

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE NODULACIÓN Y FIJACIÓN DE
NITRÓGENO ATMOSFÉRICO DE UNA NUEVA ESPECIE DE BACTERIA
DIAZOTRÓFICA PERTENECIENTE AL GÉNERO *Neorhizobium* AISLADA DE
TEJIDOS DE ARROZ**

KATHERINE RIVERA ZULUAGA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SANTIAGO DE CALI
2017**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE NODULACIÓN Y FIJACIÓN DE
NITRÓGENO ATMOSFÉRICO DE UNA NUEVA ESPECIE DE BACTERIA
DIAZOTRÓFICA PERTENECIENTE AL GÉNERO *Neorhizobium* AISLADA DE
TEJIDOS DE ARROZ**

KATHERINE RIVERA ZULUAGA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
BIOLOGÍA**

Tutor:

**Thaura Ghneim Herrera
Ph. D Ciencias Biológicas**

Co-tutor:

Eliana Torres Bedoya

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SANTIAGO DE CALI
2017**

APROBADO POR:

María Camila Pizano Gómez

Evaluador Interno.

Thaura Ghneim Herrera

Director del Proyecto.

Eliana Torres Bedoya

Co-director del Proyecto.

Santiago de Cali, Marzo 01 de 2017

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, les agradezco desde el corazón su apoyo durante el desarrollo de nuestra investigación, especialmente le agradezco a la Dr. Thaura por brindarme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y de realizar este proyecto y a Eliana Torres le agradezco por transmitirme sus conocimientos, enseñarme y entrenarme como profesional durante todos estos años.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Laboratorio de Fisiología Animal, por sus consejos y apoyo en los buenos y malos momentos.

A mi amiga Vanessa Reyes, le agradezco, no solo por acompañarme en el desarrollo de este proyecto, sino por todos los años que compartimos juntas y por las aventuras que vendrán.

A Linda Guitierrez e Isabel Vanegas, por ayudarme en el desarrollo de ideas creativas

A José Sánchez, por ser más que incondicional conmigo y brindarme su ayuda cada vez que lo necesitaba

A mis padres y familia, mi motor, por impulsarme siempre a cumplir mis sueños y mis metas con pasión y dedicación.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	14
2	DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	16
2.1	Planteamiento de la pregunta o problema de investigación.....	16
2.2	Marco teórico.....	18
2.2.1	Fijación biológica de nitrógeno.....	18
2.2.2	Interacción planta-bacteria.....	19
2.2.3	Clasificación taxonómica de los Rizobios.....	24
2.2.4	Parámetros para la descripción de una nueva especie según el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB).....	25
2.2.5	Uso de proteínas autofluorescentes como herramienta de estudio de la interacción planta-bacteria.....	26
2.2.6	Uso de microscopía de fluorescencia.....	27
2.3	OBJETIVOS.....	28
2.3.1	OBJETIVO GENERAL.....	28
2.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
2.4	METODOLOGÍA.....	29
2.4.1	Materiales y métodos.....	29
Tabla 2.	Listado de especies de plantas leguminosas y de arroz.....	29
2.4.2	Matriz de marco lógico.....	35
2.5	RESULTADOS.....	39
2.5.1	Diseño de montaje experimental para plantas inoculadas.....	39
2.5.2	Visualización de SOG26 en tejidos de plantas inoculadas.....	41
2.5.3	Efecto de SOG26 sobre el crecimiento de plantas de arroz inoculadas 55	
2.5.4	Efecto de SOG26 y HAMBI540 sobre el crecimiento de plantas leguminosas inoculadas.....	58
2.6	DISCUSIÓN.....	65
2.6.1	Montaje experimental.....	65
2.6.2	Colonización del tejido radicular por parte de SOG26.....	65
2.6.3	Inducción a la formación de nódulos y evaluación de la colonización en plantas leguminosas generalistas por parte de <i>Neorhizobium sp.</i> SOG26 y <i>Neorhizobium galegae</i> sv. <i>orientalis</i> HAMBI 540.....	68
2.6.4	Identificación de SOG26.....	70

