| CoSO ₄ .7H ₂ O | 0,05 g |

BUFFER TBE

| | |
|--|---------|
| Tris base | 10,8 g |
| Acido bórico | 5,5 g |
| EDTA 0,5 M pH 8 | 4 ml |
| H ₂ O milliQ c.s.p. pH 8,3 | 1000 ml |

EDTA 0,5 M pH 8

| | |
|--|---------|
| EDTA-Na ₂ | 18,61 g |
| NaOH | < 2 g |
| H ₂ O milliQ c.s.p. pH 8 | 100 ml |

BUFFER TE

| | |
|----------|-------------|
| Tris-HCl | 10 mM, pH 8 |
| EDTA | 1 mM |

BUFFER DE SIEMBRA PARA MUESTRAS PROTEICAS (4X)

| | |
|------------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8 | 50 mM |
| Azul de bromofenol | 0,01% |
| Glicerol | 12% |
| SDS | 4% |
| β mercaptoetanol | 2% |

TRICINA-SDS-PAGE

| | Gel 16% | Sobrecapa 10% | Stacking |
|------------------|-------------|---------------|-------------|
| Solución B | 8,5 ml | 1,7 ml | 1,2 ml |
| Buffer gel | 8,5 ml | 2 ml | 3,72 ml |
| Glicerol | 3,5 ml | - | - |
| H ₂ O | 4,5 ml | 2,3 ml | 10 ml |
| APS 10% | 120 μ l | 30 μ l | 120 μ l |
| TEMED | 12 μ l | 3 μ l | 12 μ l |

Buffer gel

3M Tris-HCl pH 8,45
0,3% SDS

Solución B (49,5T+6C)

46,5% acrilamida
3% bisacrilamida

Buffer ánodo

0,04 M Tris-HCl pH 8,9

Buffer cátodo

0,02 M Tris-HCl pH 8,25
0,02 M Tricina
0,02% SDS

TINCION DE PROTEINAS CON NITRATO DE PLATA

Preparar todas las soluciones en el momento de usar con H₂O milliQ

Solución A

Nitrato de plata 1,6 g/8 ml H₂O milliQ

Solución B

| | |
|--------------------------------|-------------|
| NaOH 10 N | 378 μ l |
| NH ₄ OH 14,8 M | 2,8 ml |
| H ₂ O milliQ c.s.p. | 44,8 ml |

Solución C

Agregar gota a gota la solución A a la solución B en agitación constante. Si se pone turbio agregar NH₄OH. Llevar con H₂O milliQ a 200 ml

Solución D

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| Acido cítrico 1% | 1,25 ml |
| Formaldehído 37% | 125 μ l |
| Llevar con H ₂ O milliQ a | 250 ml |

Solución decolorante

Metanol 50%
Acido acético 10%
Glicerol 5%

Procedimiento:

- 1) Poner el gel en metanol 50% con agitación durante 1 hora
- 2) Teñir 15 minutos con solución C, con agitación suave
- 3) Lavar 3 veces, 5 minutos cada vez, con H₂O milliQ
- 4) Agregar solución D hasta que aparezcan las bandas
- 5) Detener la reacción con solución decolorante

AZUL DE COOMASSIE CBB R-250 PARA TINCION DE PROTEINAS

| | |
|---------------|--------|
| CBB R-250 | 0,125% |
| Metanol | 50% |
| Acido acético | 0,5% |

NEPHGE (ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL)

Buffer Cuanf

2,7 g urea
200 μ l anfolitos 5/8 (BIO-RAD)
50 μ l anfolitos 3/10 (BIO-RAD)
0,5 g CHAPS
H₂O c.s.p. 5 ml

Buffers (electroforesis 1º dimensión)

Anodo: 10 mM H₃PO₄

Cátodo: 20 mM NaOH

BUFFER DE TRANSFERENCIA

192 mM glicina
25 mM Tris
0,1% SDS
20% metanol
pH 8,3

SOLUCION AMIDO BLACK 10B PARA TINCION

0.1% amido black
25% 2-propanol
10% ácido acético

Solución para destañir

5% 2-propanol
10% ácido acético

REACTIVO DE TRIETILAMINA

(Preparar el reactivo 1 hora antes de utilizarlo)

| | |
|---------------------|-------|
| Molibdato de amonio | 1 g |
| Agua destilada | 94 ml |
| HCl concentrado | 4 ml |
| Trietilamina | 1 ml |

GEL AGAROSA-FORMALDEHIDO

Agarosa 1% en buffer MOPS 1X
Formaldehído 6,7%

BUFFER DE SIEMBRA 2X PARA MUESTRAS DE RNA

Buffer MOPS 1X
Formaldehído 6,7%
Formamida 50%
Bromuro de etidio 1 mg/ml

SSC 20X

3 M NaCl
0,3 M acetato de sodio
pH 7

BUFFER DE CORRIDA MOPS 10X

0,4 M MOPS, pH 7
0,1 M acetato de sodio
0,01 M EDTA

PRIMERS

| Denominación | Secuencia (5' a 3') | Temperatura de <i>annealing</i> |
|--------------|--------------------------|---------------------------------|
| BOXA1 | CTACGGCAAGGCGACGCTGACG | 52°C |
| REP1R-I | IIICGICGICATCIGGC | 40°C |
| REP2-I | ICGICTTATCIGGCCTAC | 40°C |
| ERIC1R | ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC | 52°C |
| ERIC2 | AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG | 52°C |
| fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 57°C |
| rD1 | AAGGAGGTGATCCAGCC | 57°C |
| FGPS1490 | TGCGGCTGGATCACCTCCTT | 55°C |
| FGPS132' | CCGGGTTTCCCATTTCGG | 55°C |
| pufBf | TCATGACGAGCTTTGTGGTC | 60°C |
| pufAr | GTGCTGAGCAGGATGAAGTG | 60°C |
| Y1 | TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC | 62°C |
| Y2 | CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT | 62°C |
| ppsR2f | CGAGACGGAGGTCGAGATT | 60°C |
| ppsR2r | CTAGCTCCCCTTTTCGGTTT | 60°C |
| nifH1 | AAGTGCGTGGAGTCCGGTGG | 65°C |
| nifH2 | GTTCCGGCAAGCATCTGCTCG | 65°C |
| CBDf | TCATGGTCTATCGCTTCGAC | 60°C |
| CBDr | ATGTCGAACGGCACGAAG | 60°C |

RESULTADOS

Obtención de rizobios simbios de especies nativas de *Aeschynomene* y *Sesbania*

Los lugares de muestreo abarcaron principalmente regiones subtropicales del noreste y noroeste argentino (provincias de Formosa, Chaco, Corrientes y Salta). Las especies nativas con mayor abundancia encontradas en la región noreste fueron *Aeschynomene rudis* Benth., *Aeschynomene denticulata* Rudd y *Sesbania virgata* (Cav.) Pers, y en la región noroeste *Sesbania exasperata* Kunth. Las especies de *Sesbania* se encontraron en varios de los sitios de muestreo pero no siempre con nódulos. La identificación de las especies fue realizada por la Dra. Edith Gomez-Sosa del Instituto de Botánica Darwinion y por la Ing. Agr. Renné Fortunato del Instituto de Recursos Filogenéticos del CNIA-INTA.

Se obtuvo una colección de rizobios nativos que se caracterizaron fenotípica y genotípicamente, y se mantienen adecuadamente conservados (49 aislamientos de *A. rudis*, 29 aislamientos de *A. denticulata*, 14 aislamientos de *S. virgata* y 15 aislamientos de *S. exasperata*). Con esta colección se hicieron ensayos de nodulación en el hospedador original y en distintas leguminosas, para determinar el rango de hospedador y corroborar el tipo de nodulación y los grupos de inoculación cruzada descritos en *Aeschynomene*.

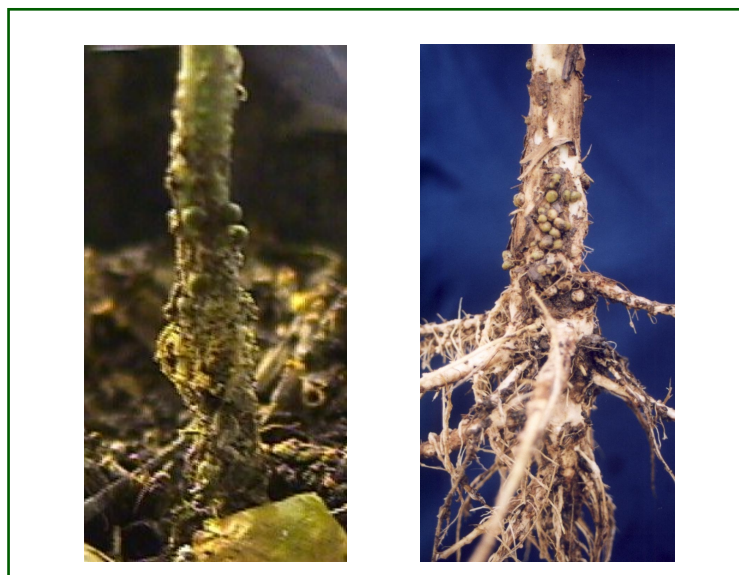


FOTO 1. Nódulos en tallo de leguminosas nativas: *Aeschynomene rudis* (izquierda) y *Sesbania virgata* (derecha)

Ensayos de nodulación

Todas las cepas nodularon efectivamente la especie vegetal de la cual fueron aisladas.

Las cepas aisladas de *Aeschynomene rudis* y *A. denticulata* nodularon también *A. indica* (grupo 2) pero no *A. americana* (grupo 1), confirmando así los grupos de inoculación cruzada descritos en *Aeschynomene*. Independientemente del tipo de nódulo del cual fueron aisladas (nódulo de tallo o raíz), todas las cepas aisladas de *Aeschynomene* fueron capaces de nodular tanto el tallo como la raíz de las plantas.

En las condiciones de ensayo en cámara de cultivo, la nodulación en tallo en plantas de *Sesbania virgata* solo ocurrió y en su zona mas baja, si el tallo estuvo permanente o temporalmente sumergido en agua. En esta especie la inundación es un prerrequisito para la nodulación en tallo. Según los resultados de los ensayos de nodulación se deduce que *S. virgata* pertenece al grupo III de las leguminosas que nodulan en tallo. En *S. exasperata* el tipo de nodulación fue similar al observado en *S. virgata*, por lo cual pertenece al mismo grupo. Esta clasificación indica el tipo de nodulación de la leguminosa, *S. virgata* y *S. exasperata* no pertenecen al mismo grupo de inoculación cruzada porque los aislamientos de *S. exasperata* no nodulan *S. virgata* y viceversa.

Todas las cepas aisladas de *S. virgata* nodularon *S. punicea*, otra especie nativa, pero no *S. sesban*, *S. speciosa* ni *A. rudis*. La nodulación de las cepas en *S. rostrata* fue intermitente, es decir que para una misma cepa en algunos ensayos se observó nodulación y en otros no. En los casos en que la nodulación fue positiva los nódulos tenían actividad nitrogenasa. Esto indicaría que la interacción entre los rizobios de *S. virgata* y las plantas de *S. rostrata* no siempre es efectiva. Por otro lado la cepa *Azorhizobium caulinodans* ORS571^T no noduló *S. virgata*.

Las cepas aisladas de *Sesbania exasperata* no nodularon *S. virgata*, *S. punicea*, *Macroptillum lathyroides* ni *Phaseolus vulgaris*, pero sí *S. rostrata*.

RIZOBIOS AISLADOS DE NODULOS DE *Aeschynomene*

En la **Tabla 1** se describe el origen de los aislamientos y las características en la producción de pigmentos fotosintéticos.

TABLA 1. Origen de los aislamientos y resumen de algunas características fenotípicas.

| Cepa ^a | Planta/ tipo de nódulo | Origen geográfico | Síntesis de bacterioclorofila | | Pigmentación |
|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------|--------------|
| | | | Luz/oscuridad | oscuridad | |
| C1R1 | <i>A. rudis</i> /raíz | Cañada Doce-Formosa | + | + | naranja |
| C1T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | + | rosa oscuro |
| C1T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C1T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C1T4 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C2T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C2T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C3R1 | <i>A. rudis</i> /raíz | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C3T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C4T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C4T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | + | rosa claro |
| C5T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C6T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | + | naranja |
| C6T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | + | naranja |
| C6T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C6T4 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C6T5 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C6T6 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C6T7 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C7R1 | <i>A. rudis</i> /raíz | Cañada Doce-Formosa | + | + | rosa claro |
| C7T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | + | naranja |
| C8T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C8T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C10T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C11T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | - | rosa claro |
| C12T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Cañada Doce-Formosa | + | + | naranja |
| V1T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V1T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V1T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V1T4 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V1T5 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |

TABLA 1. (continuación)

| Cepa ^a | Planta/tipo de nódulo | Origen geográfico | Síntesis de bacterioclorofila | | Pigmentación |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|--------------|
| | | | Luz/oscuridad | oscuridad | |
| V2T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V2T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V3T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| V3T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Mayor Villafañe-Formosa | + | - | rosa claro |
| G1T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | - | - | blanca |
| G1T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | - | - | blanca |
| G2T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | - | rosa claro |
| G3T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | - | rosa claro |
| G4T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | - | rosa claro |
| G4T3 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | - | rosa claro |
| G5T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | + | naranja |
| G6T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | - | rosa claro |
| G6T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Guaycolec-Formosa | + | - | rosa claro |
| CV1T1 | <i>A. rudis</i> /tallo | Colonia Varela/Chaco | + | - | rosa claro |
| CV1T2 | <i>A. rudis</i> /tallo | Colonia Varela/Chaco | + | - | rosa claro |
| 1.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Sapucay-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 2.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | La Cambocita-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 2.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | La Cambocita-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 2.3Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | La Cambocita-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 3.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Vecindad-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 3.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Vecindad-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 3.3Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Vecindad-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 3.4Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Vecindad-Corrientes | + | + | naranja |
| 3.5Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Vecindad-Corrientes | + | + | naranja |
| 3.6Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Vecindad-Corrientes | + | + | naranja |
| 4.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Herliztka-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 4.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Herliztka-Corrientes | + | + | naranja |
| 4.3Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Herliztka-Corrientes | + | + | naranja |
| 4.4Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Herliztka-Corrientes | + | + | naranja |
| 5.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | San Isidro-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 5.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | San Isidro-Corrientes | + | + | rosa oscuro |
| 5.3Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | San Isidro-Corrientes | + | + | naranja |
| 5.4Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | San Isidro-Corrientes | + | + | naranja |
| 5.5Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | San Isidro-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 6.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Ea. Nueva Valencia-Corrientes | + | + | naranja |
| 6.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Ea. Nueva Valencia-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 6.3Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Ea. Nueva Valencia-Corrientes | + | + | naranja |
| 7.1Ar | <i>A. rudis</i> /tallo | Ea. Nueva Valencia-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 7.2Ar | <i>A. rudis</i> /tallo | Ea. Nueva Valencia-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 7.3Ar | <i>A. rudis</i> /tallo | Ea. Nueva Valencia-Corrientes | + | + | naranja |
| 9.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | EEA INTA Corrientes | + | + | naranja |
| 10.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Salados 4 bocas-Corrientes | + | + | naranja |
| 10.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Salados 4 bocas-Corrientes | + | - | rosa claro |
| 11.1Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Parque nacional Mburucuya | + | - | rosa claro |
| 11.2Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Parque nacional Mburucuya | + | - | rosa claro |
| 11.3Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Parque nacional Mburucuya | + | - | rosa claro |
| 11.4Ad | <i>A. denticulata</i> /tallo | Parque nacional Mburucuya | + | - | rosa claro |

^a Los números en la designación de las cepas se refieren a la identificación de la planta y a la de nódulo del que fueron aisladas

Pigmentos fotosintéticos y características de las membranas

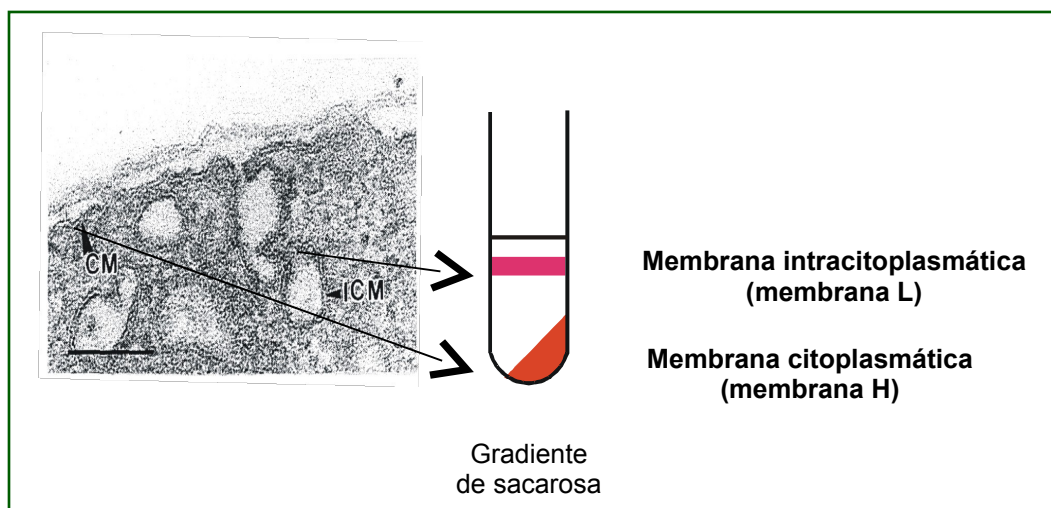
Se analizó la producción de bacterioclorofila y carotenos en cepas aisladas de nódulos de tallo y raíz de *Aeschynomene* spp., bajo diferentes condiciones de iluminación. Excepto dos cepas, todos los aislamientos produjeron cultivos coloreados en medio MAG modificado (rosados o anaranjados) cuando crecieron bajo ciclos de luz/oscuridad, que indica la presencia de pigmentos (**Foto 2**). La acumulación de pigmentos fotosintéticos se confirmó mediante la determinación del espectro de absorción de extractos en acetona:metanol de células enteras provenientes de un cultivo líquido. En algunas cepas también se observó acumulación de pigmentos en la oscuridad (**Tabla 1**).

La **figura 5** muestra los dos tipos de espectros obtenidos, que indican la presencia de bacterioclorofila *a* (BChl *a*) y diferentes tipos de carotenos. Pueden distinguirse dos grupos de pigmentación entre las cepas. La cepas que en cultivo presentan color naranja o rosa oscuro, producen cantaxantina como pigmento principal (cepas tipo 1), y las cepas color rosa claro producen espiriloxantina (cepas tipo 2) (**Figura 5, a y b** respectivamente)



FOTO 2. Cultivos líquidos puros de cepas fotosintéticas de *Aeschynomene*. Cultivos en medio MAG modificado crecidos bajo ciclos luz/oscuridad. Cepa tipo 1 (izquierda) y cepa tipo 2 (derecha).

La acumulación de pigmentos también se determinó en membranas purificadas. Luego de la ruptura de las células y posterior ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, se obtuvieron dos tipos de fracciones de membrana. Las membranas más livianas, denominadas L, localizadas a un 36-38% de sacarosa corresponden a las membranas intracitoplasmáticas o cromatóforos, y la fracción más pesada en forma de *pellet*, corresponde a las membranas citoplasmáticas denominadas H (ver esquema).



El espectro de absorción de la membrana L purificada muestra la presencia de dos picos de absorción centrados en 800 nm y 870 nm, característicos del complejo antena 1 o LH1 (**Figura 5, c**). En acetona:metanol el pico cambia a 770 nm, confirmando así la presencia de BChl *a*.

Si bien ambos tipos de membranas contienen pigmentos fotosintéticos, en las cepas tipo 1 la membrana H está enriquecida en cantaxantina, la membrana L en BChl y espiriloxantina, y en esta última la cantaxantina no es detectable. (**Figura 5, d**). En este tipo de cepas, si bien no hay acumulación de bacterioclorofila cuando crecen bajo condiciones de iluminación continua, sí se observa la acumulación de carotenos (**Figura 5, e**). En las cepas tipo 2, no se detectó acumulación de carotenos ni BChl si estuvieron expuestas a luz continua durante su crecimiento. Otra característica de todas las cepas que producen cantaxantina, es la acumulación de pigmentos fotosintéticos en oscuridad continua, propiedad que no poseen la mayoría de las cepas tipo 2.

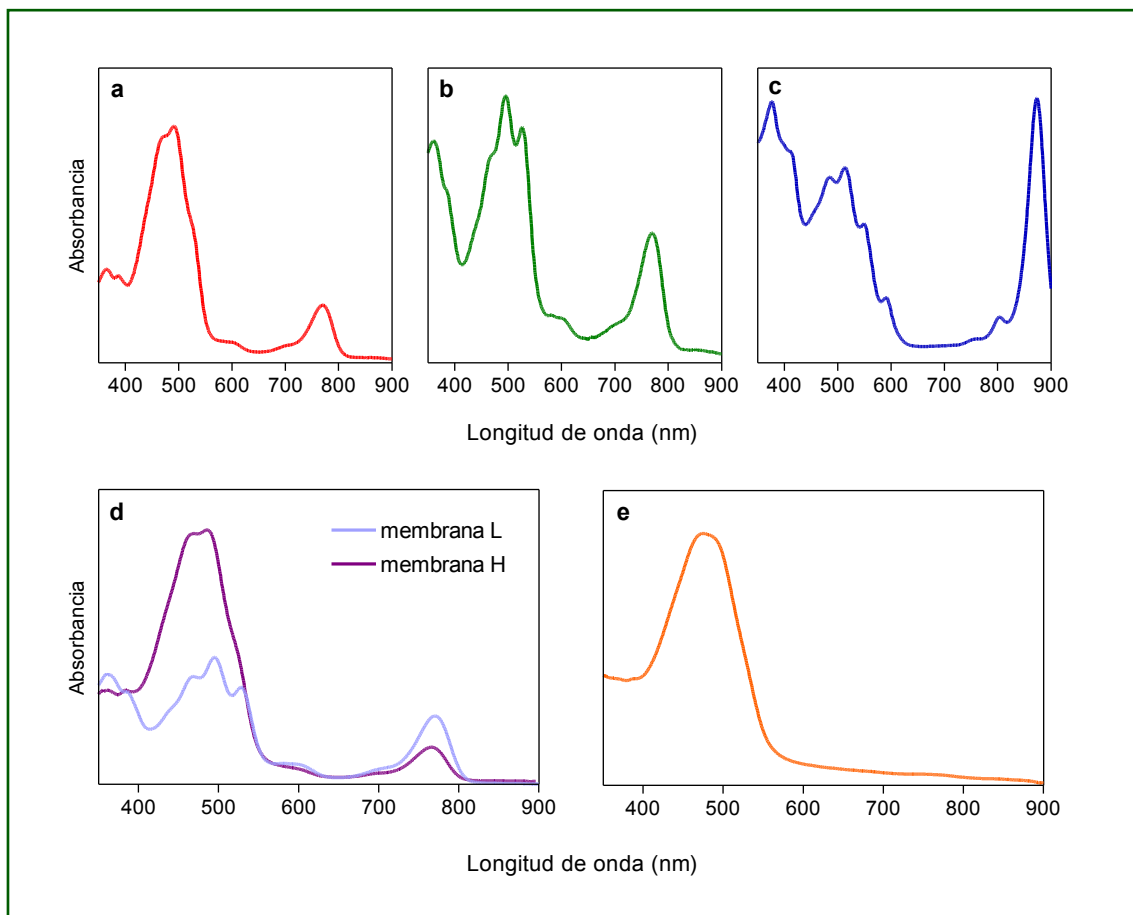


FIGURA 5. Espectros de absorción *in vivo* e *in vitro* (células o membranas extraídas con acetona: metanol 7:2 v/v) de los rizobios fotosintéticos.