2.7	CONCLUSIONES.....	71
2.8	RECOMENDACIONES.....	72
3	BIBLIOGRAFÍA.....	73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de fijación de nitrógeno.....	18
Tabla 2. Listado de especies de plantas leguminosas y de arroz.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organización del montaje experimental para ensayos de colonización en raíces.....	33
Figura 2. Montaje experimental para ensayos de colonización en tejidos de raíces	40
Figura 3. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en <i>Oryza glumaepatula</i> - accesión OG114	43
Figura 4. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en <i>Oryza glumaepatula</i> - accesión OG131	44
Figura 5. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en <i>Oryza glumaepatula</i> - accesión OG192	45
Figura 6. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en <i>Oryza sativa</i> - accesión Nipponbare	46
Figura 7. Ubicación tisular en cortes de raíces de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en arroz. <i>Oryza glumaepatula</i> accesiones: OG114, OG131, OG192 y <i>Oryza sativa</i> - accesión Nipponbare	47
Figura 8. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en tejidos de <i>Leucaena leucocephala</i> observada 11 días después de inoculación (dpi)	48
Figura 9. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en raíces de <i>Macroptilium atropurpureum</i> observada a los 11 días después de inoculación (dpi)	49
Figura 10. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en <i>Medicago lupulin</i> observada a los 11 días después de inoculación (dpi)	50
Figura 11. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en <i>Sesbania herbacea</i> observada a los 11 días después de inoculación (dpi).....	51
Figura 12. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) en <i>Sesbania rostrata</i> observada a 11 días después de inoculación (dpi)	52
Figura 13. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) observada a 11 días después de inoculación (dpi) en <i>Vigna radiata</i>	53
Figura 14. Colonización de <i>Neorhizobium sp.</i> (SOG26) observada a 11 días después de inoculación (dpi) en <i>Trifolium semipilosum</i>	54
Figura 15. Efecto de la colonización de SOG26 en plantas de arroz 112 días después de la inoculación (112 dpi). Visualización de diferencias en altura de plantas de arroz inoculadas con SOG26 comparadas con los controles negativos.	56
Figura 16. Efecto de la colonización de SOG 26 sobre el crecimiento de plantas de arroz 112 dpi.	57
Figura 17. Efecto de la colonización de SOG26 y HAMBI 540 en plantas leguminosas 35 días después de la inoculación (35 dpi).....	59
Figura 18. Efecto de la colonización de SOG26 y HAMBI 540 en plantas leguminosas 35 días después de la inoculación (35 dpi).....	60
Figura 19. Medidas promedio para el efecto de la colonización de SOG 26 sobre el crecimiento de plantas leguminosas 35 dpi.....	61
Figura 20. Raíces de <i>S. herbacea</i> plantas inoculadas con SOG26, HAMBI540 y control negativo.....	62

Figura 21. Visualización de nódulos en raíces de *S. herbacea* inoculadas con SOG26 y HAMBI 540.....63

Figura 22. Visualización de bacterias dentro del tejido de los nódulos en raíces de *S. herbacea* inoculadas con SOG26 y HAMBI 540.....64

RESUMEN DEL PROYECTO

La interacción planta-bacteria es un fenómeno natural y complejo que se ha estudiado desde hace décadas, despertando un interés particular en entender el efecto que tiene esta asociación en plantas de interés agrícola. En los últimos años se han hecho avances importantes en el entendimiento a nivel molecular, fisiológico y bioquímico, de la interacción que se establece en plantas leguminosas y las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae. Esta familia de bacterias comprende más de seis géneros siendo el más reciente *Neorhizobium*, descrito en 2014.

En el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular de Plantas de la Universidad Icesi, se aisló de semillas de arroz una bacteria con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y promover el crecimiento de plántulas de arroz, denominada SOG26. El análisis de su genoma apunta a que podría representar una nueva especie de bacteria, estrechamente relacionada con *Neorhizobium galegae* sv. *orientalis* HAMBI 540. La identificación de bacterias dentro de la familia Rhizobiaceae, según el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB) bajo los estatutos del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (ICSM) y de la División de Bacteriología y Microbiología Aplicada de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS), debe incluir evaluaciones de la capacidad para inducir nódulos efectivos y fijar nitrógeno en plantas (promiscuas y específicas) pertenecientes a la familia Leguminosae, por lo tanto en este trabajo se estudió, si SOG26 tenía la capacidad de nodular diferentes especies de leguminosas.