- a.** Extracto de la cepa C7T1 (cepa tipo 1)
- b.** Extracto de la cepa C4T2 (cepa tipo 2)
- c.** Membrana L de la cepa C7T1 en buffer Tris-HCl pH 8
- d.** Extractos de membranas livianas (L) y pesadas (H) de la cepa C7T1
- e.** Extracto de la cepa C7T1 crecida bajo iluminación continua

Caracterización genotípica

Todos los aislamientos de Formosa y Chaco, que correspondieron al primer muestreo realizado, se caracterizaron por las tres técnicas de *fingerprinting* genómico: rep-PCR, ARDRA e IGS-RFLP.

rep-PCR

Se realizó la caracterización genotípica inicial de los aislamientos mediante BOX- y REP-PCR para su identificación y para evaluar la diversidad entre las cepas. En este análisis se incluyeron cepas de referencia de especies de *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* para su comparación (**Tabla 2**).

Los *fingerprints* obtenidos por BOX-PCR y el análisis de agrupamiento se muestran en la **Figura 6**. A un nivel de similitud del 60% pueden definirse 8 grupos, que incluyen al 80% de las cepas aisladas de nódulos de *Aeschynomene rudis*. Los grupos I a V comprenden solo cepas fotosintéticas y las cepas que producen cantaxantina se agrupan en el grupo VI. Las cepas de referencia de *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas conforman el grupo VII, excepto la cepa USDA 110 que ocupa una posición separada, y las cepas de *Bradyrhizobium elkanii* se agrupan en el grupo VIII. La cepa *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 ocupa una posición separada y distante de los aislamientos.

El análisis combinado de los *fingerprints* de BOX-PCR y REP-PCR se muestra en la **Figura 7**. En el análisis de agrupamiento pueden definirse 6 grupos ($r > 50\%$). Para la mayoría de las cepas su agrupamiento es similar al anterior (**Figura 6**). Si bien el perfil de bandas de REP-PCR es menos complejo que el obtenido por BOX-PCR, la utilización de los *primers* REP permite diferenciar a algunas de las cepas con *fingerprints* de BOX-PCR similares.

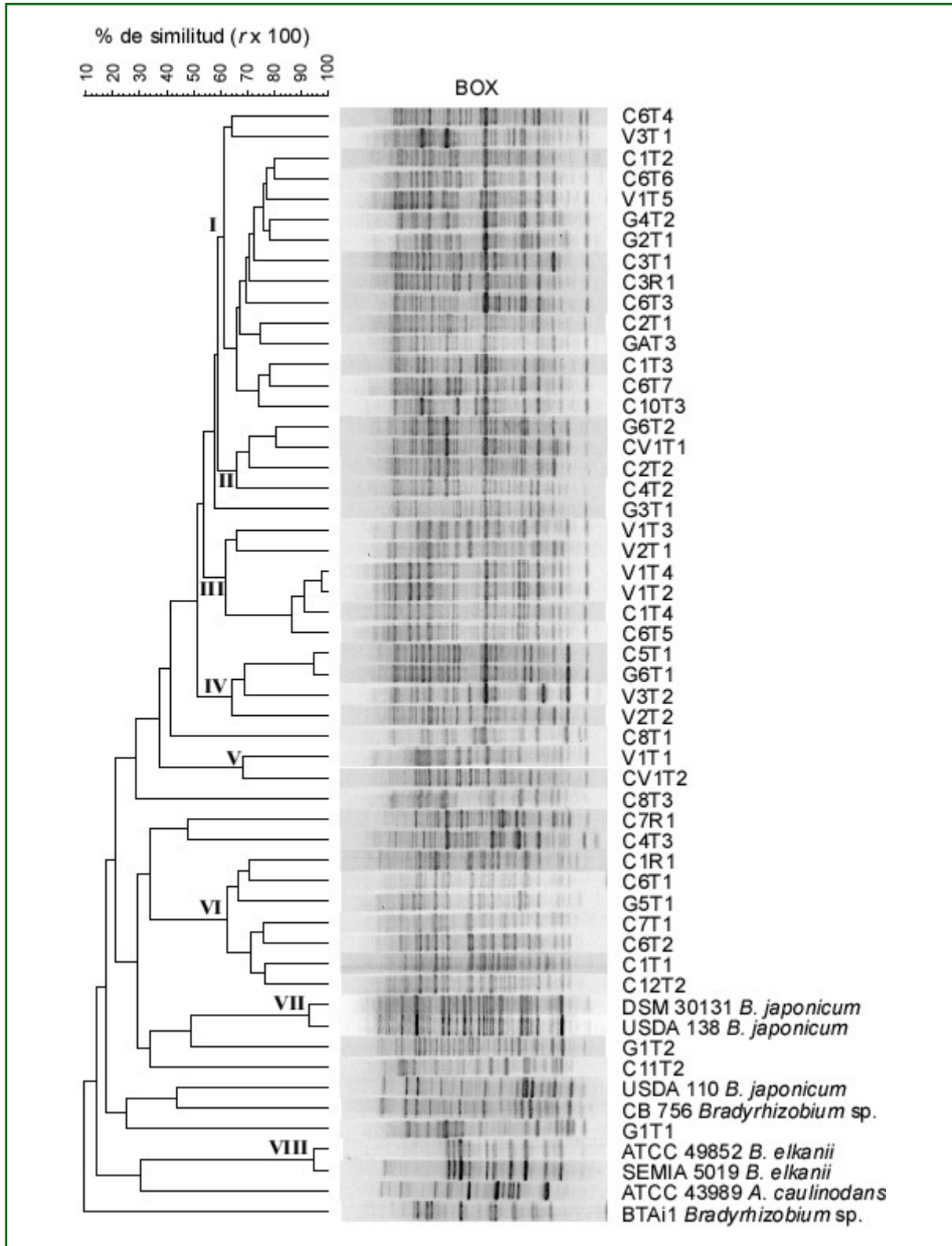
Los datos de rep-PCR revelan la gran diversidad existente entre los rizobios aislados de *Aeschynomene*, considerando que todas las cepas se originaron de una única especie y algunas de una misma planta, presentes en áreas geográficamente cercanas.

TABLA 2. Cepas de referencia

| Cepa | Planta hospedadora original | Origen ^a |
|---|------------------------------------|----------------------------|
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 | <i>Aeschynomene indica</i> | ATCC |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> DSM 30131 ^T | <i>Glycine max</i> | DSMZ |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 | <i>Glycine max</i> | IMYZA |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 138 | <i>Glycine max</i> | IMYZA |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> ATCC 49852 ^T | <i>Glycine max</i> | ATCC |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5019 | <i>Glycine max</i> | IMYZA |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. CB 756 | <i>Macrotyloma africanum</i> | IMYZA |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 ^T | <i>Sesbania rostrata</i> | ATCC |

^a ATCC: American Type Culture Collection (USA), DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Alemania), IMYZA: Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola-CNIA-INTA (Argentina).

FIGURA 6. Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis de los *fingerprints* de BOX-PCR de los aislamientos de *Aeschynomene rudis* y las cepas de referencia. Los grupos se definieron a un $r \geq 60\%$.



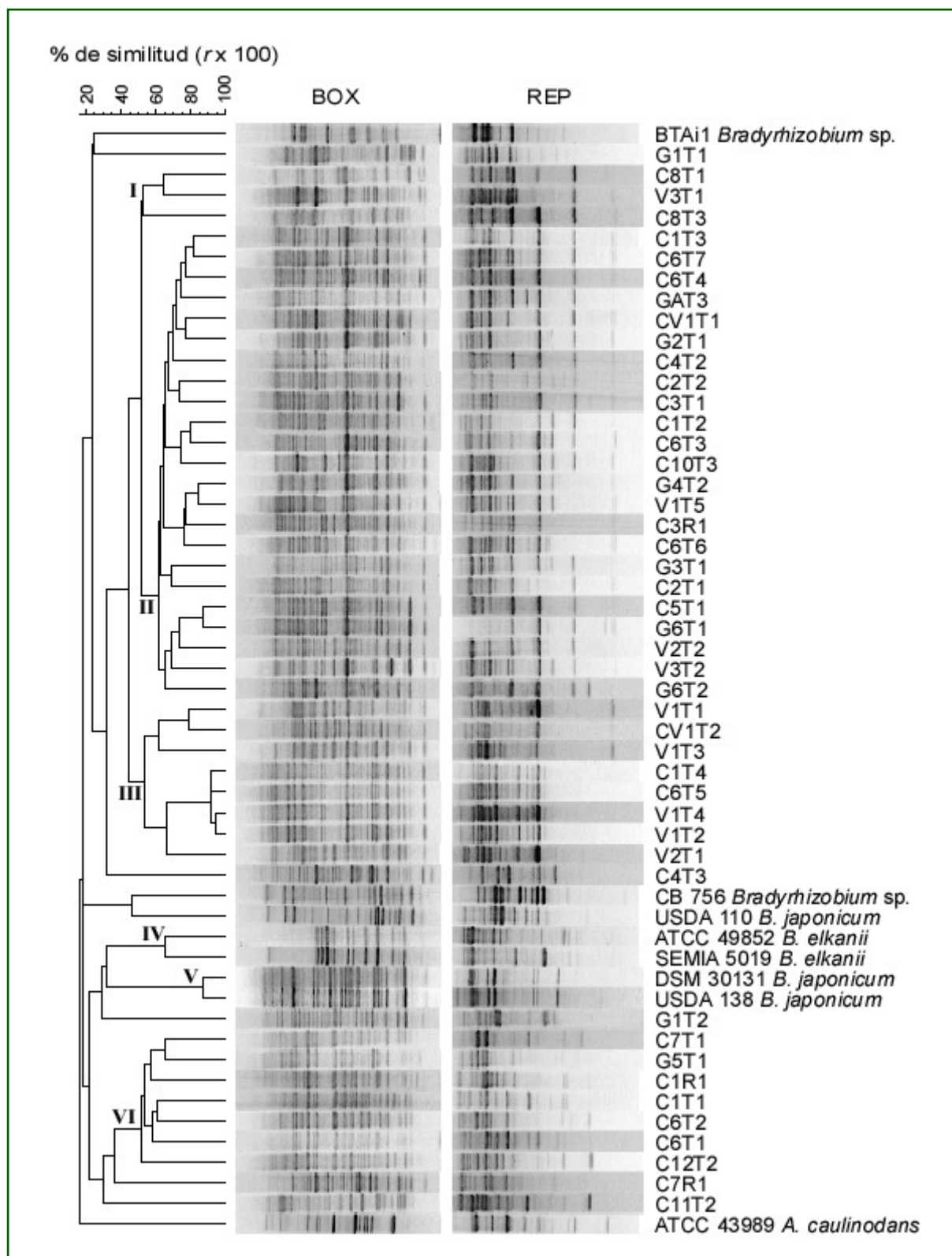


FIGURA 7. Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis de los *fingerprints* de BOX- y REP-PCR de los aislamientos de *Aeschynomene rudis* y las cepas de referencia. Los grupos se definieron a un $r > 50\%$

ARDRA

En todas las cepas se obtuvo un único producto de amplificación del tamaño esperado para el 16S rDNA (aproximadamente 1500 pb).

Con algunas de las cepas de referencia utilizadas se realizó un análisis de restricción simulado de las secuencias del 16S rDNA publicadas. Para todas las enzimas de restricción empleadas (*Ddel*, *HhaI*, *HinfI* y *MspI*), el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos experimentalmente coincidió con los teóricamente esperados dentro de los límites de resolución de los geles de agarosa utilizados.

La mayoría de las cepas aisladas de *Aeschynomene* presentaron patrones de restricción idénticos. El análisis de agrupamiento de los patrones de restricción combinados reveló 3 grupos distintos entre los bradyrizobios analizados, definidos a un nivel de similitud mayor al 90% (**Figura 8**). Con la excepción de dos cepas, todos los aislamientos fotosintéticos forman un grupo coherente (grupo II, $S_D=94\%$) relacionado pero distinto de los grupos que contienen a las cepas de *B. japonicum* y *B. elkanii*, a valores de similitud (S_D) del 88% y 82% respectivamente (grupos I y III). El grupo I también incluye a dos aislamientos no fotosintéticos (G1T1 y G1T2), uno fotosintético (C6T2), y a las cepas de *Bradyrhizobium* sp. CB 756 y BTAi1.

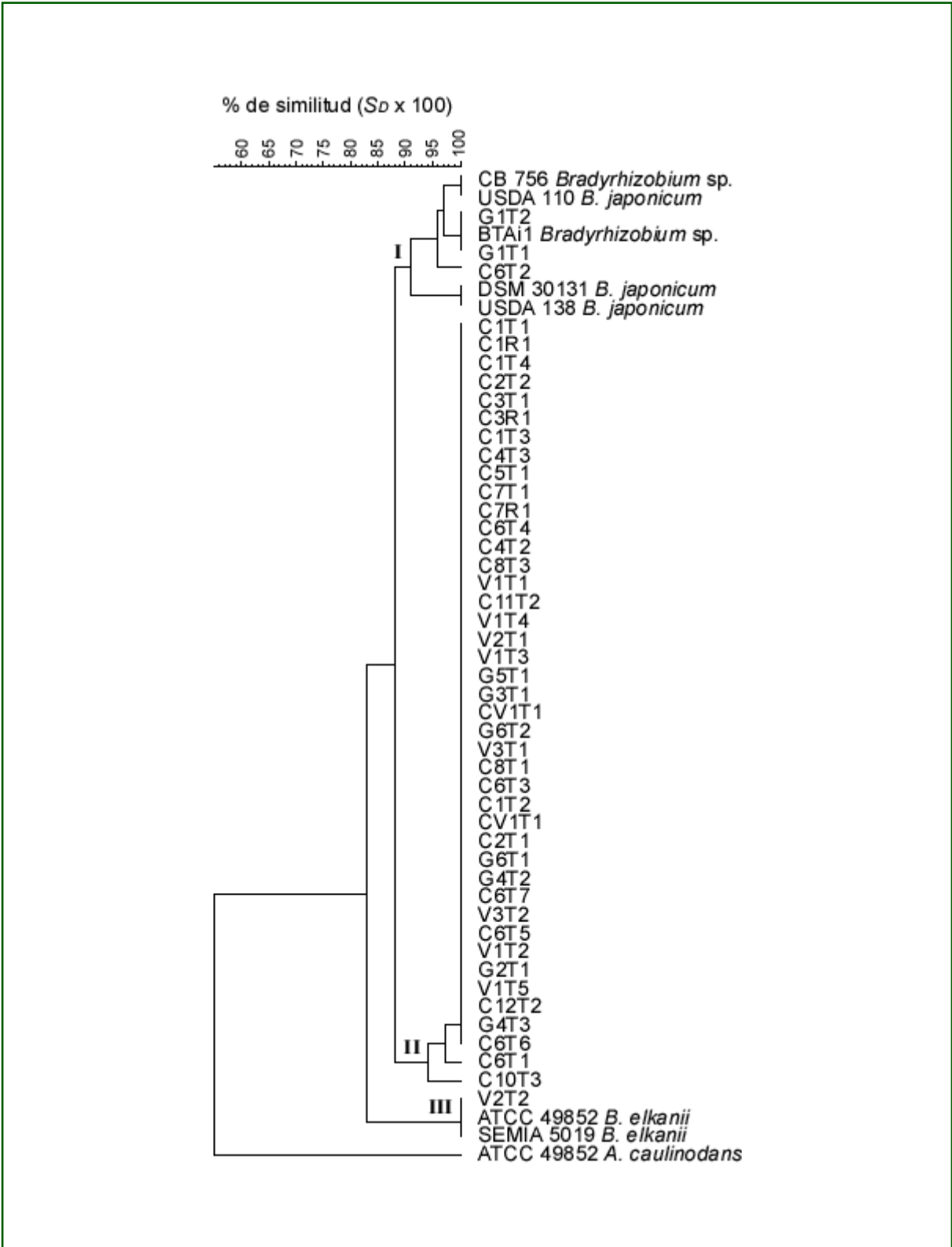


FIGURA 8. Dendrograma (Dice/UPGMA) basado en el análisis de los patrones de restricción del 16S rDNA combinados linealmente. Los grupos se definieron a $S_D > 90\%$.

Análisis combinado de los fingerprints de rep-PCR y ARDRA

El dendrograma resultante de la combinación de los datos de rep-PCR y ARDRA se muestra en la **Figura 9**. A un nivel de similitud del 60% se definen 7 grupos que incluyen a la mayoría de los aislamientos. Las cepas de *B. elkanii* y *B. japonicum* conforman los grupos I y II respectivamente, excepto la cepa de *B. japonicum* USDA 110 que ocupa una posición separada en el dendrograma.

El grupo III agrupa a las dos cepas tipo 2 que producen pigmentos fotosintéticos en oscuridad (C4T3 y C7R1), relacionado al grupo IV contiene a todas las cepas que producen pigmentos fotosintéticos en oscuridad y cantaxantina como pigmento principal: C6T2, C12T2, C1R1, G5T1, C1T1, C6T1, C7T1.

El grupo V contiene al 60% de los aislamientos, y son todas cepas tipo 2.

El grupo VI comprende 5 cepas fotosintéticas tipo 2 y el grupo VII dos aislamientos fotosintéticos de la misma planta.

Solo unos pocos aislamientos no se agrupan al nivel elegido para definir los grupos: las dos cepas no fotosintéticas G1T1 y G1T2, y C11T2. La cepa BTAi1 también ocupa una posición separada en el dendrograma.

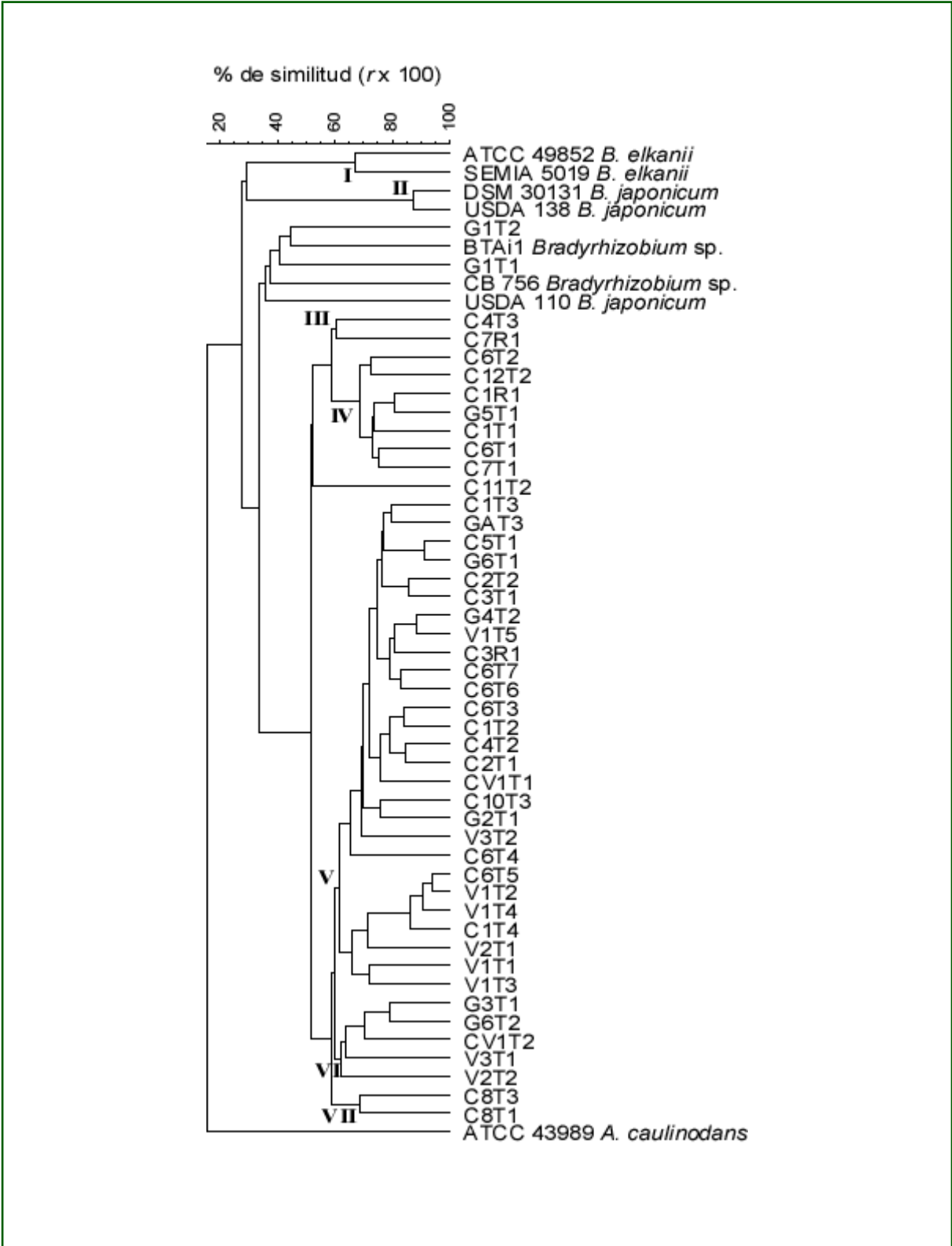


FIGURA 9. Análisis de agrupamiento (Pearson/UPGMA) de los *fingerprints* de BOX-PCR, REP-PCR y los patrones de restricción del 16S rDNA combinados linealmente. Los grupos se definieron a una similitud mayor al 60%.

Análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA

Si bien la mayoría de los aislamientos y las cepas de referencia produjeron un único producto de amplificación, en algunos aislamientos se obtuvieron repetidamente dos productos de PCR de diferente tamaño. Estos fragmentos de tamaño similar indicaron la presencia de varios operones ribosomales en estas cepas.

El tamaño de las regiones intergénicas amplificadas resultó similar al descrito en otros trabajos para cepas de *Bradyrhizobium* (entre 945 pb y 1250 pb). Los aislamientos de *Aeschynomene* poseen regiones intergénicas 16S-23S rDNA más largas que las de las cepas de referencia analizadas.

La mayoría de los aislamientos mostraron diferentes patrones de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA, solo unas pocas cepas comparten el mismo patrón de restricción con las 4 enzimas utilizadas. Para algunas cepas, el tamaño de la región intergénica no coincidió con la suma de los tamaños de los fragmentos de restricción, indicando la presencia de al menos dos tipos de regiones intergénicas con diferencias en los sitios de restricción.

El análisis de los patrones de restricción combinados se muestra como un dendrograma en la **Figura 10**. A un nivel de similitud del 50% pueden definirse 4 grupos principales. Si bien casi el 70% de los aislamientos fotosintéticos se agrupan en el grupo III, aquellos que producen cantaxantina constituyen un grupo diferente (grupo I). Nuevamente unas pocas cepas ocupan posiciones separadas, y *B. japonicum* USDA 110 y *Bradyrhizobium* sp. CB 756 conforman el grupo IV.

En el análisis de agrupamiento de los datos obtenidos por este método de *fingerprinting* genómico, la cepa BTAi1 nuevamente ocupa una posición separada del resto de los aislamientos analizados.

Estos resultados confirman la relación genética descrita entre las cepas surgida de las otras técnicas de *fingerprinting* genómico utilizadas.

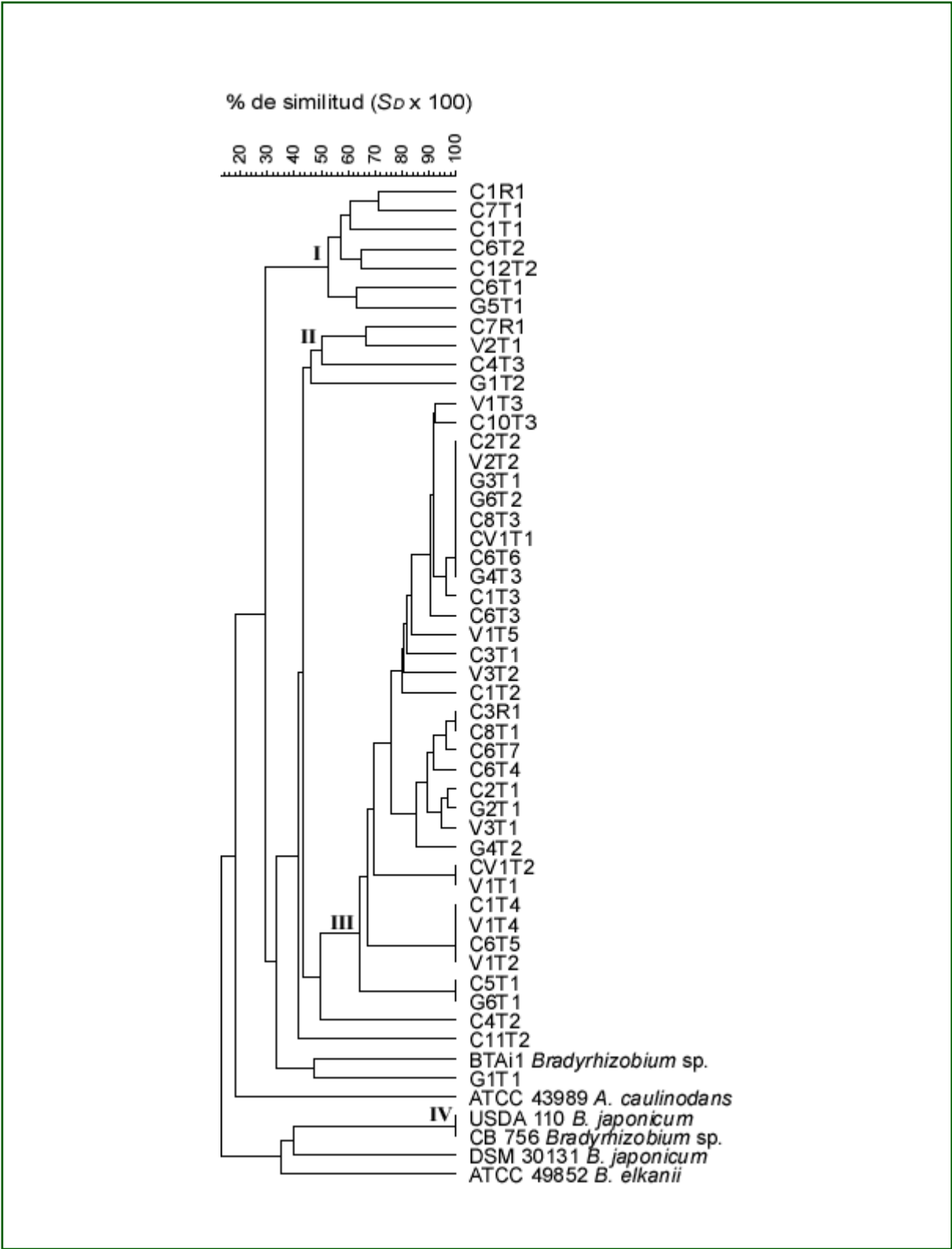


FIGURA 10. Análisis de agrupamiento (Dice/UPGMA) de los patrones de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA de los aislamientos de *Aeschynomene rudis* y las cepas de referencia. Los grupos se definieron a $S_D > 50\%$

En los aislamientos provenientes de un muestreo posterior en otras localidades de la región del NEA (provincia de Corrientes), principalmente de *Aeschynomene denticulata*, se determinó la producción de BChl bajo las distintas condiciones de iluminación (**Tabla 1**). Todos estos aislamientos resultaron ser fotosintéticos con propiedades similares a las encontradas entre los aislamientos del primer muestreo. *A. rudis* y *A. denticulata* pertenecen al mismo grupo de inoculación cruzada (grupo 3).

Debido al interés particular en los aislamientos que producen cantaxantina y acumulan BChl en la oscuridad, solo estas cepas (cepas tipo 1) se caracterizaron genótipicamente por BOX-PCR y ARDRA para determinar su relación con las cepas aisladas con anterioridad.

Estas 13 cepas presentaron perfiles de restricción idénticos a los obtenidos en las cepas caracterizadas anteriormente, por lo que a nivel de género/especie pueden clasificarse en un mismo grupo.

El análisis de agrupamiento de los *fingerprints* de BOX-PCR que incluye a estas cepas se muestra en la **Figura 11**. En éste se ven dos grandes grupos que contienen a la mayoría de los aislamientos: las cepas que producen cantaxantina y acumulan bacterioclorofila en la oscuridad (cepas tipo 1) y un grupo mayor que contiene a la mayoría de las cepas fotosintéticas aisladas de *Aeschynomene*. Si se definen grupos a un 60% de similitud, éstos son similares a los descritos en el análisis anterior de BOX-PCR de las cepas de *A. rudis* (**Figura 6**). Con la excepción de dos aislamientos, todas las cepas que producen cantaxantina conforman grupos relacionados entre sí y separados del resto (grupos III y IV, respectivamente).

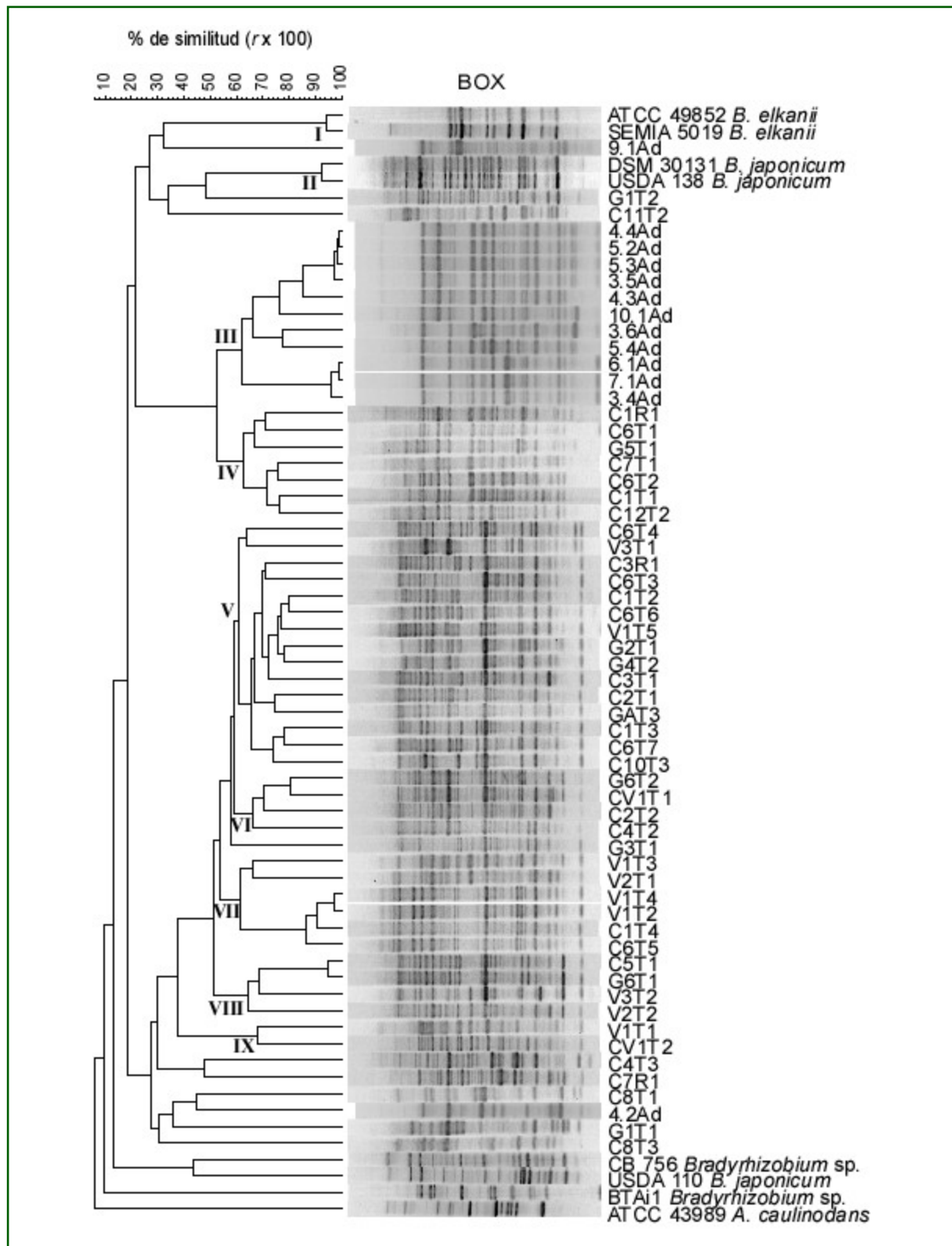


FIGURA 11. Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis de agrupamiento de los *fingerprints* de BOX-PCR de los aislamientos de *Aeschynomene* spp. y las cepas de referencia. Los grupos se definieron a un $r > 60\%$.

Filogenia basada en el gen ribosomal 16S

Se determinó la secuencia casi completa del gen 16S rRNA de la cepa C7T1, la cual consiste en 1485 nucleótidos. Esta secuencia se depositó en el base de datos GenBank bajo en número de acceso AF387321.

La secuencia determinada resultó muy similar (99% de identidad) a las secuencias publicadas de otros bradyrizobios fotosintéticos y a *Blastobacter denitrificans* LMG 8443^T.

En la **Figura 12** se muestra un árbol filogenético donde se ve que todas estas cepas conforman un grupo filogenético distinto y consistente (*bootstrap* 100%) dentro del grupo del 16S rDNA de *Bradyrhizobium*, relacionado con bacterias no simbióticas como *Rhodopseudomonas palustris* y especies de *Nitrobacter* y *Afipia*, dentro de la clase *Alphaproteobacteria*.

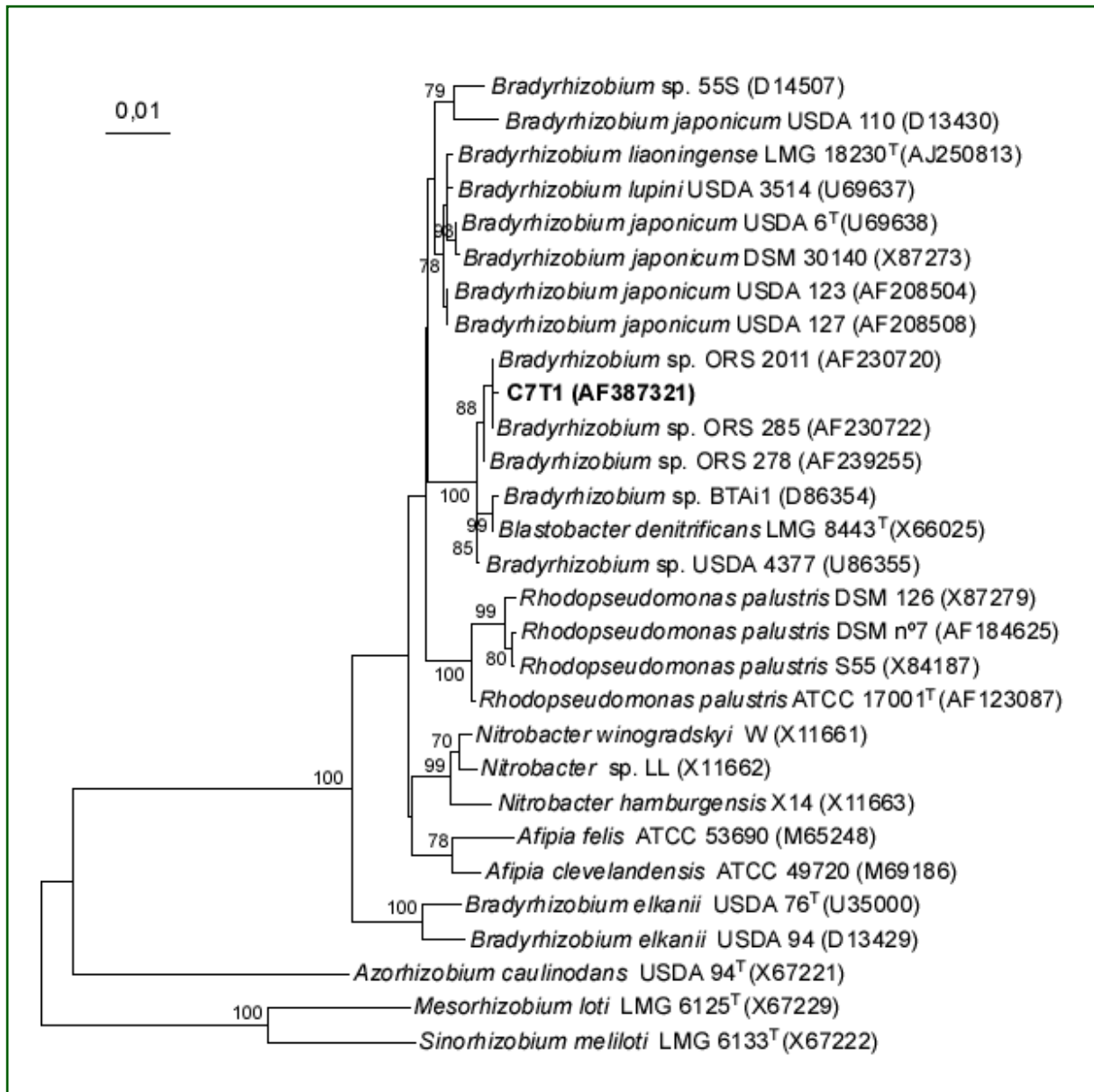


FIGURA 12. Relaciones filogenéticas entre los bradyrizobios fotosintéticos y organismos relacionados de la clase *Alphaproteobacteria*, basada en las secuencias del gen 16S rRNA. Entre paréntesis se indican los números de acceso, y los valores de *bootstrap* (1000 repeticiones) iguales o mayores al 70% se indican en los nodos.
Barra: 0,01 sustitución/sitio

Elección de la cepa C7T1 como representativa de los rizobios fotosintéticos nativos de *Aeschynomene*

Para el estudio de las propiedades fotosintéticas de los rizobios nativos de *Aeschynomene* se eligió a la cepa C7T1 como representativa. Hasta ese momento, la mayoría de los estudios con rizobios fotosintéticos se realizaron solo con la cepa BTAi1 y posteriormente con la cepa ORS278. La elección la cepa C7T1 para los estudios subsiguientes de este trabajo se debe a las diferencias fenotípicas y genotípicas encontradas con ambas cepas. La característica fenotípica más evidente está relacionada con la regulación de la expresión del aparato fotosintético por la tensión de oxígeno. También se observaron diferencias en la producción de pigmentos bajo las distintas condiciones de iluminación. Hay una gran diversidad entre los bradyrizobios fotosintéticos de colecciones de distinto origen geográfico, lo cual no hace redundante el estudio de diferentes cepas en este grupo tan particular de microorganismos. Incluso los genomas completos de las dos cepas de rizobios fotosintéticos más estudiadas, *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 y *Bradyrhizobium* sp. ORS278, están siendo secuenciados por distintos grupos de investigación.

Purificación de los complejos fotosintéticos RC-LH1 e identificación de los polipéptidos que forman parte de los complejos antena en la cepa C7T1

La purificación de los complejos fotosintéticos se realizó mediante el tratamiento de las membranas purificadas con un detergente zwitteriónico y un fraccionamiento posterior en un gradiente de sacarosa. Se obtuvieron dos fracciones coloreadas: una fracción liviana (9-10% sacarosa), de color naranja, que de acuerdo a su espectro de absorción consiste principalmente en cantaxantina, y otra de color rosado que bandea a 20-21% de sacarosa correspondiente al complejo RC-LH1 (**Figura 13**).

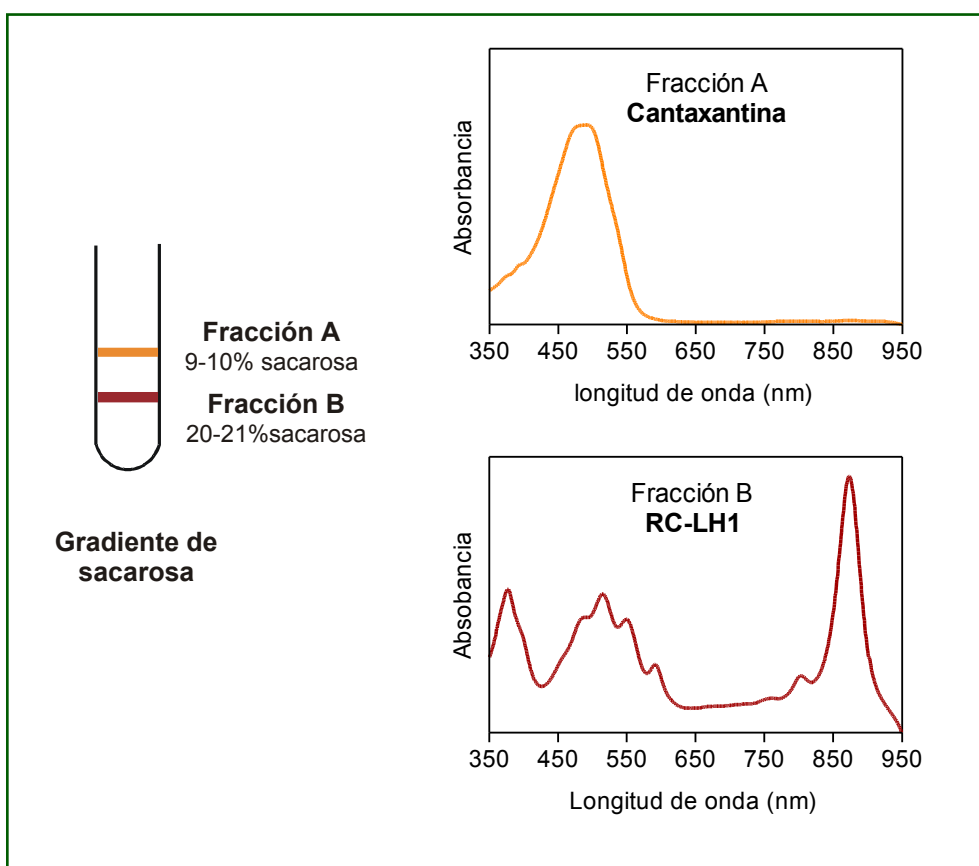


FIGURA 13. Purificación de los complejos fotosintéticos RC-LH1. Espectros de absorción de las fracciones obtenidas.

La purificación de los polipéptidos que forman los complejos antena se realizó por cromatografía en una columna de tamiz molecular de interacción hidrofóbica (Sephadex LH60), a partir de un extracto en solventes orgánicos de membranas H liofilizadas. Estos polipéptidos, denominados α y β , corresponden a los productos de los genes *pufA* y *pufB* del operón *puf*, respectivamente. El perfil de elución de la columna se muestra en la **Figura 14**.

La composición proteica de las fracciones correspondientes a los picos se analizó mediante Tricina-SDS-PAGE, y la composición polipeptídica del pico 2, resultado de este análisis, se muestra en la calle 1 del gel de la **Figura 15**.

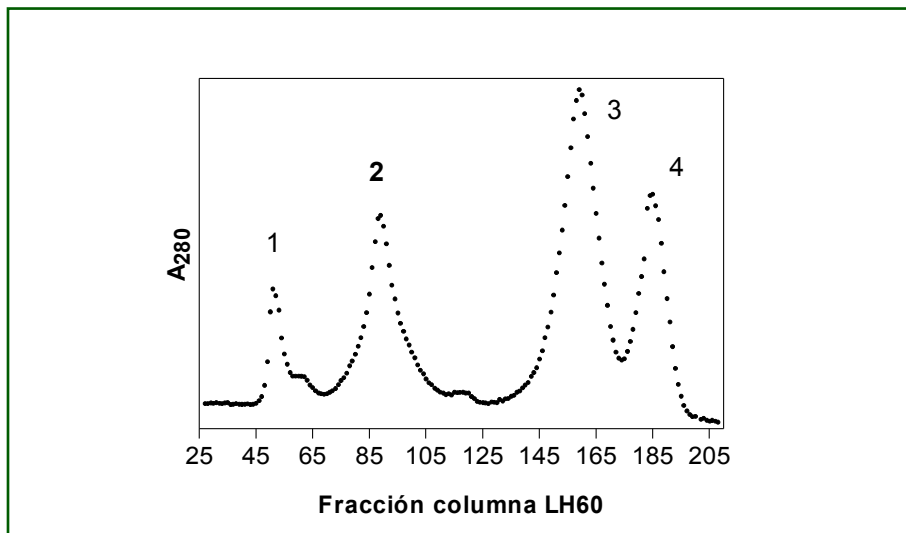


FIGURA 14. Purificación de los polipéptidos de la antena
Perfíl de elución de la columna de Sephadex LH60

La evaluación de la composición proteica del complejo RC-LH1 purificado mediante Tricina-SDS-PAGE, mostró que contiene mayoritariamente dos polipéptidos de tamaño similar, los cuales se identificaron tentativamente como los polipéptidos α y β de la antena del complejo RC-LH1 (**Figura 15**, calles 2 y 4). Los polipéptidos correspondientes al centro de reacción no pudieron identificarse con certeza ya que varias bandas en la zona superior del gel podrían asignarse a éstos de acuerdo a su tamaño.