Por otro lado, dado que SOG26 fue aislada de semillas de arroz y se ha demostrado su presencia en tallos y raíces de especies del género *Oryza*, en este estudio también se llevaron a cabo ensayos *in vitro* que permitieron estudiar la dinámica de su colonización en los tejidos de arroz. Cabe resaltar que en plantas gramíneas como el arroz y otros cereales, el desarrollo de estructuras especializadas para la fijación de nitrógeno biológico no se presenta, y en cambio se ha descrito la migración de estas bacterias a través de tejidos, llegando a localizarse hasta en tallos, hojas y semillas. Como primer acercamiento al estudio de la interacción de SOG26 con plantas de arroz, nuestro trabajo se concentró en la localización de esta bacteria en raíces y su migración a través de los tejidos que componen su anatomía.

Para poder facilitar el estudio de la biología de la interacción planta-bacteria, la cepa de interés SOG26 ha sido marcada con una proteína autofluorescente de expresión constitutiva, lo que permitió evaluar el curso de la colonización y establecimiento en los tejidos de sus plantas hospederas por medio de microscopía de fluorescencia. Complementariamente, dado que se ha reportado un efecto positivo de la simbiosis sobre el crecimiento y productividad de plantas de interés agrícola, también se cuantificó el efecto promotor de crecimiento de la

bacteria por medio del aumento de biomasa. Adicionalmente, se encontraron nódulos efectivos en *Sesbania herbacea*, identificando a esta leguminosa como posible planta hospedera para SOG26.

Palabras claves: Endófito, bacteria, *Neorhizobium*, Fijación biológica de nitrógeno, colonización, AFP, arroz, leguminosas, *S. herbacea*.

SUMMARY

The interactions between plants and bacteria represent a natural and complex phenomenon that have been studied for decades, arousing a particular interest in understanding the effect of this association on crop plants. In recent years, important advances have been made in understanding the molecular, physiological and biochemical aspects of the interaction established between leguminous plants and the bacteria belonging to the family Rhizobiaceae. This family of bacteria comprises more than six genera being the most recent *Neorhizobium*, described in 2014.

In the Plant Molecular and Physiology Laboratory of Icesi University, a bacterium with the capacity to fix atmospheric nitrogen and to promote the growth of rice seedlings was isolated from rice seeds and called SOG26. Analysis of its genome suggests that it could represent a new species of bacteria, closely related to *Neorhizobium galegae* sv. *orientalis* HAMBI 540. Bacteria identification within the family Rhizobiaceae, according to the International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB) under the statutes of the International Committee of Systematic Bacteriology (ICSM) and the Division of Bacteriology and Applied Microbiology of the International Union Of Microbiological Societies (IUMS), should include assessments of the ability to induce effective nodules and fix nitrogen in plants (promiscuous and specific) belonging to the Leguminosae family, therefore in this work we studied whether SOG26 is able to nodulate different species of leguminous plants.

On the other hand, since SOG26 was isolated from rice seeds and has been shown to be present in stems and roots of species of the genus *Oryza*, in this study we also carried out *in vitro* tests that allowed us to study the dynamics of its colonization in rice tissues. It should be noted that in grass plants such as rice and other cereals, the development of specialized structures for the fixation of biological nitrogen does not occur, and instead the migration of these bacteria through tissues has been described, reaching up to stems, leaves and seeds. As a first approach to the study of the interaction of SOG26 with rice plants, our work focused on the localization of this bacterium in roots and its migration through the tissues that make up its anatomy.

In order to facilitate the study of the biology of the plant-bacterial interaction, the SOG26 strain of interest has been marked with an autofluorescent protein of constitutive expression, which allowed evaluating the course of colonization and the establishment of SOG26 in the tissues of its host plants by fluorescence microscopy. Complementarily, since a positive effect of the symbiosis has been reported on the growth and productivity of plants of agricultural interest, the growth promoting effect of the bacteria was also quantified by the increase of biomass. In addition, effective nodules were found in *Sesbania herbacea*, identifying this legume as a possible host plant for SOG26.

Keywords: Endophyte, bacteria, *Neorhizobium*, biological nitrogen fixation, colonization, AFP, rice, legumes, *S. herbacea*.