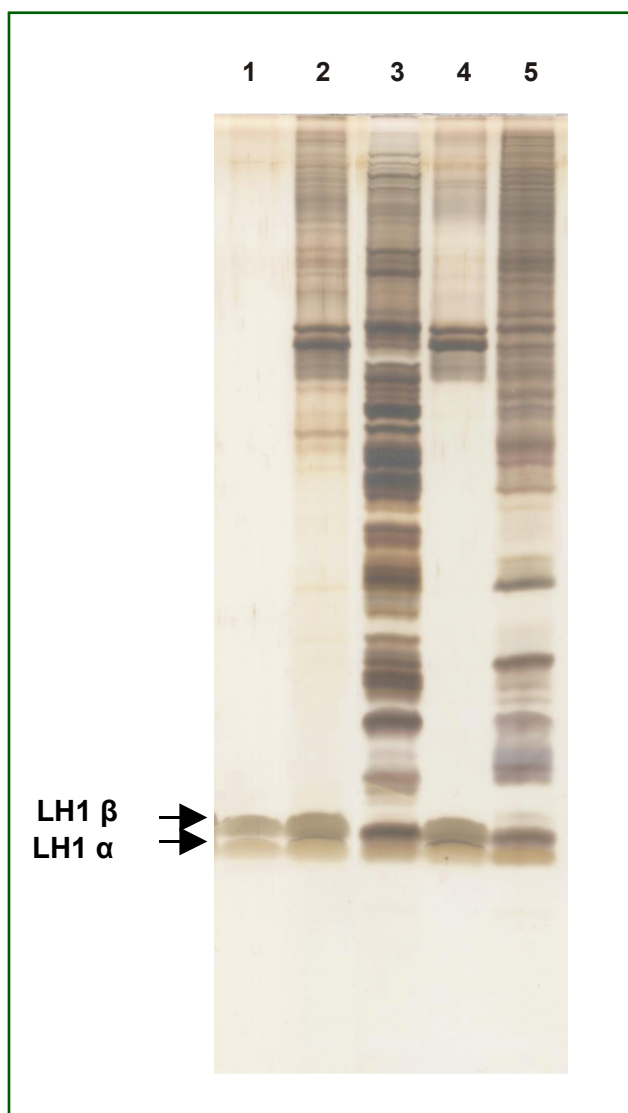


FIGURA 15. Perfiles proteicos de las membranas y de los complejos fotosintéticos purificados.

Identificación de los polipéptidos de la antena.

(Tricina-SDS-PAGE, tinción con plata)

1. pico 2 de la columna LH60
2. complejos RC-LH1 purificados de membranas L
3. membrana L
4. complejos RC-LH1 purificados de membranas H
5. membrana H

En el perfil proteico correspondiente al pico 2 del perfil de elución de la columna LH60 puede verse la presencia de dos bandas bajo peso molecular que se separan muy poco en el gel. Para confirmar la presencia de solo esos dos polipéptidos en las fracciones correspondientes al pico 2, parte de esta muestra se corrió en un gel bidimensional (NEPHGE).

En este gel se detectó la presencia de solo dos proteínas en la tinción con plata. Los pesos moleculares (MW) y los puntos isoeléctricos (pI) relativos de estos polipéptidos son similares a los valores teóricos de los productos de los genes de la antena *pufB* y *pufA* de la cepa ORS278 (pI/MW: 6,23/8186,46 Da y 11,83/7050,51 Da, respectivamente).

Para la identificación de los polipéptidos purificados se determinó la composición aminoacídica mediante secuenciación parcial. Se obtuvo la secuencia amino terminal del polipéptido 1 (banda superior), y la de un péptido interno del polipéptido 2 (banda inferior). Estas secuencias permitieron identificar al polipéptido 1 del SDS-PAGE como LH1 β , y al polipéptido 2 como LH1 α (**Figura 15**).

La secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de LH1 β de la cepa C7T1 posee un 91% y un 88% de identidad con las secuencias proteicas deducidas del gen *pufB* de las cepas ORS278 y BTAi1, respectivamente. El péptido interno del polipéptido de LH1 α (FNWLEGPR) mostró una identidad del 100% con la secuencia de un péptido interno de proteínas equivalentes deducidas de la secuencia de DNA de ambas cepas.

Las secuencias alineadas del dominio amino terminal de LH1 β de distintas cepas se muestra a continuación:

| | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. C7T1 | -VDVVPNKGGSLSGLTESEEAARFHSIFM |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi | MVDVVPNKGGSLSGLTEAEAREFHSIFM |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278 | MVE-PNKGGSLSGLTESEAREFHSIFM |
| <i>Roseateles depolymerans</i> 61A | MAD--NRSGSLSGLTDNEAREFHGIFM |
| <i>Rps. palustris</i> CGA009 | MSD-----GSISGLSEAEAKEFHSIFV |
| | : **:***: : ** .**.**: |

En algunas bacterias fotosintéticas los polipéptidos de la antena son procesados luego de su expresión. La secuencia de aminoácidos obtenida para el polipéptido LH1 β indica que, con la excepción de la remoción de la metionina, éste no es procesado en su dominio N-terminal.

Además, el análisis de secuencia de los genes *pufB* y *pufA* casi completa de la cepa C7T1 mostró una identidad de secuencia del 96% y del 93% con los genes de las cepas ORS278 y BTAi1 respectivamente.

Síntesis de ATP inducida por la luz en cromatóforos

Los resultados de los ensayos de fotofosforilación en membranas, mostraron que la síntesis de ATP ocurre exclusivamente en presencia de oxígeno. En estas condiciones la velocidad de síntesis es 15nmol ATP/mg proteína/min. Esto indica que el transporte de electrones fotosintético no ocurre bajo condiciones anaeróbicas, y puede ser una de las razones por la cual esta bacteria no puede crecer en forma fotoautótrofa en anaerobiosis.

Expresión del aparato fotosintético en condiciones aeróbicas, semiaeróbicas y microaeróbicas

Los resultados del efecto de la tensión de oxígeno sobre la acumulación de BChl y el crecimiento, a los 4 días de cultivo, se muestran en la **Tabla 3**. Se observó un aumento en la acumulación de BChl relacionado con la disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Bajo iluminación cíclica, se observa un aumento de más del 60% en la acumulación de BChl en las células bajo condiciones de microaerobiosis con respecto a condiciones de crecimiento totalmente aeróbicas. En este caso, los pigmentos fotosintéticos sintetizados se encuentran unidos a las membranas. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento alcanzado a los 4 días de cultivo bajo las distintas condiciones de oxigenación.

TABLA 3. Acumulación de bacterioclorofila en la cepa C7T1 bajo distintas condiciones de oxigenación.

| O ₂ | Contenido de BChl a (pmol/mg de proteína) | | | A ₆₈₀ | UFC/ml |
|----------------|--|----------------------|------|------------------|---------------------|
| | Células | Fracción de membrana | | | |
| | | H | L | | |
| 21% | 630 | 100 | 1130 | 0,9 | 2,1x10 ⁹ |
| 3% | 790 | 500 | 1370 | 0,8 | 1,9x10 ⁹ |
| 0,5% | 1040 | 900 | 1630 | 0,6 | 1,3x10 ⁹ |

La relación entre la acumulación de BChl y la concentración de oxígeno para la cepa C7T1, que es inverso al informado para la cepa BTAi1, puede verse en la **Figura 16**.

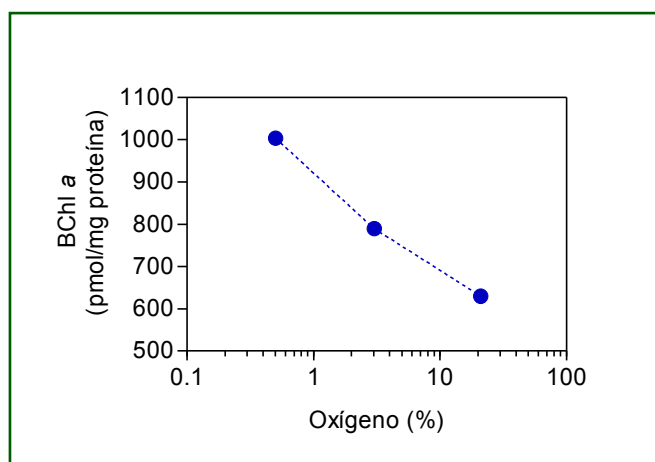


FIGURA 16. Relación entre la producción de pigmentos fotosintéticos y la tensión de oxígeno en la cepa C7T1

La cepa C7T1 es también capaz de crecer en un medio sin nitrógeno (medio SA) en microaerobiosis. Si bien en este cultivo se observó un período *lag* de 24 horas en el crecimiento, en esta condición C7T1 expresó tanto su actividad nitrogenasa como su actividad fotosintética. Debido a que a los 4 días presentó un crecimiento menor que el observado en los otros casos ($A_{680}=0,4 - 2,5 \times 10^8$ UFC/ml), el cultivo de este fermentador se continuó por 3 días más y se determinó la acumulación de BChl a distintos tiempos. La cantidad de BChl acumulada en las células fue la siguiente: a los 4 días 1800 pmol BChl/mg proteína, a los 6 días 2000 pmol BChl/mg de proteína y a los 7 días 1500 pmol/mg de proteína. En membranas el contenido de BChl a los 7 días fue 1660 pmol/mg de proteína en L y 1500 pmol/mg de proteína en H. Hasta los 6 días la absorbancia del cultivo aumentó pero no hubo diferencias en su crecimiento ($A_{680}=0,6 - 2,5 \times 10^8$ UFC/ml). Estos valores se mantuvieron hasta el 7° día de cultivo.

Los resultados de la acumulación de BChl en esta última condición de crecimiento (microaerobiosis-medio sin nitrógeno) no pueden compararse directamente con los anteriores ya que el medio utilizado fue diferente. Al igual que en otras bacterias fotosintéticas aeróbicas, la acumulación de BChl en la cepa C7T1 también es influenciada por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo. Bajo condiciones de oxigenación similares y presencia de fuente de nitrógeno, esta cepa

acumula aproximadamente un 35% menos de BChl en medio SAG que en medio MAG modificado, mientras que el crecimiento final alcanzado es similar.

Regulación de la expresión del operón *puf* por oxígeno

Los resultados de los experimentos de transferencia Northern indicaron que existe una regulación a nivel transcripcional de la expresión del operon *puf* por la tensión de O₂.

En **Figura 17** se muestran los resultados de la hibridización con la sonda *pufBA*, donde se ve un mayor nivel del *pufBA* mRNA a medida que disminuye la concentración de oxígeno en el cultivo (cultivos bajo ciclos luz/oscuridad). El tamaño aproximado de este transcrito es 0,6 kb.

Las diferencias observadas se deben a una mayor expresión de los genes de la antena bajo condiciones de micro y semiaerobiosis, pero probablemente también a una menor estabilidad del mRNA bajo condiciones aeróbicas.

Inesperadamente bajo condiciones de iluminación continua, tanto en condiciones aeróbicas como semiaeróbicas, se observó una alta acumulación de este transcrito a pesar de que en esa condición de iluminación no se detectó acumulación de BChl en las células.

A partir del operón *puf* se transcriben dos mensajeros: un mensajero corto que incluye solo a los genes *pufB* y *pufA* y otro que además incluye por lo menos a los genes *pufL* y *pufM* (que codifican para las proteínas del centro de reacción fotosintético). El revelado de la hibridización con la sonda *pufLM*, aún después de varios días de exposición de las placas, presentó una marca baja solo detectable en las condiciones de mayor expresión del operón *puf* (no mostrado). Esto tiene relación con la menor vida media de este transcrito.

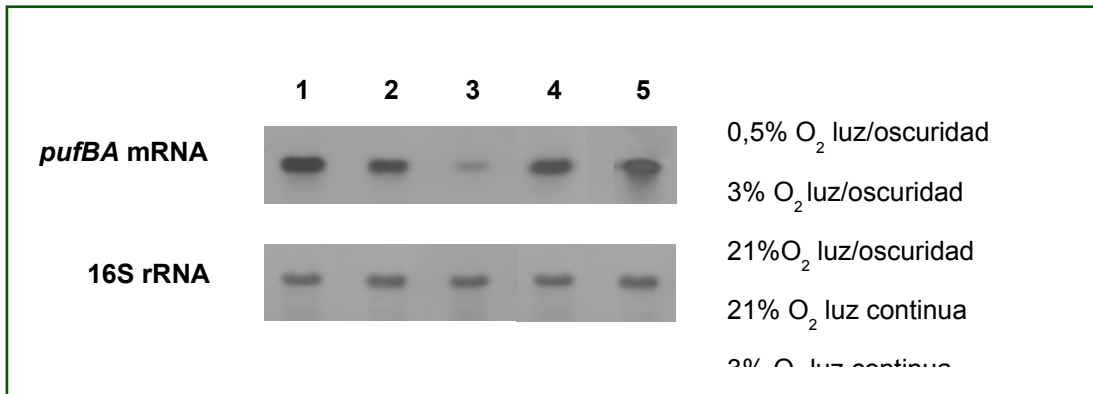


FIGURA 17. Expresión de los genes *pufBA* bajo distintas condiciones de oxigenación e iluminación. Autorradiografías de los experimentos de transferencia Northern. El revelado con la sonda 16S rDNA confirmó la cantidad de RNA total equivalente analizada en cada muestra.

Producción de pigmentos fotosintéticos bajo distintas condiciones de iluminación

Los resultados de la expresión del aparato fotosintético en la cepa C7T1 bajo diferentes condiciones de iluminación, medida a través de la acumulación de BChl en las células, se muestran en la **Figura 18a**. Puede verse que bajo las condiciones de cultivo utilizadas, la iluminación continua con luz de 660 nm (rojo) o 760 nm (rojo lejano) no afectó la acumulación de BChl. No se observaron diferencias significativas entre todas las condiciones de iluminación ensayadas. En la cepa 7.1Ad, que es un aislamiento del mismo tipo que la cepa C7T1 pero de distinto origen, tampoco se observaron diferencias en los niveles de acumulación de BChl bajo las distintas condiciones de iluminación. En cambio, como era esperable, se observó inhibición de la acumulación de BChl por luz continua de 660 nm en la cepa BTAi1. Los espectros de absorción de las cepas C7T1 y BTAi1 crecidas bajo las distintas condiciones de iluminación ilustran las diferencias observadas entre ambas cepas (**Figura 18b**)

Estos resultados indican que el fotorreceptor bacteriofitocromo descrito en otras cepas de bradyrizobios no está involucrado en la regulación de la expresión del

aparato fotosintético en esta cepa, ya que no se observa inhibición en la acumulación de BChl por luz roja ni estimulación por luz de características rojo lejano.

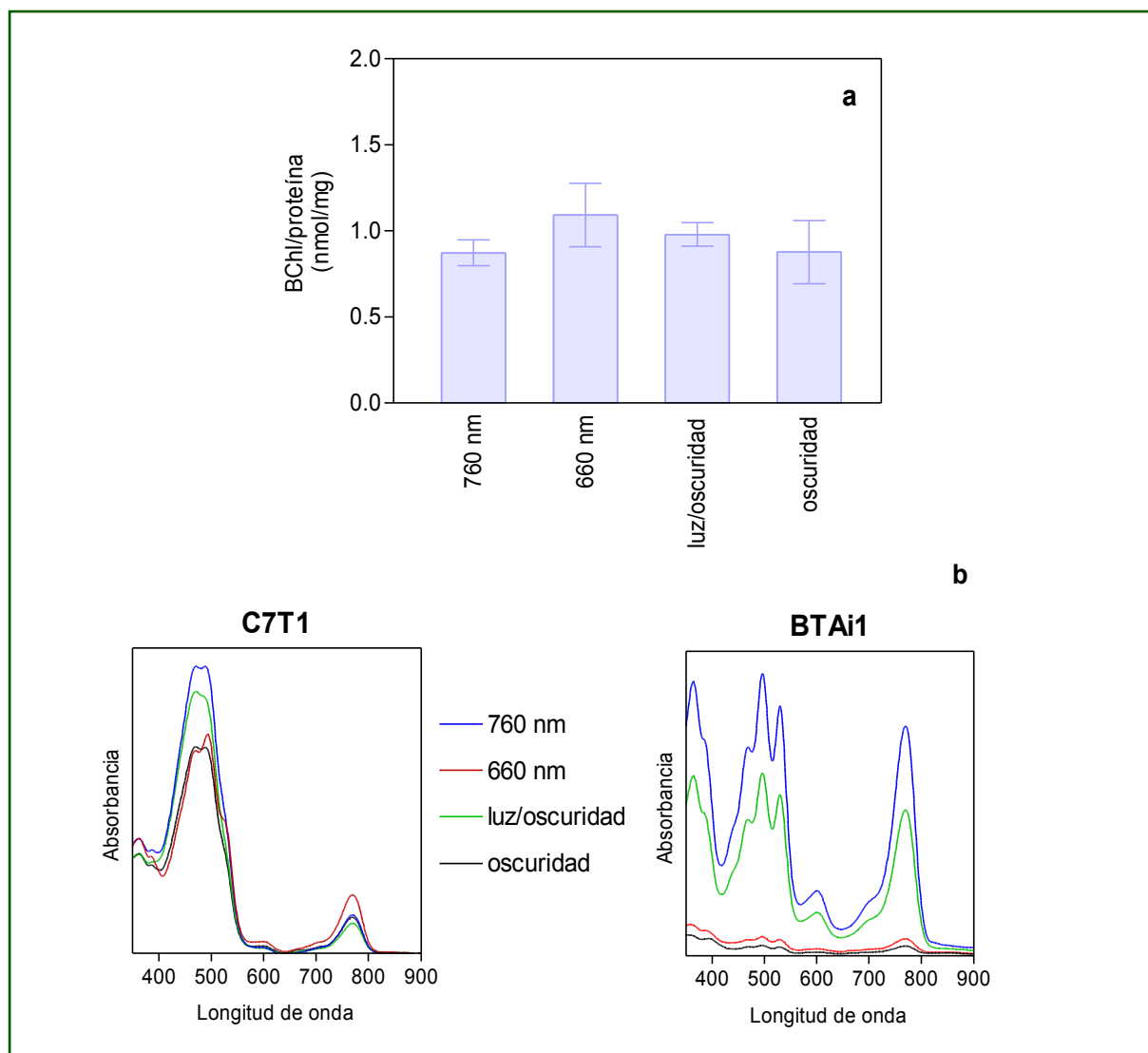


FIGURA 18. Efecto de la calidad de luz en la producción del aparato fotosintético

a, acumulación de BChl en la cepa C7T1 bajo distintas condiciones de iluminación **b**, espectros de absorción de las cepas C7T1 y BTAi1 crecidas bajo las distintas condiciones. Los datos graficados corresponden a la media de 5 repeticiones \pm SD

Actividad nitrogenasa *ex planta*

La cepa C7T1 presentó una actividad nitrogenasa importante solo en el medio SA de los tres medios semisólidos utilizados. A diferencia de lo informado para la cepa BTAi1, no se observaron diferencias importantes en la actividad nitrogenasa de los cultivos mantenidos siempre en oscuridad y la de aquellos crecidos bajo ciclos luz/oscuridad e incubados en luz durante la actividad de reducción de acetileno (Figura 19).

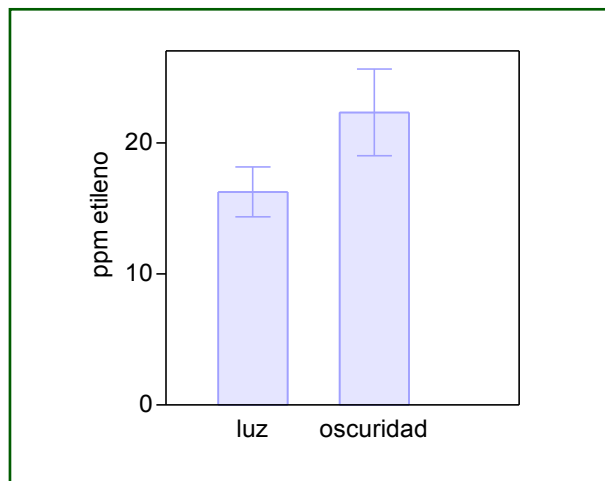


FIGURA 19. Actividad nitrogenasa en cultivos de la cepa C7T1 evaluada en luz u oscuridad. Los datos corresponden a la media de 7 repeticiones \pm SD

Detección de genes de interés por PCR

Si bien los genes *ppsR* de distintas bacterias tienen una similitud de secuencia baja, la arquitectura de las proteínas correspondientes generalmente es conservada y comprende 3 regiones diferentes. El C-terminal posee un motivo hélice-vuelta-hélice o HTH, con un rol clave en la unión al DNA. Utilizando *primers* diseñados en base a la secuencia de esta porción del gen *ppsR2* de la cepa *Bradyrhizobium* sp. ORS278, se investigó la presencia de este gen por PCR en los aislamientos nativos de *Aeschynomene*.

De las cepas analizadas, solo se obtuvo amplificación positiva (producto de PCR del tamaño esperado: 360 pb) en la cepa BTAi1 y las cepas tipo 2, que corresponden al mismo grupo de pigmentación que BTAi1 y producen BChl solo cuando crecen bajo ciclos luz-oscuridad. En las cepas tipo 1, que son las que producen cantaxantina como pigmento principal y acumulan BChl en la oscuridad, la amplificación no fue exitosa.

Esto indicaría que el gen *ppsR2* en las cepas tipo 1 no está presente, o al menos está truncado en su extremo carboxiterminal. Otra explicación admisible es que su secuencia sea divergente con respecto a los genes *ppsR* descritos en *Bradyrhizobium* sp. ORS278 y en *Rhodopseudomonas palustris*. Por cualquiera de estos motivos PpsR2 no sería funcional en las cepas tipo 1.

En cambio, sí se obtuvo amplificación positiva en todas las cepas para una porción del gen *bphP* correspondiente al dominio de unión al cromóforo (CBD), lo cual indica la presencia de al menos esta parte del gen. Sin embargo, esto no aporta datos con respecto a la funcionalidad del BphP.

RIZOBIOS AISLADOS DE NODULOS DE *Sesbania*

De las especies de *Sesbania* nativas, solo en *S. virgata* y *S. exasperata* se encontraron plantas con nódulos en la parte baja del tallo que superficialmente se parecen a los de *S. rostrata*.