1 INTRODUCCIÓN

La interacción planta-bacteria, es un proceso complejo, en el que están involucrados diferentes factores bióticos, abióticos y genéticos. Hasta el momento, la interacción mejor estudiada es la que se establece entre plantas leguminosas y Rizobios, clasificada como una relación simbiótica. Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad bacteriana se ha extendido y se han descrito otros microorganismos endófitos, es decir, aquellos que pueden vivir dentro de los tejidos de las plantas, sin producir enfermedades. Estos dos tipos de interacción difieren en numerosos aspectos, siendo el más evidente la formación de nuevos órganos especializados en las plantas leguminosas al asociarse a rizobios, denominados nódulos, los cuales funcionan exclusivamente para la fijación de nitrógeno. En contraposición, durante la colonización de tejidos por bacterias endófitas, estas son capaces de movilizarse desde las raíces, pasando por tallos y hojas, teniendo la posibilidad de colonizar hasta semillas, sin necesidad de que se desarrollen estructuras especializadas en la planta.

En las últimas décadas, se ha considerado el uso de estas bacterias fijadoras de nitrógeno como biofertilizantes, una herramienta para fomentar nuevas prácticas de cultivo en plantas de interés agrícola. Una particularidad de este proceso, es la comunicación a nivel celular requerida para que se establezca dicha interacción y se presente la colonización del tejido vegetal por parte de la bacteria, por lo que ha surgido un interés particular por dilucidar en detalle los mecanismos moleculares que acompañan el establecimiento de bacterias en plantas leguminosas y cómo estas bacterias puede utilizarse para manejar cultivos de cereales y otras plantas de interés agrícola (Bürgmann, Widmer, Von Sigler, & Zeyer, 2004; Chi et al., 2005; Chin-a-woeng, Priester, Bij, & Lugtenberg, 1997; Freiberg et al., 1997). La mayoría de bacterias que fijan nitrógeno atmosférico pertenecen a la familia Rhizobiaceae, la cual comprende más de seis géneros siendo *Neorhizobium* el descrito más recientemente (Mousavi et al., 2014; Österman et al., 2014; Österman, Mousavi, Koskinen, Paulin, & Lindström, 2015).

Investigadores del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, aislaron de semillas de arroz una bacteria con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y promover el crecimiento vegetal, denominada SOG26. De acuerdo con los análisis genómicos que se han realizado, existe una alta similaridad de SOG 26 con *Neorhizobium galegae* sv *orientalis*. Para esta especie de bacteria se ha descrito un caso especial de interacción en la cual la bacteria exhibe una estricta especificidad por la planta hospedera, induciendo nodulación exclusivamente en plantas de género *Galega* (Mousavi et al., 2014; Österman et al., 2015).

Es importante resaltar que las herramientas moleculares no son suficientes para lograr la correcta identificación de bacterias pertenecientes al grupo de rizobios. Según el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB), bajo los estatutos del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (ICSM) y de la División de Bacteriología y Microbiología Aplicada de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS), los estudios moleculares se deben complementar con ensayos fenotípicos que permitan evaluar el nivel de especificidad de la interacción de los rizobios con plantas leguminosas hospedadoras (Graham et al., 1991).

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es determinar la capacidad que tiene SOG26 de inducir la formación de nódulos en plantas leguminosas y fijar nitrógeno atmosférico tanto en leguminosas, como también en plantas de arroz, de las que fue originalmente aislada la bacteria. Con la finalidad de monitorear la colonización de los tejidos vegetales por SOG26 y confirmar su hábito endófito, la bacteria se ha marcado, por medio de conjugación triparental, con una cepa donante de *E. coli* y una cepa ayudante de la misma especie (Sinclair *et al.* 1982), con una proteína verde autofluorescente de expresión constitutiva, usando como vector pHC60 (Cheng & Walker, 1998). Este vector codifica resistencia a la tetraciclina y contiene el gen *gfp* de expresión constitutiva a niveles del promotor LacZ constitutivos, sin necesidad de la expresión de LacZ. Este vector también cuenta con una región de estabilidad en pro de mantener la expresión de la proteína en ausencia de una presión de selección. Asimismo, para este plásmido se ha cuantificado una vida media de la proteína de 24 horas (Chi et al., 2005; Perrine-Walker, Prayitno, Rolfe, Weinman, & Hocart, 2007).

El uso de proteínas autofluorescentes para el estudio de la interacción planta-bacteria es adecuado dado que por medio de microscopia de fluorescencia se pueden estudiar estos procesos. Esta es una metodología no destructiva que permite monitorear el proceso de colonización en un curso temporal más extenso (Larrainzar, O’Gara, & Morrissey, 2005). Una de las ventajas que representa esta técnica es que se pueden identificar tanto sustancias, como células o partes específicas de ella cuando se encuentran marcadas con un fluoróforo o fluorocromos. Para este estudio se utilizó una proteína verde autofluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) ($\lambda_{\text{excitación}}=470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=509 \text{ nm}$).

2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación

En los últimos años se han hecho avances importantes en la comprensión de la interacción planta-bacteria. En la actualidad se cuenta con herramientas que permiten descubrir y explorar en mayor detalle la diversidad bacteriana a nivel genético y funcional, abriendo nuevos horizontes en la identificación de nuevas interacciones entre plantas y bacterias, y en la comprensión de interacciones ya descritas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son el grupo de interés en este estudio, dado que se pueden utilizar como biofertilizantes y de este modo promover la adopción de prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente. Estas bacterias son capaces de entablar una relación mutualista con diversas especies de plantas, siendo la interacción entre bacterias de la familia Rhizobiaceae –particularmente el género *Rhizobium*- y especies de leguminosas, la mejor conocida a nivel molecular, fisiológico y bioquímico (Mousavi et al., 2014).

Sin embargo, la asociación entre bacterias del género *Rhizobium* no es exclusiva con plantas leguminosas, estos microorganismos también se han podido aislar de tejidos de arroz, con la diferencia de que la colonización se puede presentar tanto epífita como endófitamente (Ji et al., 2010; Ren, Chen, Sui, Wang, & Chen, 2011). Una particularidad de esta asociación es que no involucra la formación de nódulos de fijación, sino que, por el contrario, se ha descrito como interacción dinámica en la que las bacterias pueden llegar a localizarse en diferentes tejidos de la planta. No obstante, aún no se conoce en detalle los mecanismos por los cuales se establece esta asociación (Chi et al., 2005; Perrine-Walker et al., 2007).

Recientemente, fue descrito un nuevo género en la familia Rhizobiaceae, denominado como *Neorhizobium*. Las especies que pertenecen a este nuevo género tienen la singularidad de ser muy selectivas con las plantas leguminosas a las que puede asociarse. Un ejemplo de esta singularidad es *Neorhizobium galegae*, la cual tiene la capacidad de inducir la formación de nódulos solo en dos especies leguminosas pertenecientes al género *Galega* (Österman et al., 2015).

Según nuestra revisión, a la fecha no se ha reportado la asociación efectiva de esta bacteria con otras especies de planta. Por lo tanto, resulta relevante establecer el efecto que tiene una bacteria inicialmente aislada de los tejidos de arroz, sobre especies de leguminosas indicadoras, es decir, leguminosas que son colonizadas por bacterias diazotróficas de manera generalista, como también aquellas plantas con las que se asocia de manera exclusiva. De este modo, se

puede determinar la especificidad de la interacción entre nuestra bacteria de interés y los diferentes genotipos de plantas, monocotiledóneas y eudicotiledóneas (Freiberg et al., 1997; Graham et al., 1991; Mousavi et al., 2014).

Entender la compleja naturaleza de la asociación entre planta-bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico (diazotrófica), aportaría información significativa acerca de los mecanismos y/o estrategias que podrían aplicarse en la agricultura para disminuir tanto el impacto que tienen los fertilizantes químicos como los costos de producción en la industria. Con este proyecto se busca evaluar precisamente este aspecto. Para ello, se utilizará la nueva cepa la cual fue aislada como bacteria endófito de tejidos de arroz. Para poder realizar la correcta descripción y reporte de esta nueva cepa o especie, se requiere demostrar su capacidad de inducir la formación de nódulos en especies de leguminosas (Graham et al., 1991), así como demostrar que se establece endófitamente en los tejidos de arroz, esto mediante herramientas que permitan su localización visual, como el uso de proteínas autofluorescentes (AFP, por sus siglas en inglés)

Hasta la fecha, no se ha reportado la asociación como endófito de *Neorhizobium* con plantas gramíneas y tampoco que puedan promover el crecimiento de la planta por medio del proceso de fijación biológica de nitrógeno. Para SOG26, la cepa de interés de este estudio, se ha establecido la presencia de genes *nifH*, indicando su potencial diazotrófico y sumado a esto, ensayos de inoculación *in vitro* han evidenciado su capacidad de promoción de crecimiento en plantas de arroz. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se estableció que SOG26 pertenece al género *Neorhizobium* y debido a su porcentaje de similaridad (<96%), representa putativamente una nueva especie. Por otro lado, el ensamblaje preliminar del genoma ratificó su clasificación dentro del género y mostró alta similaridad con *Neorhizobium galegae* sv. *orientalis* HAMBI 540 (Österman et al., 2014, 2015).