Los aislamientos de rizobios de *Sesbania* spp. obtenidos y su origen geográfico se describen en la **Tabla 4**, junto con las cepas de referencia utilizadas.

TABLA 4. Aislamientos de *Sesbania* spp. y cepas de referencia

| Cepas ^a | Origen geográfico | Planta hospedadora |
|---|------------------------------|----------------------------|
| P1.1Sv, P1.Sv2, P2.1Sv, P2.2Sv, P4.1Sv, P4.2Sv | Colonia Pastoril, Formosa | <i>Sesbania virgata</i> |
| Y1.1Sv, Y1.2Sv | Presidente Yrigoyen, Formosa | <i>Sesbania virgata</i> |
| F1Sv, F2Sv | Cañada Doce, Formosa | <i>Sesbania virgata</i> |
| Lb1.1Sv, Lb2.1Sv, Lb3.1Sv, Lb4.1Sv | Laguna Brava, Corrientes | <i>Sesbania virgata</i> |
| Lv1.1Se, Lv2.1Se, Lv2.2Se, Lv3.1Se, Lv4.1Se, Lv4.2Se, Lv4.3Se, Lv5.1Se, Lv6.1Se, Lv6.2Se | Las Varas, Salta | <i>Sesbania exasperata</i> |
| Ag1.3Se, Ag1.4Se, Ag3.1Se, Ag3.2Se, Ag5.1Se | Abra Grande, Salta | <i>Sesbania exasperata</i> |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 ^T | Senegal | <i>Sesbania rostrata</i> |
| <i>Sinorhizobium teranga</i> DSM 11282 ^T | Senegal | <i>Acacia laeta</i> |
| <i>Sinorhizobium saheli</i> | Senegal | <i>Sesbania cannabina</i> |

| | | |
|--|-----------|---------------------------|
| DSM 11237 ^T <i>Sinorhizobium arboris</i> | Sudán | <i>Prosopis chilensis</i> |
| DSM 13375 ^T <i>Sinorhizobium kostiense</i> | Sudán | <i>Acacia senegal</i> |
| DSM 13372 ^T <i>Rhizobium galegae</i> | Finlandia | <i>Galega orientalis</i> |
| USDA 4128 ^T | | |

^a Los números en la designación de los aislamientos se refieren a la identificación de la planta y a la del nódulo del que fueron aisladas

Caracterización genotípica

Los aislamientos y las cepas de referencia se caracterizaron mediante rep-PCR (BOX-, ERIC- y REP-PCR), ARDRA e IGS-RFLP.

ARDRA

Rhizobium huatlense, el microsimbionte de *Sesbania herbacea* que es una especie nativa de México, tiene un patrón de restricción similar al de *R. galegae* (Wang *et al.* 1998). Al no disponer de ninguna cepa de referencia de *R. huatlense* se utilizó a la cepa tipo de *R. galegae* para esta comparación.

El dendrograma resultante del análisis de agrupamiento de los patrones de restricción del 16S rDNA (*Dde*I, *Hha*I, *Hin*fI y *Sau*3A1) de los aislamientos y las cepas de referencia utilizadas se muestra en la **Figura 20**. A un nivel de similitud del 90% pueden definirse 3 grupos. Todos los aislamientos de *S. virgata* mostraron perfiles de restricción idénticos entre sí y forman un grupo (grupo III) relacionado a *Azorhizobium caulinodans*^T ($S_D=80\%$). Todos los aislamientos de *S. exasperata* excepto uno, también mostraron perfiles de restricción idénticos entre sí, y conforman un grupo separado (grupo I), relacionado a *R. galegae* ($S_D=89\%$). Las cepas tipo de las 4 especies de *Sinorhizobium* utilizadas se agrupan en el grupo II ($S_D=90\%$).

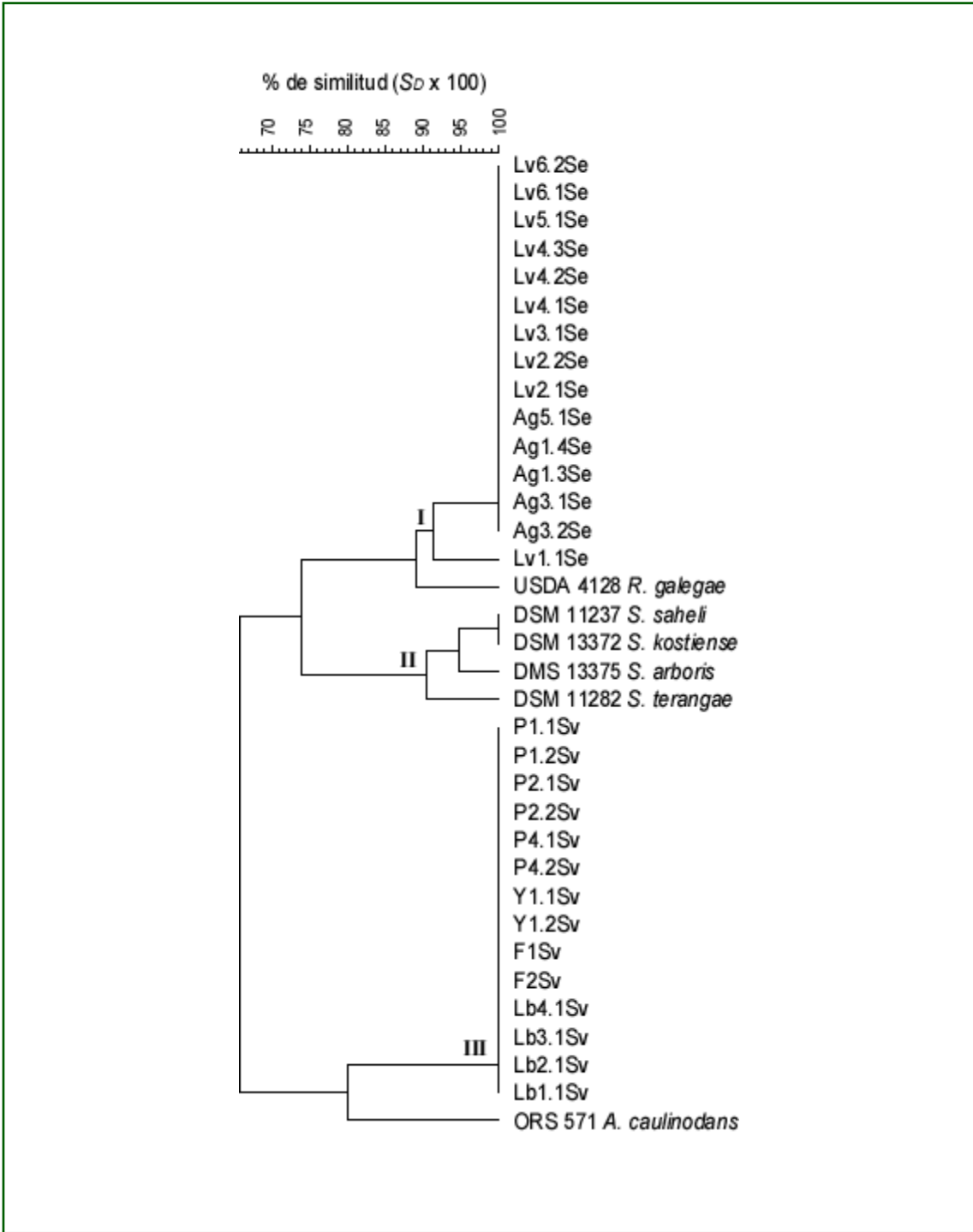


FIGURA 20. Dendrograma (Dice/UPGMA) del análisis de los patrones de restricción combinados del 16S rDNA de los aislamientos de *S. virgata* y *S. exasperata* y las cepas de referencia. Los grupos se definieron a $S_D > 90\%$

rep-PCR

La diversidad entre los aislamientos evaluada por rep-PCR y los *fingerprints* de BOX-, ERIC- y REP-PCR obtenidos se muestra en la **Figura 21**.

Pueden definirse 5 grupos con una similitud mayor al 60%. Estos siempre agrupan aislamientos de la misma especie de *Sesbania* aunque no de los mismos sitios de muestreo.

Los grupos I a III agrupan a los aislamientos de *Sesbania virgata*. En cada grupo, los aislamientos no pueden diferenciarse genotípicamente en base a sus *fingerprints*, ya que son casi idénticos con los tres *primers* utilizados, con excepción de la cepa Y1.1Sv que puede diferenciarse de las de su grupo por ERIC-PCR. Los aislamientos dentro de cada grupo pueden considerarse cepas hermanas. Sin embargo, hay una gran diversidad genotípica entre los grupos, con similitudes menores al 30%.

Excepto la cepa Lv1.1Se, los aislamientos de *Sesbania exasperata* conforman los grupos IV y V. Dentro de estos grupos también hay una alta proporción de cepas hermanas o estrechamente relacionadas a nivel de cepa. La mayoría de los aislamientos se agrupan en el grupo V, conformando dos subgrupos distinguibles por sus *fingerprints* de REP-PCR. Entre los aislamientos de esta especie de *Sesbania*, la similitud genotípica entre los distintos grupos también es baja, y las cepas de estos grupos presentan *fingerprints* de BOX, ERIC y REP-PCR característicos.

Si bien el análisis de agrupamiento de los *fingerprints* de rep-PCR solo es útil para inferir relaciones entre cepas relacionadas a nivel de especie o subespecie, en este análisis se observa una clara separación de los rizobios que nodulan *Sesbania* en dos grandes grupos, correspondientes a los distintos géneros de rizobios asociados a cada una de las especies de *Sesbania* nativas.

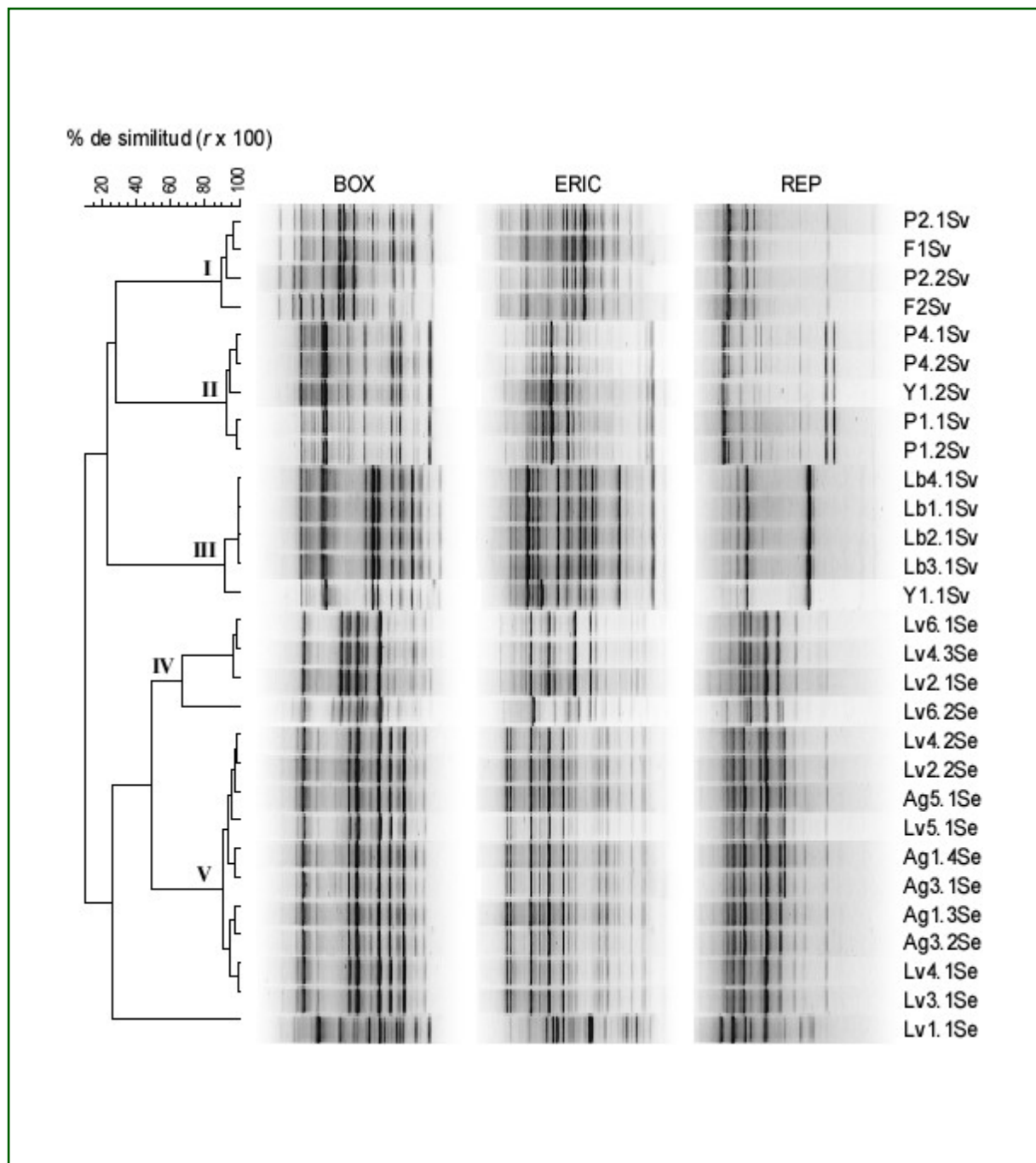


FIGURA 21. Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis combinado de los *fingerprints* de BOX-, ERIC- y REP-PCR de los aislamientos de *S. virgata* y *S. exasperata*. Los grupos se definieron a $r > 60\%$

Análisis combinado de los *fingerprints* de rep-PCR y ARDRA

Debido a que los aislamientos de *S. virgata* y *S. exasperata* pertenecen a géneros distintos, este análisis se presenta en forma separada para ambos grupos de rizobios. El resultado del análisis de la integración de la información provista por los distintos *fingerprints* genómicos, se muestra en la **Figura 22** para los aislamientos de *S. virgata* y en la **Figura 23** para los aislamientos de *S. exasperata*.

En ambas figuras puede verse que, en cada caso, las cepas de referencia utilizadas relacionadas a nivel de género ocupan una posición separada en el dendrograma, mientras que el agrupamiento de los aislamientos es similar al de rep-PCR.

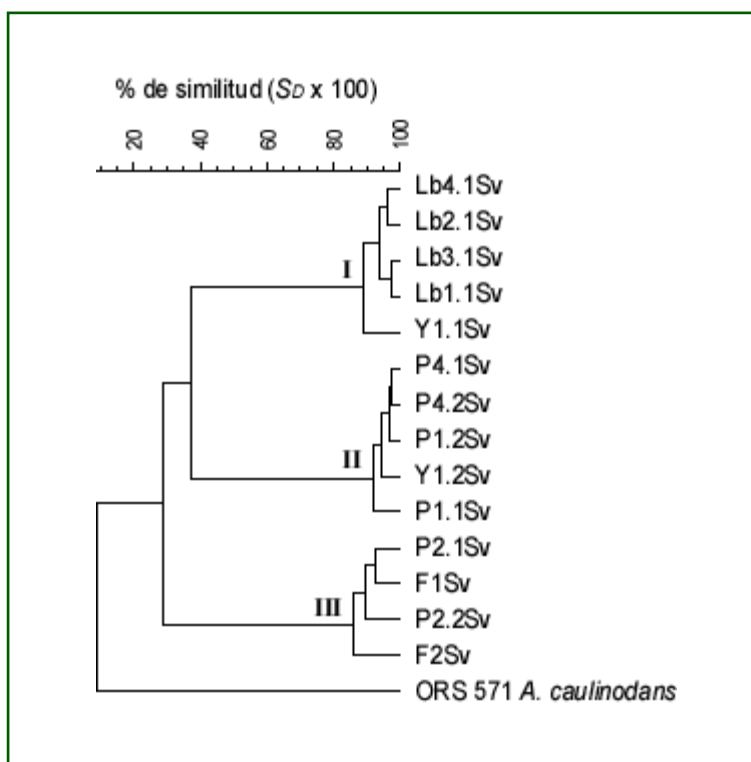


FIGURA 22. Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis combinado de los datos de rep-PCR y ARDRA para los aislamientos de *Sesbania virgata*

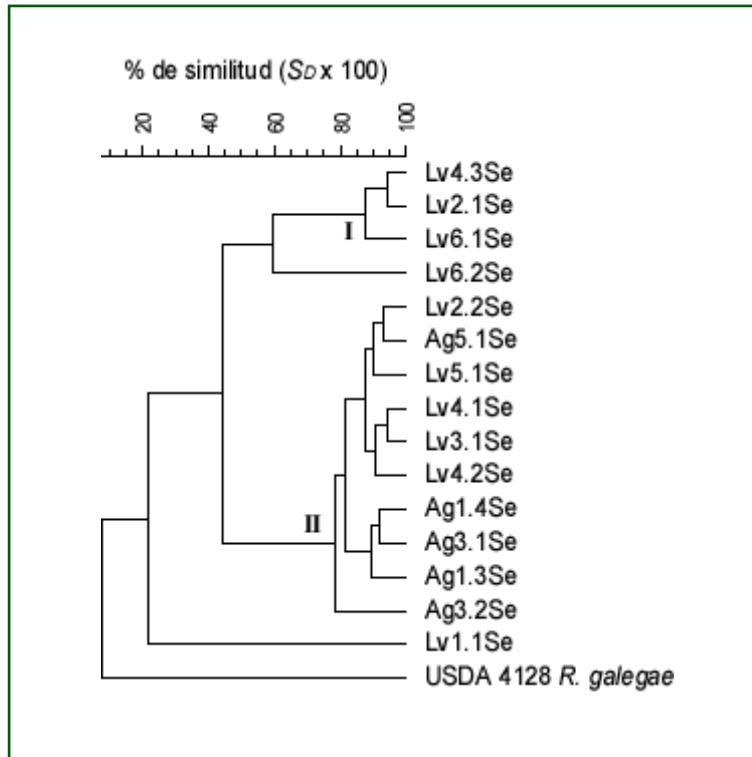


FIGURA 23. Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis combinado de los datos de rep-PCR y ARDRA para los aislamientos de *Sesbania exasperata*

IGS-RFLP

El análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA no se hizo con todos los aislamientos, sino que se eligieron cepas representativas de cada grupo de rep-PCR.

En todos los aislamientos de *S. virgata* y la cepa de referencia *A. caulinodans* ORS571^T se obtuvo un único producto de amplificación de igual tamaño (<1000 pb). Lo mismo ocurrió entre los aislamientos de *S. exasperata* excepto para la cepa Lv1.1Se, pero el producto de amplificación fue de distinto tamaño (>1000 pb). Las demás cepas de referencia de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* produjeron fragmentos de amplificación únicos de distintos tamaños, entre 1000 pb y 1400 pb.

Los resultados del análisis de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA con 4 enzimas se muestra en la **Figura 24**. Definiendo los grupos a un 60% de similitud, pueden describirse tres grupos. Los grupos I y II comprenden a los

aislamientos de *S. virgata*. A pesar del menor nivel de resolución de este método, las cepas de los distintos grupos de rep-PCR también pueden diferenciarse en este análisis.

El grupo III incluye a todas las cepas de *S. exasperata* excepto a dos, Lv1.1Se y Lv6.2Se, que ocupan posiciones separadas. En este caso se hace evidente el menor nivel de resolución taxonómica de este método con respecto a rep-PCR, ya que cepas con distintos *fingerprints* de rep-PCR presentan patrones de restricción idénticos de la región intergénica 16S-23S rDNA (cepas Lv6.1Se y Lv2.2Se).

Las cepas de referencia *A. caulinodans* y *R. galegae* ocupan posiciones separadas, relacionadas a los aislamientos de *S. virgata* o *S. exasperata*, respectivamente.

Estos resultados confirman la relación genética descrita entre las cepas en las otras técnicas de *fingerprinting* genómico utilizadas.

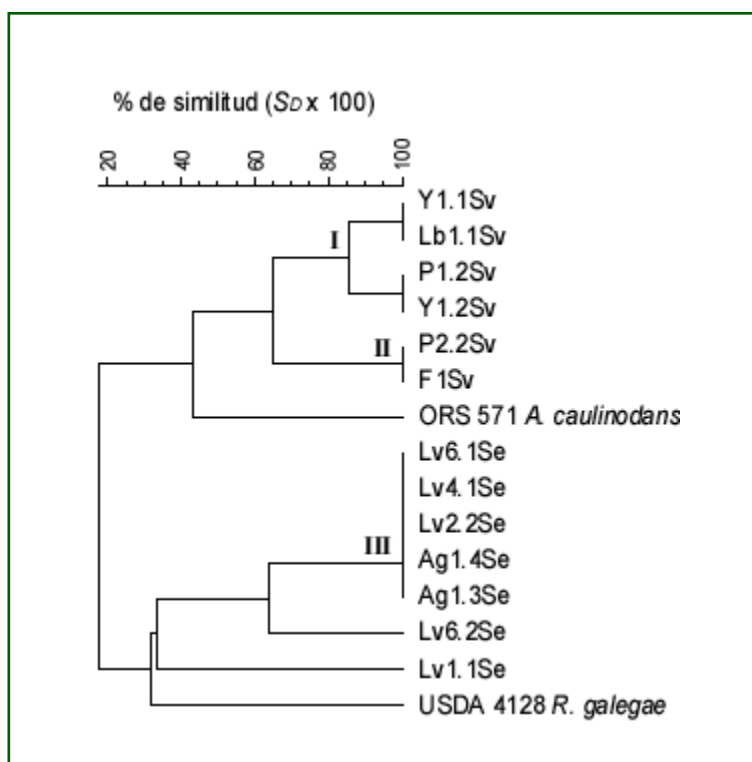


FIGURA 24. Análisis de agrupamiento (Dice/UPGMA) de los patrones de restricción de la región intergénica 16S-23S rDNA de aislamientos representativos de *S. virgata* y *S. exasperata* y cepas de referencia.

Relación filogenética de los aislamientos basada en el análisis de secuencia del gen 16S rRNA

Se determinó la secuencia casi completa del gen ribosomal 16S para la cepa F1Sv de *S. virgata* y para la cepa Lv6.1Se de *S. exasperata*. Las secuencias se depositaron en el GeneBank bajo los números de acceso AY301011 (1482 nucleótidos, cepa F1Sv) y DQ422964 (1446 nucleótidos, cepa Lv6.1Se).

El análisis de secuencia del 16S rDNA de la cepa F1Sv confirmó los resultados obtenidos por ARDRA. Esta cepa mostró solo un 97,6% de identidad de secuencia con la cepa tipo de *Azorhizobium caulinodans*. Sin embargo también se encontró depositada en el banco de datos, la secuencia del 16S rDNA de un aislamiento de *S. virgata* originario de Brasil (cepa SEMIA 6401) clasificado como *Azorhizobium* sp., con el que la cepa F1Sv posee un 99,4% de identidad de secuencia para este gen. Este aislamiento es la cepa tipo de una nueva especie dentro del género, *Azorhizobium doebereineriae*, muy recientemente descrita (Moreira *et al*, 2006).

En base a la secuencia del gen 16S rRNA, algunas de las cepas más relacionadas con el aislamiento Lv6.1Se de *Sesbania exasperata* resultado de la búsqueda en el GeneBank, y los resultados de los alineamientos de a pares de las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

| Cepa | Identidad con Lv6.1Se | Gaps | Origen |
|---|-----------------------|--------|---|
| <i>Rhizobium</i> sp. ORS1439 | 97% (1398/1430) | 0/1430 | <i>Argyrolobium uniflorum</i> Tunisia |
| <i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T | 97% (1405/1443) | 0/1443 | <i>Phaseolus vulgaris</i> Francia |
| <i>Sinorhizobium morelense</i> S-5 | 97% (1405/1443) | 0/1443 | |
| <i>Sinorhizobium morelense</i> Lc04 ^T | 97% (1386/1424) | 3/1424 | Suelo México |
| <i>Rhizobium daejeonense</i> L61 ^T | 96% (1378/1421) | 0/1421 | Biorreactor para tratamiento de cianuros |
| <i>Rhizobium huatlense</i> S02 ^T | 96% (1379/1434) | 6/1434 | <i>Sesbania herbacea</i> México |

La **Figura 25** muestra el árbol filogenético sin raíz construido utilizando las secuencias de las cepas F1Sv y Lv6.1Se y aquellas de organismos relacionados obtenidas del GeneBank.

La cepa F1Sv forma un grupo filogenético distinto (*bootstrap* 100%) junto con las cepas aisladas de *S. virgata* en Brasil, que incluye a la cepa tipo de *A. doebereineriae* (SEMIA 6401^T=BR 5401^T), en la rama de *Azorhizobium* relacionado a *A. caulinodans*^T y especies del género *Xanthobacter*.

La cepa Lv6.1Se se agrupa en la rama que contiene un aislamiento de *Argyrobium uniflorum* (*Mimosoideae*) de Tunisia clasificado como *Rhizobium* sp. (cepa ORS 1439) y las especies tipo de *Rhizobium giardinii* y *R. daejeonense*, aunque el nivel de confianza de este grupo es bajo (*bootstrap* 33,4%). El grupo que incluye a las cepas *Rhizobium* sp. ORS 1439, *R. giardinii* H152^T y Lv6.1Se tiene un nivel de confianza menor al 44% aún sobre 5000 repeticiones.

Utilización de sustratos carbonados

El perfil de utilización de sustratos carbonados obtenido utilizando las placas BIOLOG GN2 para las cepas de *S. virgata* y *S. exasperata* analizadas se resume en las tablas 5 y 6, respectivamente. En las tablas solo se muestran los sustratos que son utilizados por todas las cepas o los que permiten la diferenciación entre las mismas. Los resultados corresponden a las lecturas de absorbancia a las 48 horas para *Azorhizobium* y a las 24 horas para *Rhizobium*. En ambos se consideraron los valores de $A_{590} \geq 0,3$ como positivos (utilización del sustrato carbonado).

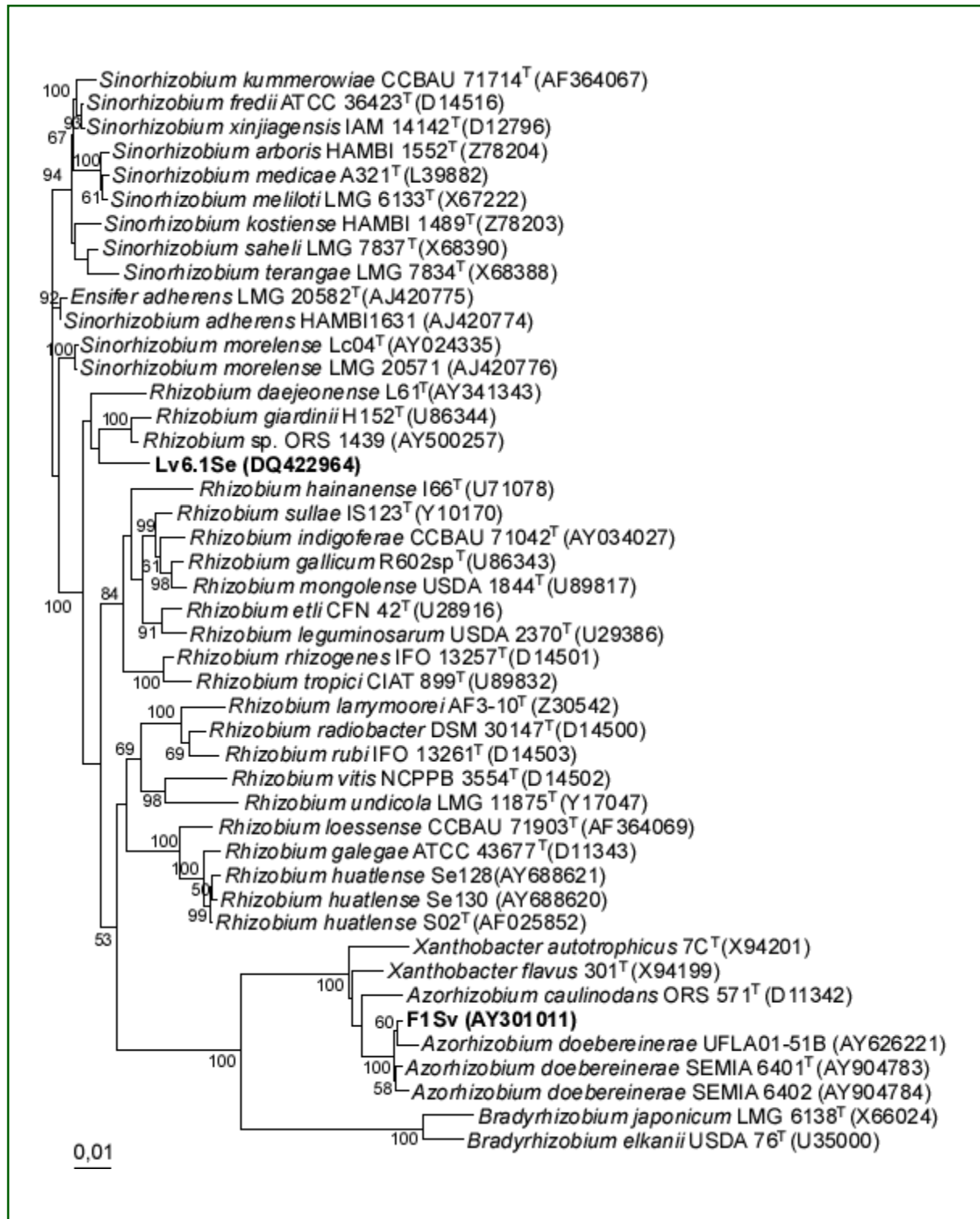


FIGURA 25. Relación filogenética basada en el análisis de secuencia del gen 16S rRNA de las cepas F1Sv (*S. virgata*) y Lv6.1Se (*S. exasperata*) con especies relacionadas de la clase *Alphaproteobacteria*. Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis y los valores de *bootstrap* de más del 50% (sobre 1000 repeticiones) se indican en los nodos. Barra: 0,01 sustitución/sitio

TABLA 5. Sustratos carbonados utilizados por las diferentes cepas y especies de *Azorhizobium*

| Fuente carbonada | <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571 ^T | F1Sv | P1.2Sv | Y1.1Sv | <i>Azorhizobium doebereineriae</i> ^a |
|-------------------------------------|---|------|--------|--------|---|
| Tween 40 | - | - | - | + | - |
| Tween 80 | - | - | - | + | - |
| Metil éster de ácido pirúvico | + | - | + | + | + |
| Mono metil éster de ácido succínico | + | + | + | + | + |
| Ácido acético | + | + | + | + | - |
| Ácido cis-acotínico | + | + | + | - | - |
| Ácido cítrico | + | + | + | - | - |
| Acido fórmico | + | + | + | + | + |
| Lactona de ácido D-galacturónico | + | - | - | - | - |
| Ácido D-galacturónico | + | + | + | + | - |
| Ácido D-glucónico | + | + | - | - | - |
| Ácido α-hidroxibutírico | + | - | - | - | + |
| Ácido β-hidroxibutírico | + | + | + | + | + |
| Ácido γ-hidroxibutírico | + | - | + | + | + |
| Ácido itacónico | - | + | - | - | - |
| Ácido α-cetoglutárico | + | - | - | - | - |
| Ácido D, L-láctico | + | + | + | + | + |
| Ácido propiónico | + | + | + | + | + |
| Ácido quínico | + | + | - | - | - |
| Ácido D-sacárico | + | + | - | + | - |
| Ácido sebaico | + | - | - | - | - |
| Ácido succínico | + | + | + | + | + |
| Ácido bromosuccínico | + | + | + | + | + |
| Ácido succinámico | + | - | + | + | - |
| L-alanina | + | - | - | - | - |
| Ácido L-aspártico | + | + | + | + | - |
| L-asparragina | - | + | - | - | - |
| Ácido L-glutámico | + | + | + | - | - |
| D-sorbitol | - | - | - | - | - |
| Ácido L-piroglutámico | + | + | + | + | - |
| Glicerol | + | - | - | - | - |

^a Datos tomados de Moreira *et al* (2006).

TABLA 6. Sustratos carbonados utilizados por las cepas de *Rhizobium* sp. (*Sesbania*) y *R. giardinii*.

| Fuente carbonada | Lv6.1Se | Ag1.3Se | Lv1.1Se | <i>Rhizobium giardinii</i> ^a |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---|
| Tween 40 | - | + | - | |
| Tween 80 | - | + | - | |
| N-acetyl D-glucosamina | + | + | + | + |
| L-arabinosa | + | + | - | + |
| D-arabitol | + | + | + | |
| D-celobiosa | + | + | - | |
| D-fructosa | + | + | - | + |
| L-fucosa | + | + | - | |
| D-galactosa | + | + | - | + |
| Gentiobiosa | + | + | + | |
| α -D-glucosa | + | + | + | + |
| m-inositol | + | + | + | + |
| α -D-lactosa | - | + | - | + |
| Maltosa | + | + | - | + |
| D-manitol | + | + | - | + |
| D-manosa | + | + | - | + |
| B-metil-D-glucósido | + | + | + | |
| D-melibiosa | - | - | - | + |
| D-rafinosa | - | - | - | + |
| L-ramnosa | + | + | + | + |
| D-sorbitol | + | + | + | + |
| Sacarosa | + | + | + | |
| D-trealosa | + | + | + | + |
| Turanosa | + | + | + | |
| Xylitol | - | + | - | |
| Metil éster de ácido pirúvico | + | + | + | |
| Mono metil éster de ácido succínico | - | + | - | |
| Ácido acético | + | + | - | |
| Ácido cítrico | + | + | - | - |
| Ácido fórmico | + | - | - | |
| Lactona de ácido D-galactónico | + | - | + | |
| Ácido D-galacturónico | + | + | + | |
| Ácido D-glucónico | - | - | - | + |
| Ácido D-glucurónico | + | + | - | + |
| Ácido α -hidroxibutírico | + | + | - | |
| Ácido β -hidroxibutírico | + | + | + | |
| Ácido α -cetoglutárico | + | + | - | + |
| Ácido α -cetovalérico | + | + | - | |
| Ácido D,L-láctico | + | + | + | |
| Ácido propiónico | + | + | - | |
| Ácido quínico | + | + | + | |

TABLA 6. (continuación)

| Fuente carbonada | Lv6.1Se | Ag1.3Se | Lv1.1Se | <i>Rhizobium giardinii</i> ^a |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---|
| Ácido succínico | + | + | - | |
| Ácido bromosuccínico | + | + | + | |
| L-alanina | - | - | - | + |
| L-alanil glicina | - | + | - | |
| L-asparragina | + | + | - | |
| Ácido L-aspártico | + | + | - | |
| L-histidina | - | - | - | + |
| Ácido L-glutámico | + | + | + | |
| L-hidroxiprolina | + | + | - | |
| L-leucina | - | + | - | |
| L-ornitina | + | + | - | |
| L-prolina | + | + | + | |
| Ácido γ -amino butírico | - | + | - | |
| Uridina | + | + | - | |
| Glicerol | + | + | - | + |
| α -D-glucosa 1-fosfato | - | + | + | |
| D-glucosa 6-fodfato | + | + | + | |
| Almidón soluble | - | - | - | + |

^a datos tomados de Amarger *et al* (1997).

En las **Tablas 5 y 6** puede verse que las cepas representativas de cada grupo de rep-PCR también pueden diferenciarse por su *fingerprint* metabólico basado en la utilización de sustratos carbonados. Lo mismo ocurre con las especies de *Azorhizobium*: hay 5 fuentes de carbono que utiliza la cepa *A. caulinodans*^T pero ninguna de las de *A. doebereinae* (Lactona de ácido D-galacturónico, ácido α -cetoglutámico, ácido sebaico, L-alanina y glicerol)

De las 95 fuentes de carbono ensayadas solo 11 fueron utilizadas por las tres cepas de *Sesbania virgata* analizadas y solo 7 por todas las cepas de *A. doebereinae* (mono metil éster de ácido succínico, ácido fórmico, ácido β -hidroxibutírico, ácido D, L-láctico, ácido propiónico, ácido succínico y ácido bromosuccínico). Esto indica que las cepas de *A. doebereinae* tiene un rango de utilización de compuestos carbonados mucho mas acotado que el de otras especies de rizobios incluyendo a *A. caulinodans*.

En los aislamientos de *S. exasperata* también pueden distinguirse las cepas representativas de cada grupo de rep-PCR por su perfil de utilización de sustratos carbonados. La cepa Lv1.1Se tuvo un comportamiento particular, la lectura de absorbancia a las 48 h indicó la utilización de solo una fuente de carbono (metil éster de ácido pirúvico). Los datos informados en la tabla corresponden a la lectura de las 72 h. Esto podría estar relacionado con las condiciones de pH óptimas para esta cepa.

Existen varias diferencias con respecto a las fuentes de carbono utilizadas por las cepas de *R. giardinii* (descriptas en la definición de la especie, Amarger *et al*, 1997) y por las cepas de *Rhizobium* sp. de *S. exasperata*. Hay al menos 5 compuestos que utilizan las cepas de *R. giardinii* pero no los aislamientos de *Rhizobium* sp. (*Sesbania*): D-melobiosa, D-rafinosa, ácido D-glucónico, L-alanina y L-histidina, y dos que utilizan las cepas aisladas de *S. exasperata* (excepto Lv1.1Se) pero no *R. giardinii* (ácido cítrico y ácido α -cetoglutárico). Además *R. giardinii* utiliza almidón soluble, característica que no poseen los rizobios de *S. exasperata*.

Características fisiológicas

Con respecto a la temperatura, los aislamientos de *S. exasperata* crecen a 40°C mientras que *R. giardinii* y *R. galegae* no. Las cepas de *S. virgata* también crecen a 40°C pero no a 43°C como *A. caulinodans*^T.

El crecimiento de las cepas de *S. exasperata* en medio YLA o YMA con distintas concentraciones de NaCl y pH alcalino fue similar, los resultados obtenidos en YMA se muestran en la **Tabla 7**.

TABLA 7. Crecimiento de las cepas aisladas de *S. exasperata* en distintas condiciones de pH alcalino y salinidad

| Cepa | pH 9 | | | pH 10 | | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | NaCl 1% | NaCl 2% | NaCl 3% | NaCl 1% | NaCl 2% | NaCl 3% |
| Lv6.1Se | + | + | - | + | +- | - |
| Ag1.3Se | + | + | - | + | +- | - |
| Lv1.4Se | + | + | + | + | + | +- |
| Lv1.1Se | + | - | - | ++ | + | +- |

Estos resultados indican que existen diferencias entre las cepas de *Rhizobium* sp. de *S. exasperata* y las cepas de *R. giardinii* con respecto a la tolerancia a la salinidad y al pH, ya que estas últimas no crecen en presencia de 2% de NaCl y crecen en el rango de pH 4-8,5 (Amarger *et al*, 1993). Otra diferencia es que *R. giardinii* no crece en medio Luria-Bertani (LB) y las cepas de *S. exasperata* sí lo hacen. Además utilizan urea.

Con respecto a la resistencia a antibióticos, al igual que las cepas de *R. giardinii* fueron resistentes a ácido nalidíxico (40 µg/ml), y sensibles a espectinomicina (5 µg/ml) y kanamicina (10 µg/ml).

Determinación de actividad nitrogenasa y crecimiento en N₂

Se detectó actividad nitrogenasa en vida libre para los aislamientos de *S. virgata* (*Azorhizobium*) y pero no para los de *S. exasperata* (*Rhizobium*).

La cepa F1Sv creció y expresó actividad nitrogenasa en medio LO semisólido, aunque la velocidad de crecimiento y la actividad fueron menores que en *A. caulinodans*.

En los ensayos de crecimiento en N₂ en cultivos en fermentador en medio LO bajo 3% de O₂, *A. caulinodans* ORS 571^T fue capaz de crecer mientras que la cepa F1Sv no. Esto probablemente se deba a diferencias en la sensibilidad al oxígeno de la expresión de la actividad nitrogenasa entre ambas cepas, ya que en los ensayos en el mismo medio pero semisólido, la cepa F1Sv creció pero a una distancia mayor de la superficie que *A. caulinodans*. Muy probablemente a una tensión de oxígeno menor al 3% en la fase gaseosa, la cepa F1Sv sería capaz de crecer en N₂ en cultivo líquido al igual que *A. caulinodans*.

Detección de genes de fijación de N₂

En los aislamientos de *S. exasperata* se investigó la presencia del gen *nifH* que codifica para la subunidad dependiente de Fe de la nitrogenasa. Solo se obtuvo amplificación positiva para las cepas de uno de los grupos de rep-PCR (grupo IV, cepas Lv6.2, Lv 6.1, Lv4.3 y Lv2.1), aún utilizando condiciones de amplificación menos rigurosas (**Figura 26**).

Todas las cepas nodulan efectivamente *S. exasperata*, por lo cual los resultados negativos en la detección del gen *nifH* no se deberían a la ausencia del gen sino a diferencias en su secuencia que no permiten una amplificación exitosa con los *primers* utilizados. Quizas las cepas correspondan a distintos biovares como los descritos para *R. giardinii*. A nivel molecular las cepas de *R. giardinii* bv. *giardinii* pueden diferenciarse de las cepas de *R. giardinii* bv. *phaseoli* por la ausencia de hibridización con una sonda que contiene el gen *nifH* aún bajo condiciones de hibridización poco rigurosas.

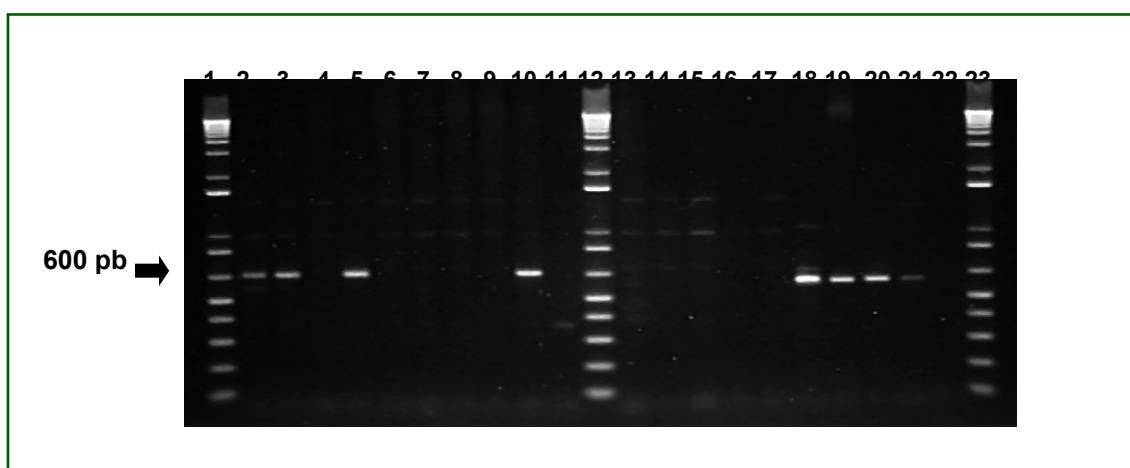


FIGURA 26. Detección por PCR del gen *nifH* en los aislamientos de *S. exasperata*

1, 12 y 23: 1Kb plus DNA Ladder, 2: Lv6.2Se, 3: Lv6.1Se, 4: Lv5.1Se, 5: Lv4.3Se, 6: Lv4.2Se, 7: Lv4.1Se, 8: Lv3.1Se, 9: Lv2.2Se, 10: Lv2.1Se, 11: Lv1.1Se, 13: Ag5.1Se, 14: Ag1.4Se, 15: Ag1.3Se, 16: Ag3.1Se, 17: Ag3.2Se, 18: *Sinorhizobium teranga*^T, 19: *S. saheli*^T, 20: *S. kostiense*^T, 21: *S. arboris*^T, 22: control negativo.

Perfil de plásmidos

En cepas representativas de *S. exasperata* se analizó el número de plásmidos y su tamaño relativo. Solo es una caracterización inicial ya que no se determinó su tamaño ni tampoco si estos poseen genes involucrados en la nodulación y en la fijación de nitrógeno, como es común que ocurra en algunos de los géneros de rizobios. En la **Figura 27** puede verse el perfil de plásmidos para las cepas analizadas. Todas poseen más de un plásmido de tamaño similar, y en la cepa Ag1.4Se, que pertenece al mismo grupo que la cepa Lv2.2Se, se observa la presencia de un plásmido de menor tamaño. En la cepa Lv1.1Se no se detectó la presencia de plásmidos.