Sin embargo, para describir una nueva especie de rizobio se deben cumplir requisitos exigidos por el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB) bajo los estatutos del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (ICSM) y de la División de Bacteriología y Microbiología Aplicada de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS), en los que se especifican que además de análisis moleculares y filogenéticos, se deben de llevar a cabo ensayos fenotípicos, como la inducción de formación de nódulos en plantas leguminosas hospederas de naturaleza promiscua y específica, para completar la descripción e identidad de una nueva bacteria perteneciente a la familia Rhizobiaceae (Graham et al., 1991).

2.2 Marco teórico

2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno molecular (N₂) es una sustancia abundante en la atmósfera, pues representa el 80% de su composición. Sin embargo, esta sustancia tan abundante no es asimilable por plantas y otros eucariotas, debido a la estabilidad del enlace covalente triple que la caracteriza (Freeman, 2009). A pesar de esto, muchos componentes de la célula requieren de nitrógeno para su síntesis, como lo son los ácidos nucleicos y aminoácidos. Para poder suplir la necesidad por nitrógeno, las plantas lo absorben como amonio (NH₄) o nitrato (NO₃), que son derivados de los procesos de fijación de nitrógeno que se presentan en la Tabla 1 y que se pueden dar como resultado de varios mecanismos (Schlesinger & Bernhardt, 2013b; Taiz, Lincoln; Zeiger, 2010).

Tabla 1. Mecanismos de fijación de nitrógeno (Schlesinger & Bernhardt, 2013a).

Mecanismos de fijación de Nitrógeno		Ecuación estequiométrica	Gramos de nitrógeno fijados por año (10 ¹² g N/año)
Industrial	Haber-Bosch	$\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{NH}_3$	100
Natural	Relámpagos	$\text{N}_2 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{energía}} 2\text{NO}$	19
	Reacciones fotoquímicas	$\text{N}_2 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{energía}} 2\text{NO}$	
	Biológica	$\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow 2\text{NH}_4^+$	

Generalmente, las plantas incorporan los compuestos nitrogenados, cuando están disponibles y los asimilan por medio de la acción de su maquinaria metabólica (Martine, A. R.; Mike, 2015), de esta manera se absorben rápidamente del suelo y son incorporados a diferentes rutas metabólicas. La acumulación de este macronutriente en los tejidos se da cuando las plantas absorben más de lo que pueden asimilar (Taiz & Zeiger, 2010).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es el único proceso a nivel biológico en que el nitrógeno molecular es transformado en amoniaco, este es un proceso energéticamente costoso (se requieren entre 16 y 20 moléculas de ATP para

poder fijar una sola molécula de N₂), y exclusivo de microorganismos denominados diazótrofos, los cuales pueden ser de vida libre, simbioses, epífitos o endófitos (Lloret & Martínez-Romero, 2005; Martine, A. R.; Mike, 2015). Los microorganismos que son capaces de fijar nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo debido a que sólo comparten los genes relacionados con la actividad de la enzima nitrogenasa. Este grupo incluye microorganismos fototrofos pertenecientes a las familias Rhodospirillaceae, Clorobiaceae y Cianobacteriae; quimioautótrofos correspondientes a los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* o heterótrofos de las familias Frankiaceae y Rhizobiaceae y los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Redondo-Nieto, M.; Bonilla, I.; Bolaños, 2008).

Una particularidad de este proceso son las asociaciones que los microorganismos diazotróficos han establecido con plantas vasculares. Hasta el momento la interacción mejor documentada es la que se establece entre plantas de la familia Leguminosae y bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico conocidas colectivamente como Rizobios que incluyen a los géneros: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium* y *Photorhizobium*. Sin embargo, también se han estudiado las asociaciones que se dan con plantas no leguminosas, como por ejemplo las actinorrizas pertenecientes al género *Parasponia* con *Frankia* o la interacción de la cianobacteria *Nostoc* y sus correspondientes hospederos como *Gunnera* o hepáticas (Santi, Bogusz, & Franche, 2013).