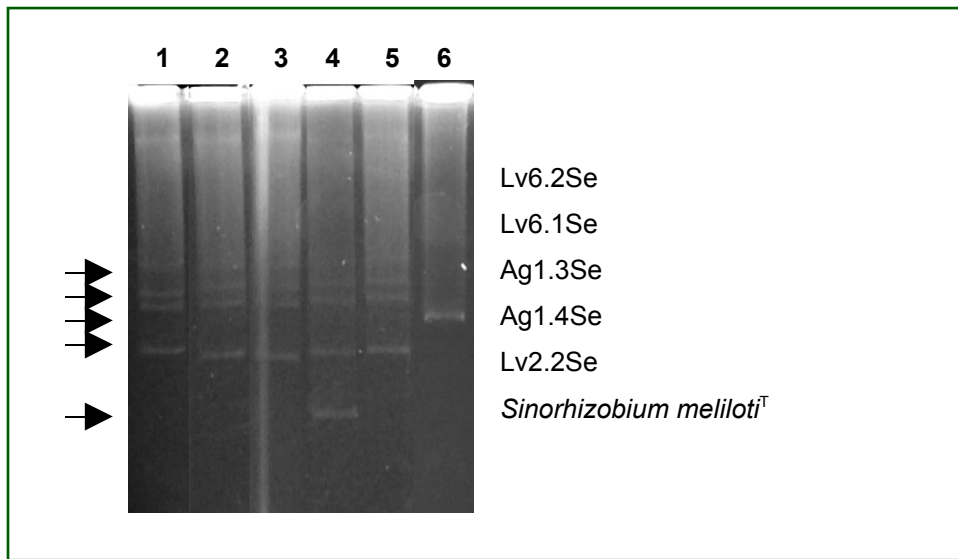


FIGURA 27. Perfil de plásmidos de aislamientos representativos de *Sesbania exasperata*

DISCUSSION

En este trabajo se utilizaron métodos de *fingerprinting* genómico con distintos niveles de resolución taxonómica para la caracterización de los rizobios de leguminosas nativas que nodulan en tallo, y para examinar la diversidad genética entre las cepas aisladas. El *fingerprinting* genómico por rep-PCR ha demostrado ser un método muy adecuado para diferenciar cepas de rizobios, y el análisis de agrupamiento de los *fingerprints* de rep-PCR de cepas relacionadas a nivel de especie o subespecie provee información acerca de su relación filogenética (Rademaker *et al*, 2000).

Aeschynomene y *Sesbania* son los dos géneros conocidos de leguminosas que nodulan en tallo. Las especies analizadas en este trabajo, *A. rudis*, *A. denticulata*, *S. virgata* y *S. exasperata*, son originarias del continente americano y se encuentran principalmente en Sudamérica (Burkart, 1952; Zuloaga y Morrone, 1999).

Casi todos los rizobios aislados de *A. rudis* y *A. denticulata*, las dos especies de *Aeschynomene* con mayor abundancia en las distintas regiones muestreadas, son rizobios fotosintéticos (**Tabla 1**). Este resultado es similar al encontrado en otra colección de rizobios aislados de *A. indica*, *A. sensitiva* y *A. tambacoudensis* (Molouba *et al*, 1999), e indican una clara correlación entre las características de nodulación y las propiedades fotosintéticas: los rizobios de especies de *Aeschynomene* que nodulan en tallo tienen la capacidad de producir pigmentos fotosintéticos. Esta correlación es casi del 100% cuando se trata de especies de *Aeschynomene* que pertenecen al grupo 3 de inoculación cruzada, ya que las 5 especies mencionadas pertenecen a este grupo. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en el trabajo de van Berkum *et al* (1995), donde solo el 48% de los rizobios aislados a partir de muestras de suelo capaces de nodular *A. indica* producen BChl y carotenos, y solo unos pocos acumulan BChl y carotenos en oscuridad. Esta diferencia en relación a las propiedades fotosintéticas de los aislamientos, probablemente se deba a la forma de obtención de los mismos. Mientras que en ese estudio se utilizó *A. indica* como planta trampa en muestras de suelo, en los otros las cepas se aislaron de plantas donde naturalmente ocurre esta simbiosis.

Entre los rizobios nativos aislados, todas las cepas que producen cantaxantina como pigmento principal (cepas tipo 1) también producen BChl y carotenos cuando crecen en oscuridad. Sin embargo, la propiedad de producir pigmentos en oscuridad, es una característica común en este tipo de cepas pero no es una propiedad exclusiva del grupo. Cuando crecen bajo iluminación continua, todas las cepas interrumpen la acumulación de BChl, pero en las cepas tipo 1 la acumulación de carotenos se ve

umentada (**Figura 5, e**). La cantaxantina es uno de esos carotenos que no tiene una función fotosintética conocida, probablemente actúe como un pigmento protector contra la radiación. Los resultados mostrados en este trabajo indican que este pigmento no forma parte del aparato fotosintético, ya que en los complejos fotosintéticos purificados, la cantaxantina no es detectable (**Figura 13**), y en la preparación de membranas este caroteno queda principalmente en la membrana más pesada (membrana H) que contiene restos de pared celular (**Figura 5, d**). Este último resultado concuerda con el posible rol de la cantaxantina como fotoprotector.

La caracterización genotípica por rep-PCR reveló la alta diversidad existente entre los rizobios fotosintéticos, la mayoría de los aislamientos resultaron ser cepas diferentes (**Figuras 6, 7 y 11**). Al nivel de resolución taxonómica del método de ARDRA, las diferencias entre las cepas fueron bajas (**Figura 8**). Según el criterio taxonómico actual, todas las cepas pertenecen al género *Bradyrhizobium*. Estos resultados son similares a los encontrados en otras colecciones de rizobios de *Aeschynomene* (Molouba *et al*, 1999; Willems *et al*, 2000; van Berkum *et al*, 2006). En el género *Bradyrhizobium* existe poca divergencia en la secuencia del gen 16S rRNA en las distintas especies (Willems *et al*, 2001a). Mediante estudios de hibridización DNA-DNA, que es el criterio principal para el delineamiento de especies, se han reconocido 11 especies genómicas o genoespecies en *Bradyrhizobium*, y se encontró que las cepas de bradyrizobios fotosintéticos analizadas pertenecen al menos a dos de estas genoespecies (Willems *et al*, 2001c).

Para evaluar la diversidad general existente entre los aislamientos y su relación filogenética, se integró la información provista por ARDRA y rep-PCR. La mayoría de los aislamientos fotosintéticos pueden incluirse en uno u otro de los dos grupos principales (**Figura 9**, grupos IV y V). Las principales diferencias fenotípicas entre ellos están relacionadas con el tipo de carotenos que producen y la acumulación de pigmentos fotosintéticos en oscuridad. Las cepas tipo 1, que conforman un grupo de pigmentación particular, podrían constituir un grupo de bradyrizobios fotosintéticos diferentes del resto. El análisis IGS-RFLP es una fuente diferente de evidencia molecular de su relación genética. Este método de *fingerprinting* produce un agrupamiento similar de las cepas analizadas e ilustra la consistencia de los resultados (**Figura 10**).

Estudios comparativos en diferentes géneros bacterianos, mostraron una alta correlación entre la relación genética que surge del análisis de rep-PCR o AFLP y los grupos de hibridización de DNA, lo que sugiere que estos métodos de *fingerprinting*

genómico pueden servir para estimar la relación entre aislamientos a este nivel (Nick *et al*, 1999; Rademaker *et al*, 2000; Willems *et al*, 2001b). En el presente estudio, se ve que casi todos los aislamientos fotosintéticos que producen cantaxantina, se agrupan juntos en un grupo particular en todos los análisis de agrupamiento utilizados (**Figuras 6, 9 y 10**), y podrían pertenecer a una misma geno-especie. Este resultado no establece si esta geno-especie es diferente o no de la del resto de los aislamientos, y los datos de hibridación DNA-DNA son estrictamente necesarios para determinar la relación entre ellos y con otras cepas. Si bien se realizaron estudios de hibridación DNA-DNA en algunas cepas fotosintéticas aisladas de *Aeschynomene*, su posición taxonómica a nivel de especie aún no se ha establecido (Willems *et al*, 2001c, Vinuesa *et al*, 2005b). Además, si bien la mayoría de las especies de *Bradyrhizobium* poseen solo un tipo o copia del operón ribosomal, algunas de las cepas de rizobios fotosintéticos poseen secuencias múltiples de la región intergénica 16S-23S rDNA (Willems *et al*, 2001b, 2003). Los resultados de IGS-RFLP de las cepas analizadas en el presente trabajo, también indican la presencia de al menos dos tipos de regiones intergénicas 16S-23S rDNA en algunos de los aislamientos.

En base a la similitud de secuencia del gen ribosomal 16S, todas las cepas de rizobios fotosintéticos de *Aeschynomene* spp. hasta ahora analizadas, conforman un grupo filogenético distinto dentro del grupo de *Bradyrhizobium* (**Figura 12**). Como se sugirió previamente, estos rizobios constituirían una especie diferente (So *et al*, 1994; Fleischman y Kramer, 1998; Willems *et al*, 2001c, Vinuesa *et al*, 2005b). Cepas aisladas de regiones geográficas distantes y de especies de *Aeschynomene* diferentes, poseen una similitud de secuencia del 16S rDNA muy alta (99%). Sin embargo, existe una alta diversidad de cepas y la regulación de la expresión del aparato fotosintético en estas cepas parece ser diferente.

A diferencia de la cepa C7T1, en las cepas BTAi1 y ORS278 la acumulación de BChl y carotenos es máxima bajo condiciones de crecimiento aeróbicas e iluminación cíclica. No acumulan pigmentos en oscuridad y la regulación por la calidad de luz de la expresión del aparato fotosintético es mediada por bacteriofitocromo. En la cepa C7T1, si bien el O₂ es absolutamente necesario para el crecimiento, tiene un efecto inhibitorio sobre la cantidad de aparato fotosintético formado en las membranas, y parte de esta regulación ocurre a nivel transcripcional. Esto se confirmó en los estudios de expresión del operón fotosintético, donde se observó una mayor expresión de los genes de la antena en condiciones de semi y microaerobiosis (**Figura 17**). Este comportamiento es similar al observado tanto en bacterias púrpuras anoxigénicas como en bacterias fotosintéticas aeróbicas, pero no en otros bradyrizobios fotosintéticos. En las cepas

BTAi1 y ORS278 la tensión de oxígeno tiene un efecto opuesto al observado en la cepa C7T1, ya que BTAi1 produce la máxima cantidad de BChl a la concentración de oxígeno atmosférica (Wettlaufer y Hardy, 1995), y en la cepa ORS278 la actividad fotosintética depende de condiciones aeróbicas y la expresión del operon *puf* requiere de un mínimo de 3% de O₂ (Giraud *et al*, 2000). En las bacterias fotosintéticas aeróbicas la expresión del aparato fotosintético en relación a la tensión de oxígeno es diferente en las distintas especies. En *Roseobacter denitrificans* la tensión de oxígeno no afecta los niveles de los transcritos *puf* ni la cantidad de pigmentos acumulados (Nishimura *et al*, 1996), en cambio, en *Roseateles depolymerans* la expresión del operon *puf* y la acumulación de BChl es máxima bajo condiciones micro y semiaeróbicas (Suyama *et al*, 2002).

Estudios previos han mostrado que dentro del nódulo los bacteroides expresan tanto la actividad nitrogenasa como la de fotosíntesis (Evans *et al*, 1990; Fleischman y Kramer, 1998; Giraud *et al*, 2000). Debido a que en las cepas BTAi1 y ORS278 la actividad fotosintética bacteriana depende de condiciones aeróbicas (Wettlaufer y Hardy, 1995; Giraud *et al*, 2000) y la fijación de nitrógeno ocurre solo bajo condiciones microaeróbicas, debe existir una regulación fina de la tensión de oxígeno en los bacteroides para que ambas actividades pueden operar simultáneamente. A diferencia de ambas cepas, la cepa C7T1 bajo condiciones de microaerobiosis en cultivo *ex planta* expresa tanto su actividad fotosintética como su actividad nitrogenasa.

Con respecto a la importancia de la actividad fotosintética bacteriana en la simbiosis, estudios realizados con distintas cepas mostraron resultados diferentes. En la cepa BTAi1 se observó un aumento en la actividad de reducción de acetileno en respuesta a la luz (Hungria *et al*, 1993), lo que sugiere que la actividad fotosintética bacteriana podría proveer energía adicional al bacteroide para la fijación de N₂, disminuyendo así la demanda de fotosintatos a la planta. En la cepa ORS278 se determinó que la actividad fotosintética bacteriana juega un rol más importante en los primeros pasos de la infección y en la eficiencia de la nodulación en tallo, que como fuente de energía requerida para la actividad nitrogenasa. La inoculación en tallo de *A. sensitiva* con la mutante no fotosintética disminuyó en un 50% el número de nódulos formados, lo cual redujo la fijación de N₂ y en consecuencia el crecimiento de la planta. Estas diferencias se observaron para la nodulación en tallo pero no en raíz. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la actividad nitrogenasa ni en la estructura de los nódulos de tallo formados por la cepa fotosintética y por la mutante no fotosintética (Giraud *et al*, 2000).

En la cepa C7T1 la iluminación de los cultivos no tuvo efecto positivo sobre la actividad nitrogenasa de la bacteria (**Figura 19**). Este comportamiento es diferente al informado para la cepa BTAi1 pero el resultado es similar al observado en la cepa ORS278, en la cual tampoco se detectó un efecto directo de la actividad fotosintética bacteriana sobre la actividad nitrogenasa dentro del nódulo (Giraud *et al*, 2000).

Estos resultados no excluyen el posible aporte de energía adicional de la actividad fotosintética bacteriana en la fijación de nitrógeno, solo indican que este aporte parece no ser muy importante.

La regulación por luz mediada por bacteriofitocromo en los rizobios fotosintéticos no explica la ausencia de acumulación de bacterioclorofila en luz continua, ni la producción de pigmentos fotosintéticos en oscuridad. Si bien en la cepa C7T1 la acumulación de BChl en semi o microaerobiosis es mayor bajo ciclos luz-oscuridad, en condiciones aeróbicas la luz parecería no tener un efecto estimulador ya que la cantidad de BChl acumulada en oscuridad o bajo iluminación cíclica es similar.

La alta expresión de los genes de la antena en cultivos de la cepa C7T1 crecidos bajo condiciones aeróbicas o semiaeróbicas y luz continua (**Figura 17**), y la no detección de los complejos fotosintéticos o BChl acumulada en las membranas, indica una regulación adicional por la luz mediante mecanismos de control a nivel postranscripcional, similar al observado en *Rhodobacter capsulatus* (Zucconi y Beatty, 1988). Esta bacteria cuando crece bajo alta intensidad de luz, contiene aproximadamente 4 veces más *puc* mRNA que cuando crece en baja intensidad de luz, y su vez una cantidad de complejos fotosintéticos LH2 4 veces menor.

En mutantes de la cepa ORS278 con fusiones *lacZ* en diferentes genes fotosintéticos esenciales (*pufL*, *bchC* y *crtI*) se observó una fuerte actividad β -galactosidasa en cultivos crecidos bajo luz continua (Giraud y Fleischman, 2004). Si bien como se sugiere en ese trabajo esta regulación por luz podría estar relacionada con una disminución en la estabilidad de los transcritos, parece no ser el mecanismo más importante ya que en la cepa C7T1, independientemente de la condición de oxigenación, se observaron altos niveles del *pufBA* mRNA en cultivos crecidos bajo luz continua (**Figura 17**). Según estos resultados, la regulación sería a nivel postraducciona

Estos mecanismos aún no se conocen, pero la ventaja de este tipo de regulación postranscripcional podría ser que permitiese a las células una rápida adaptación a las

condiciones de fotosíntesis, ya que no requeriría la iniciación *de novo* de la transcripción de los genes de los polipéptidos que unen pigmentos.

La acumulación de BChl en oscuridad en la cepa C7T1 podría deberse a la ausencia del regulador PpsR2 en esta bacteria. En *Bradyrhizobium* sp. ORS278 la proteína PpsR2 tiene un efecto represor en la acumulación del fotosistema, y este efecto es antagonizado en forma indirecta por bacteriofitocromo (*BrBphP*). Los genes regulados por PpsR2 en la cepa ORS278 son *bch*, *ctr* y *cycA*, que codifican respectivamente, proteínas involucradas en la síntesis de bacterioclorofila y carotenos y el citocromo c_2 (Jaubert *et al*, 2004). La cepa C7T1 acumula cantidades similares de BChl cuando crece bajo ciclos de luz-oscuridad, oscuridad o luz continua de 660 nm o 760 nm (**Figura 18**). Esto indica que la regulación por luz no es mediada por *BrBphP*, y la expresión de los genes que intervienen en la síntesis de BChl no está reprimida por PpsR2. El fenotipo de la cepa C7T1 es similar al observado en la cepa mutante ORS278 Δ *ppsR2* (mutante con una inserción *lacZ-kan^r* en el gen *ppsR2*), en *Rps. palustris* CGA009 y en *Roseateles depolymerans* 61A. La cepa CGA009 tiene una mutación puntual en el dominio HTH de unión al DNA de PpsR2, y *R. depolymerans* tiene una proteína que muestra homología con la parte N-terminal de PpsR2 pero no posee el dominio HTH de unión al DNA (Suyama *et al*, 2002; Giraud *et al*, 2004b). *R. depolymerans* 61A pertenece al grupo de las bacterias fotosintéticas aeróbicas, e igual que *Bradyrhizobium* sp. C7T1 produce pigmentos fotosintéticos en la oscuridad y su síntesis es regulada por la fuente de carbono disponible (Suyama *et al*, 2002).

La producción de pigmentos en la oscuridad no es una característica poco común entre los rizobios fotosintéticos, ya que las cepas que producen BChl en la oscuridad representaron al 30% de las cepas analizadas en este trabajo, y este resultado es similar al obtenido en otra colección (van Berkum *et al*, 1995).

Las especies de *Sesbania* nativas, *Sesbania virgata* y *S. exasperata*, si bien forman nódulos en el tallo que superficialmente se parecen a los de *S. rostrata*, éstos están restringidos a la parte baja del mismo y el anegamiento es un requisito indispensable para su desarrollo. Por esto se las clasifica dentro del grupo III de las leguminosas que nodulan en tallo, y no son leguminosas que verdaderamente nodulen en tallo. La estructura de los nódulos de *S. exasperata* ha sido analizada y a pesar de su apariencia no pueden describirse como nódulos de tallo (James *et al*, 2001).

Entre los rizobios nativos de las especies de *Sesbania* analizadas también se encontró una alta diversidad genética entre los aislamientos, aunque con una alta

proporción de cepas hermanas (**Figura 21**). Esto último podría ser consecuencia de la mayor competitividad de las cepas con estos genotipos en el establecimiento de la simbiosis.

La caracterización genotípica de los rizobios de *Sesbania* muestra que las distintas especies vegetales establecen una relación simbiótica con rizobios de especies taxonómicamente distantes. Según el análisis filogenético basado en la secuencia del gen ribosomal 16S, los rizobios de *S. virgata* pueden clasificarse como *Azorhizobium doebereinae*, y los rizobios de *S. exasperata* como *Rhizobium* sp. dentro del grupo filogenético que incluye a las cepas tipo de *R. giardinii* y *R. daejeonense* (**Figura 25**).

Azorhizobium doebereinae es una nueva especie recientemente descrita (Moreira *et al*, 2006) pero aún no publicada válidamente. Es importante destacar que a pesar de las numerosas especies nuevas descritas entre los rizobios, el género *Azorhizobium* solo contenía una única especie: *A. caulinodans* microsimbionte de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al*, 1988). Las cepas de *A. doebereinae* establecen una relación simbiótica altamente específica y solo efectiva con *S. virgata* y *S. punicea*. La caracterización de algunas cepas aisladas de *S. punicea* de Entre Ríos realizada pero no mostrada en este trabajo, indica que estas cepas están genéticamente muy relacionadas a las cepas de *S. virgata*.

La determinación de la utilización de sustratos carbonados por las cepas aisladas mostró que de las 95 fuentes de carbono ensayadas solo 11 son utilizadas por las tres cepas de *S. virgata* analizadas y solo 7 por todas las cepas de *A. doebereinae* (**Tabla 5**). *A. caulinodans* y *A. doebereinae* no utilizan sacarosa ni manitol como única fuente de carbono, compuestos que sí utilizan la mayoría de las cepas de rizobios de los otros géneros. Las cepas de *A. doebereinae* tienen un rango de utilización de compuestos carbonados acotado, lo cual podría estar relacionado con una baja capacidad saprofítica y una baja presencia en el suelo en ausencia de la planta hospedadora (Veasey *et al*, 1997; Moreira *et al*, 2006).

La cepa F1Sv y todas las cepas de *A. doebereinae* fijan N₂ en vida libre confirmando así esta característica particular del género *Azorhizobium*.

La caracterización realizada de las cepas de *S. exasperata* solo permite clasificarlas hasta el nivel de género. La secuencia del gen 16S rRNA de la cepa Lv6.1Se presenta homología con aquellas de cepas de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. La

identidad de secuencia con *R. giardinii* H152^T es 97,4% y con *S. morelense* Lc04^T (sinónimos *Ensifer morelense*, *E. adherens*) 97,3%.

El árbol filogenético sin raíz que incluye las distintas especies de rizobios muestra que la cepa Lv6.1Se se agrupa con la cepa tipo de *R. giardinii*, que fue aislada de *Phaseolus vulgaris* en Francia. Sin embargo como la similitud de secuencias del 16S rDNA es baja y cercana al límite inferior de identidad para cepas dentro de una misma especie, se requieren ensayos de hibridación DNA-DNA para decidir si pertenecen o no a la misma especie. Organismos que tienen menos de un 97,0% de homología de secuencia del 16S rDNA no presentan valores de reasociación DNA-DNA de más del 60%. Y a valores de homología de secuencia del rRNA por debajo de aproximadamente 97,5% es improbable que dos organismos tengan más de 60-70% de similitud de DNA, para estar entonces relacionados a nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994).

Una caracterización reciente de 3 aislamientos obtenidos de nódulos de *S. exasperata* nativa de Venezuela, los clasificó como *Rhizobium huatlense* (Vinuesa *et al*, 2005a). Estas cepas pueden establecer una relación simbiótica eficiente con *Sesbania rostrata*, *Phaseolus vulgaris* y *Macroptilium atropurpureum*, y a pesar de tener un perfil de plásmidos similar al de la cepa tipo de *R. huatlense* aislada de *S. herbacea* en México, sus rangos de hospedador son diferentes. Dos de estos aislamientos, Se130 y Se128, se incluyeron en el análisis filogenético de la **Figura 25**.

Las cepas nativas de *S. exasperata* no poseen varias de las características descritas en la definición de la especie *R. giardinii* (Amarger *et al*, 1997). Existen diferencias en las propiedades fenotípicas con respecto a la utilización de sustratos carbonados (**Tabla 6**), en la tolerancia al pH alcalino, la salinidad (**Tabla 7**) y la temperatura de crecimiento. Si bien existen algunas diferencias entre los aislamientos de los distintos grupos, a diferencia de *R. giardinii*, todos crecen a 40°C y a pH 9-10 en presencia de 2% de NaCl. Además son fácilmente diferenciables de las cepas de *R. giardinii* ya que las cepas de *S. exasperata* crecen en medio LB.

En *R. giardinii* se han descrito dos biovares: bv. *phaseoli* y bv. *giardinii*. Si bien ambos biovares nodulan *Phaseolus* spp. y *M. atropurpureum*, las cepas de *R. giardinii* bv. *phaseoli* no nodulan *Leucaena leucocephala* y son poco efectivas en la fijación de N₂ con *P. vulgaris*, y las de *R. giardinii* bv. *giardinii* nodulan *L. leucocephala* pero no son capaces de fijar N₂ con *P. vulgaris* (Amarger *et al*, 1997). Las cepas de *S.*

exasperata no nodulan *P. vulgaris* ni *M. lathyroides*, pero queda por determinar si son capaces de nodular especies de poroto silvestres y *Leucaena* spp..

Para determinar la posición taxonómica de los rizobios aislados de *S. exasperata* a nivel de especie es necesario realizar estudios adicionales. Entre estos, el análisis de ácidos grasos celulares quizás sea el más conveniente para analizar la relación de los aislamientos de *S. exasperata* con *R. giardinii*, ya que el perfil de ácidos grasos en esta especie parece ser único y posee comparativamente poca similitud con otras especies (Tighe *et al*, 2000). Además es necesario el análisis de varios genes "housekeeping", como *atpD*, *recA* y *gln*, y de genes *nif* y *nod*, involucrados en la fijación de N₂ y en la simbiosis. Los estudios de reasociación DNA-DNA son imprescindibles para establecer si constituyen o no una especie novedosa entre los rizobios.

En este trabajo se logró la caracterización de los rizobios que nodulan especies de leguminosas nativas que tienen un uso potencial como abonos verdes o para la recuperación de suelos degradados. Las cepas de rizobios naturalmente dominantes en cada una de las especies, podrían utilizarse para la formulación de inoculantes.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo indican que los rizobios fotosintéticos de *Aeschynomene* son genómicamente diversos al igual que sus características fotobiológicas. El oxígeno tiene un efecto opuesto en la expresión del aparato fotosintético en las distintas cepas. A diferencia de las cepas BTAi1 y ORS278, en la cepa C7T1 la acumulación de BChl y la expresión de los genes de los polipéptidos que unen BChl es máxima en condiciones microaeróbicas. Si bien en base al análisis de gen 16S rRNA todas pertenecen a un grupo filogenético distinto dentro de *Bradyrhizobium*, las cepas BTAi1, ORS278 y probablemente C7T1 pertenecen a genoespecies diferentes. La relación filogenética con *Rps. palustris* sugiere que estas bacterias podrían haber evolucionado hasta convertirse en bacterias aeróbicas que conservan la fotosíntesis como un carácter ancestral y una vía metabólica accesoria utilizada bajo condiciones de limitación de nutrientes.

Los rizobios aislados de *S. virgata* y *S. exasperata* también son genéticamente diversos. Su identificación indica que cada una de las especies establece una relación simbiótica con una especie de rizobio perteneciente a géneros taxonómicamente distantes: *Azorhizobium* y *Rhizobium*. En algunos casos, una misma especie de leguminosa nativa desarrolla una relación simbiótica natural con rizobios de distintas especies en las diferentes áreas biogeográficas. Esto ocurre con las especies nativas de *S. exasperata* en Argentina y Venezuela, pero no con *S. virgata* en Argentina y Brasil.

La caracterización de los simbioses de cualquiera de las más de 700 especies de leguminosas descritas en Argentina, en ecosistemas aún no explorados, seguramente revelará una diversidad adicional entre los rizobios nativos.

Firma Tesista

Firma Director de tesis

BIBLIOGRAFIA

Ákos TK, Rákhely G, Kovács K (2005) The PpsR regulator family. *Res Microbiol* 156: 619-625.

Aguilar OM, Lopez MV, Ricillo P (2001) The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J Biotechnol* 91: 181-188.

Alazard D (1985) Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl Environ Microbiol* 50: 732-734.

Alazard D (1990) Nitrogen fixation in pure culture by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. *FEMS Microbiol Lett* 68: 177-182.

Alazard D, Duhoux E (1988) Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. *J Plant Physiol* 132: 123.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

Amarger N, Macheret V, Laguerre G (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* 47:996-1006.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JC, Struhl KS (1994) *Current protocols in molecular biology*, section 2.4., John Wiley and Sons, New York.

Bala A, Murphy P, Giller K (2002) Occurrence and genetic diversity of rhizobia nodulating *Sesbania sesban* in African soils. *Soil Biol Biochem* 34: 1759-1769.

Bauer CE, Elsen S, Swem LR, Swem DL, Masuda S (2003) Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 147-154.

Becker M, Ladha JK, Ottow JCG (1988) Stem nodulating legumes as green manure for lowland rice. *Phillip J Crop Sci* 13: 121.

Boivin C, Ndoye I, Gilles L, Ndiaye A, de Lajudie P, Dreyfus B (1997a) The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. *Appl Environ Microbiol* 63: 1040-1047.

Boivin C, Ndoye I, Molouba F, de Lajudie P, Dupuy N, Dreyfus B (1997b) Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms and unusual characteristics. *Crit Rev Plant Sci* 16: 1-30.

Braatsch S, Gomelsky M, Kupal S, Klug G (2002) A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* 45: 827-836.

Burkart A (1952) *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. Acme, Buenos Aires, Argentina.

Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Ba A, Gillis M, de Lajudie P, Dreyfus B (2000) Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl Environ Microbiol* 66: 5437-5447.

Chaintreuil C, Boivin C, Dreyfus B, Giraud E (2001) Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of *nodA*. *FEMS Microbiol Lett* 194: 83-86.

Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Bena G, Boivin-Masson C (2003) Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185: 7266-7272.

Clayton RK (1966) Spectroscopic analysis of Bchl in vivo and in vitro. *Photochem Photobiol* 5: 669-677.

Debashis R, Krishnan HB (1995) A new root-nodulating symbiont of the tropical legume *Sesbania*, *Rhizobium* sp. SIN-1, is closely related to *R. galegae*, a species that nodulates temperate legumes. *FEMS Microbiol Lett* 134: 19-25.

de Bruijn FJ (1989) The unusual symbiosis between the diazotrophic stem nodulating bacterium *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and its host, the tropical legume *Sesbania rostrata*, p. 457. Plant-Microbe Interactions, vol 3, Kosuge T, Nester EW eds. Mac Graw Hill, New York.

de Bruijn FJ (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. App Environ Microbiol 58: 2180-2187.

de Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus BL, Kersters K, Gillis M (1994) Polyphasic taxonomy of rhizobia. Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.. Int J Syst Bacteriol 44: 715-733.

de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindström K, Dreyfus B, Gillis M (1998) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov.. Int J Syst Bacteriol 48: 369-382.

Dénarié J, Débellé F, Promé JC (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu Rev Biochem 65: 503-535.

Doignon-Bourcier F, Abdoulaye S, Willems A, Torck U, Dreyfus B, Gillis M, de Lajudie P (1999) Diversity of bradyrhizobia from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal. System Appl Microbiol 22: 647-661.

Doignon-Bourcier F, Willems A, Coopman R, Laguerre G, Gillis M, de Lajudie P (2000) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. Appl Environ Microbiol 66: 3987-3997.

Dreyfus BL, Dommergues YR (1981) Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol Lett 10: 313-317.

Dreyfus BL, Elmerich C, Dommergues YR (1983) Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. *Appl Environ Microbiol* 45: 711-713.

Dreyfus BL, Garcia JL, Gillis M (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bacteriol* 38: 89-98.

Eaglesham ARJ, Szalay AA (1983) Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. *Plant Sci Lett* 29: 265-272.

Eaglesham ARJ, Ellis JM, Evans WR, Fleischman DE, Hungria M, Hardy RWF (1990) The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium* p.805-811. *Nitrogen Fixation: achievements and objectives*, Gresshoff PM, Roth LE, Stacey G, Newton WE, eds. Chapman and Hall, New York.

Eardly BD, Young JPW, Selander RK (1992) Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl Environ Microbiol* 58: 1809-1815.

Elsen S, Jaubert M, Pignol D, Giraud E (2005) PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria. *Mol Microbiol* 57: 17-26.

Evans W, Fleischman DE, Calvert HE, Pyati PV, Alter GM, Subba Rao NS (1990) Bacteriochlorophyll and bacterial reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1. *Appl Environ Microbiol* 56: 3445-3449.

Evans K, Fordham-Skelton AP, Mistry H, Reynolds CD, Lawless AM, Papiz MZ (2005) A bacteriophytochrome regulates the synthesis of LH4 complexes in *Rhodospseudomonas palustris*. *Photosynth Res* 85: 169-180.

Felsenstein J (1995) PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.57c, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Ferreira MC, Hungria M (2002) Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crop Res* 79: 139-152.

Fleischman DE, Evans WR, Miller IM (1995) Bacteriochlorophyll-containing *Rhizobium* species, p. 123-136. *Anoxygenic Photosynthetic bacteria*, Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Fleischman D, Kramer DM (1998) Photosynthetic rhizobia. *Biochim Biophys Acta* 1364: 17-36.

Giraud E, Hannibal L, Fardoux J, Verméglio A, Dreyfus B (2000) Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. *Proc Natl Acad Sci* 97: 14795-14800.

Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B, Verméglio A (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* 417: 202-205.

Giraud E, Fleischman D (2004) Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynth Res* 82: 115-130.

Giraud E, Hannibal L, Jaubert M, Jourand P, Dreyfus B, Sturgis J, Verméglio A (2004a) Two distinct *crt* gene clusters for two different functional classes of carotenoids in *Bradyrhizobium*. *J Biol Chem* 279: 15076-15083.

Giraud E, Zappa S, Jaubert M, Hannibal L, Fardoux J, Adriano JM, Bouyer P, Genty B, Pignol D, Verméglio A (2004b) Bacteriophytochrome and regulation of synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodospseudomonas palustris*: pitfalls of using laboratory strains. *Photochem Photobiol Sci* 3: 587-591.

Giraud E, Zappa S, Vuillet L, Adriano JM, Hannibal L, Fardoux J, Berthomieu C, Bouyer P, Pignol D, Verméglio A (2005) A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antenna synthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *J Biol Chem* 16: 32389-32397.

Gomes Germano M, Menna P, Mostasso FL, Hungria M (2006) RFLP analysis of the rRNA operon of Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 217-229.

Gould JM, Cather R, Winget GD (1972) Advances on the use of Cerenkov counting for determination of ³²P in photophosphorylation research. *Anal Biochem* 50: 540-548.

Gregor J, Klug G (1999) Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett* 179: 1-9.

Häne B, Jäger K, Drexler HG (1993) The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA *fingerprints* profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis* 14: 967-972.

Hannibal L, Lorquin J, Dortoli NA, Garcia N, Chaintreuil C, Boivin C, Dreyfus B, Giraud E (2000) Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278. *J Bacteriol* 182: 3850-3853.

Heyndrickx M, Vauterin L, Vandame, P, Kersters K, De Vos P (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Methods* 26: 247-259.

Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. *Mol Microbiol* 5: 825-834.

Hungria M, Ellis J, Hardy WF, Eaglesham ARJ (1993) Light-stimulated $^{14}\text{CO}_2$ uptake and acetylene reduction by bacteriochlorophyll containing stem nodule isolate BTAi 1. *Biol Fertil Soils* 15: 208-214.

Igarashi N, Harada J, Nagashima S, Matsuura K, Shimada K, Nagashima KV (2001) Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *J Mol Evol* 52: 333-341.

James EK, Loureiro MF, Pott A, Pott VJ, Martins CM, Franco AA (2002) Flooding-tolerant legume symbiosis from the Brazilian Pantanal. *New Phytol* 150: 723-738.

Jaubert M, Zappa S, Fardoux J, Adriano JM, Hannibal L, Lavergne J, Vermeglio A, Giraud E, Pignol D (2004) Light and redox control of photosynthesis gene expression in *Bradyrhizobium*: Dual roles of two PpsR. *J Biol Chem* 279: 44407-44416.

Judd AK, Schneider M, Sadowsky MJ, de Bruijn FJ (1993) Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl Environ Microbiol* 59: 1702-1708.

Klug G (1993) Regulation of expression of photosynthesis genes in anoxygenic bacteria. *Arch Microbiol* 159: 397-404.

Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR (1995) Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria Genome Res 5: 408-418.

Kolber ZS, Plumley FG, Lang AS, Beatty JT, Blankeshp RE, van Dover CL, Vetriani CI, Koblizer M, Rathgeber C, Falkowski PG (2001) Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. Science 292: 2492-2495.

Ladha JK, Pareek RP, Becker M (1992) Stem nodulating legume-Rhizobium symbiosis and its agronomic use in lowland rice p. 147-192. Advances in Soil Science, vol 20, Stewart BA, ed. Springer-Verlag, New York.

Ladha JK, So RB (1994) Numerical taxonomy of phototrophic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. Int J Syst Bacteriol 44: 62-73.

Laguerre G, Allard MR, Revoy F, Amarger N (1994) Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol 60: 56-63.

Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, Charnay MP, Louvrier P, Mazurier SI, Rigottier-Gois L, Amarger N (1996) Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Appl Environ Microbiol 62: 2029-2036.

Laguerre G, Van Berkum P, Amarger N, Prevost D (1997) Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. Appl Environ Microbiol 63: 4748-4758.

Larimer FW, Chain P, Hauser L, y otros 16 autores (2003) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. Nat Biotechnol 22: 55-61.

Leung K, Strain SR, de Bruijn FJ, Bottomley PJ (1994) Genotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl Environ Microbiol 60: 416-426.

Lorquin J, Molouba F, Dreyfus B (1997) Identification of carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. Appl Environ Microbiol 63: 1151-1154.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Lupski JR, Weinstock GM (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 174: 4525-4529.

Martin B, Humbert O, Camara M, y otros 10 autores (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 20: 3479-3483.

Masuda S, Bauer CE (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antirepress photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* 110: 613-623.

Molouba F, Lorquin J, Willems A, Hoste B, Giraud E, Dreyfus B, Gillis M, de Lajudie P, Boivin C (1999) Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl Environ Microbiol* 65: 3084-3094.

Moreira FMS, Haukka K, Young JPW (1998) Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Mol Ecol* 7: 889-895.

Moreira FM, Cruz L, de Faria S, Marsh T, Martínez Romero E, Pedrosa F, Pitard RM, Young JPW (2006) *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. a microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *System Appl Microbiol* 29: 197-206.

Moulin L, Béna G, Boivin-Mason C, Stepkowski T (2003) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol Phylogen Evol*

Nagashima KV, Hiraishi A, Shimada K, Matura K (1997) Horizontal transfer of genes coding for the photosynthetic reaction centers of purple bacteria. *J Mol Evol* 45: 131-136.

Nick G, Jussila M, Hoste B, Niemi M, Kaijalainen S, de Lajudie P, de Bruijn FJ, Lindström K (1999) Rhizobia isolated from root nodules of tropical leguminous tree characterized using DNA-DNA dot-blot hybridization and rep-PCR genomic fingerprinting. *System Appl Microbiol* 22: 278-299.

Nishimura K, Shimada H, Ohta H, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K (1996) Expression of the *puf* operon in an aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*. Plant Cell Physiol 37: 153-159.

Odee DW, Haukka K, McInroy SG, Sprent JI, Sutherland JM, Young JPW (2002) Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. Soil Biol Biochem 34: 801-811.

O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acids proteins. Cell 12: 1133-1142.

Oh JI, Kaplan S (2001) Generalized approach to the regulation and integration of gene expression. Mol Microbiol 39: 1116-1123.

Plazinski J, Cen Y, Rolfe B (1985) General method for the identification of plasmid species in fast-growing soil microorganisms. Appl Environ Microbiol 48: 1001-103.

Penfold RJ, Pemberton JM (1994) Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol 176: 2869-2876.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev 64: 180-201.

Perrière G, Gouy M (1996) WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie 78: 364-369.

Ponnampalam SN, Buggy JJ, Bauer CE (1995) Characterization of an aerobic repressor that coordinately regulates bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II expression in *Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol 177: 2990-2997

Rademaker JL, de Bruijn FL (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. p. 151-171. DNA markers: Protocols, Applications and Overviews, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM eds. J Wiley and Sons, Inc, New York.

Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic *fingerprinting* with

DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int J Syst Evol Microbiol 50: 665-677.

Rinaudo G, Orenga S, Fernandez MP, Meugnier H, Bardin R (1991) DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. Int J Syst Bacteriol 41: 114-120.

Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debelle F, Ferro M, Truchet G, Prome JC, Denarie J (1996) The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. Proc Natl Acad Sci USA 93: 15305-15310.

Romdhane SB, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M, Ghorbal MH, de Lajudie P (2006) Genetic diversity of *Acacia tortolis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. J Appl Microbiol 100: 436-445.

Santos MA, Vargas MAT, Hungria M (1999) Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. FEMS Microbiol Ecol 30: 261-272.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.

Sawada HL, Kuykendall LD, Young JM (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J Gen Appl Microbiol 49: 155-179.

Schneider M, de Bruijn FJ (1996) Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. World J Microbiol Biotechnol 12: 163-174.

Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Ann Biochem 166: 368-379.

Selenska-Pobell S, Evguenieva-Hackenberg E, Radeva G, Squartini A. (1996) Characterization of *Rhizobium "hedysari"* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and genomic PCR fingerprinting. J Appl Bacteriol 80: 517-528.

Sharma RS, Mohammed A, Mishra V, Babu CR (2005) Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. *Res Microbiol* 156: 57-67.

Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. WH Freeman and Co, San Francisco.

So R, Ladha J, Young JPW (1994) Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a group with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int J Syst Bacteriol* 44: 392-403.

Somasegaran P, Hoben HJ (1994) Handbook for rhizobia: methods in Legume-rhizobium technology, Springer-Verlag Inc, New York.

Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity G, y otros 10 autores (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1043-1047.

Stern MJ, Ferro-Luzzi Ames G, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37: 1015-1026.

Sugino J, Miyoshi J (1964) The specific precipitation of orthophosphate and some biochemical application. *J Biol Chem* 202: 675-685.

Suominen L, Roos C, Lortet G, Paulin L, Lindstrom K (2001) Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol* 18: 907-916.

Suyama T, Shigematsu T, Suzuki T, Tokiwa Y, Kanagawa T, Nagashima KVP, Hanada S (2002) Photosynthetic apparatus in *Roseateles depolymerans* 61A is transcriptionally induced by carbon limitation. *Appl Environ Microbiol* 68: 1665-1673.

Tadros MH, Zuber H, Drews G (1982) The polypeptide components from light-harvesting pigment-protein complex II (B800-850) of *Rhodospseudomonas capsulata*. Solubilization, purification and sequence studies. *Eur J Biochem* 127: 315-318.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.

Tighe SW, de Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G, Jarvis BDW (2000) Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 787-801.

Tsien HC, Dreyfus BL, Schmidt EL (1983) Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J Bacteriol* 156: 888.

van Berkum P, Tuly RE, Keister DL (1995) Non pigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 61: 623-629.

van Berkum P, Eardly BD (2002) The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1132-1136.

van Berkum P, Leibold JM, Eardly BD (2006) Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.) *System Appl Microbiol* 29: 207-215.

van Rhijn, Vanderleyden J (1995) The rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59: 124-142.

van Rossum D, Schuurmans FP, Gillis M, Muyotcha A, van Verseveld HW, Stouthamer AH, Boogerd FC (1995) Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl Environ Microbiol* 61: 1599-1609.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-438.

Veasey EA, Ghisi OMAA, Valarini MJ, Otsuk IP, Cardelli MA, Sanchez MJF, Beisman DA (1997) Early growth and native nodulation of leguminous shrub and tree species in Brazil. *Trop Grasslands* 31: 40-48.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomes *Nucleic Acids Res* 19: 6823-6831.

Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol* 5: 25-40.

Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic *fingerprinting*, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 64: 2096-2104.

Vinuesa P, Silva C, Lorite MJ, Izaguirre-Mayoral ML, Bedmar EJ, Martínez-Romero E (2005a) Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *System Appl Microbiol* 28: 702-716.

Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martínez-Romero E (2005b) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* 34: 29-54.

Vos P, Hogers M, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes A, Frigters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.

Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX, Martínez-Romero E (1998) *Rhizobium huatlense* sp. nov., a microsymbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bacteriol* 48: 687-699.

Wayne LG, Brenner DJ, Cowell RR, y otros 9 autores (1987) International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Microbiol* 37: 463-464.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.

Wettlaufer SH, Hardy RWF (1992) Effect of light and organic acids on oxygen uptake by BTAi 1, a photosynthetic rhizobium. *Appl Environ Microbiol* 58: 3830-3833.

Wettlaufer SH, Hardy RWF (1995) Effect of oxygen and light on the accumulation of bacteriochlorophyll in the rhizobial strain BTAi 1. *Plant Cell Physiol*. 36: 391-396.

Willems A, Doignon-Bourcier F, Coopman R, Hoste B, de Lajudie P, Gillis M (2000) AFLP *fingerpr*int analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *System Appl Microbiol* 23: 137-147.

Willems A, Coopman R, Gillis M (2001a) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 111-117.

Willems A, Coopman R, Gillis M (2001b) Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51: 623-632.

Willems A, Doignon-Bourcier F, Goris J, Coopman R, de Lajudie P, de Vos P, Gillis M (2001c) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1315-1322.

Willems A, Munive A, de Lajudie P, Gillis M (2003) In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. *System App Microbiol* 26: 203-210.

Wolde-meskel E, Terefework Z, Lindström K, Frostegard A (2004) Rhizobia nodulating African *Acacia* spp. and *Sesbania sesban* trees in southern Ethiopian soils are metabolically and genomically diverse. *Soil Biol Biochem* 36: 2013-2025.

Wolde-meskel E, Terefework Z, Frostegard A, Lindström K (2005) Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1439-1452.

Wong FYK, Stackebrandt E, Ladha JK, Fleischman DE, Date RA y Fuerst JA (1994) Phylogenetic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic stem-

nodulating bacteria from *Aeschynomene* species grown in separated geographical regions. *Appl Environ Microbiol* 60: 940-946.

Yanni YG, Rizk RY, Corich V, y otros 11 autores (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potencial to promote rice growth. *Plant Soil* 194: 99-114.

Young JPW, Downer HL, Eardly BD (1991) Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi 1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. *J Bacteriol* 173: 2271-2277.

Yurkov VV, Beatty JT (1998) Aerobic phototropic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 695-724.

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P (2004) Characterization of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *System Appl Microbiol* 27: 380-395.

Zucconi AP, Beatty JT (1988) Posttranscriptional regulation by lighth of the steady-state levels of mature B800-850 lighth-harvesting complexes in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 170: 877-882.

Zuloaga FO, Morrone O (1999) Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. *Dicotyledoneae*, Zuloaga FO, Morrone O eds. *Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard* 74: 1-1246.

Zurdo-Piñero JL, Valazquez E, Lorite MJ, Brelles-Mariño G, Schröder EC, Bedman EJ, Mateos PF, Martínez-Molina E (2004) Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *System Appl Microbiol* 27: 469-477.

Divulgación de los resultados obtenidos

“Analysis of genomic diversity among photosynthetic stem-nodulating rhizobial strains from Northeast Argentina”. Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Peticari A, García AF (2002) System Appl Microbiol 25: 423-433.