La FBN es una reacción catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual se caracteriza por tener sitios en los que facilita el intercambio de electrones de alta energía. Por lo tanto, al ser el oxígeno un aceptor de electrones fuerte, el proceso de FBN requiere condiciones anaerobias. Esta característica metabólica se puede considerar como un rasgo muy conservado a través de la historia de la evolución de los organismos diazotróficos que tuvieron su primera gran radiación hace 3200 m.a. en el Eón Arqueano (Lloret & Martínez-Romero, 2005).

2.2.2 Interacción planta-bacteria

2.2.2.1 Endófito, definición general y diferencia con simbiote

El término endófito se utiliza para referirse a aquellos microorganismos que viven dentro de los tejidos de la planta y que son diferentes a los patógenos. Mientras que simbiote hace referencia a una asociación íntima y a largo plazo, entre organismos -en este caso planta-bacteria-, y que se caracteriza porque cada uno se beneficia de la interacción (Freeman, 2009).

2.2.2.2 Asociación simbiótica entre plantas leguminosas y rizobios

Existe una gran variedad de bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al orden Rhizobiales, lo que ha despertado gran interés en el estudio de este grupo taxonómico y sus interacciones con las plantas. La interacción más estudiada ha sido la establecida entre los diferentes géneros de este orden, con plantas leguminosas, la cual involucra más de las 18.000 especies de esta familia y una amplia colección de Rizobios (α y β -Proteo bacterias) (Masson-Boivin, Giraud, Perret, & Batut, 2009a). A pesar de la gran diversidad de plantas y bacterias que se han reportado para la simbiosis, esta relación es muy específica y depende de la comunicación recíproca.

La simbiosis entre leguminosas y rizobios no es obligatoria, pues se puede dar mucho después de la germinación de la planta o la misma puede permanecer sin la interacción durante todo su ciclo de vida. Sin embargo, cuando la disponibilidad de nitrógeno es baja, se favorece el intercambio de señales entre planta-bacteria, en el cual están involucrados genes específicos tanto de nodulación como de fijación de nitrógeno (Taiz, Lincoln; Zeiger, 2010).

La comunicación a nivel celular es de vital importancia para que la planta permita que la bacteria entre a sus tejidos y se desarrolle en una estructura especializada para la fijación de nitrógeno molecular conocida como nódulo. Este proceso de interacción, infección, colonización y fijación de nitrógeno atmosférico se puede resumir en las siguientes etapas:

1. **Quimiotaxis:** La rizósfera es conocida como la zona de interacción dinámica entre las raíces de la planta y los microorganismos que la rodean. La composición de la comunidad bacteriana de la rizósfera está mediada por los compuestos específicos exudados por la planta, los cuales sirven como fuente de carbohidratos para favorecer el crecimiento microbiano, y adicionalmente contienen moléculas que promueven la quimiotaxis para atraer algunas bacterias (Dakora & Phillips, 2002).
2. **Flavonoides y factor Nod:** Entre los componentes del exudado de las plantas se encuentran los flavonoides que se caracterizan por ser un grupo diverso de metabolitos secundarios excretados por cada especie vegetal en específico. Todos los flavonoides son compuestos fenólicos que consisten en dos anillos de benceno, unidos por un piran heterocíclico y son las sustituciones en este último lo que caracteriza la rizósfera de cada planta. Aproximadamente se han identificado más de 4.000 flavonoides como metabolitos secundarios en plantas vasculares y un subconjunto de ellos son los encargados de mediar la especificidad en la interacción planta-bacteria (Shamseldin, Applications, & Arab, 2013).

En la interacción planta-bacteria, los flavonoides representan la señal de reconocimiento para determinadas bacterias y actúan como inductores para la síntesis de lipochitooligosacáridos (LCOs), conocidos como factores Nod. En la síntesis de LCOs están involucrados alrededor de 30 genes, de los cuales se puede resaltar la función de los genes *nodABC*, que codifica para la formación de un LCOs general y sobre el cual los productos de los genes *nod*, *nol* y *noe*, generan modificaciones dando como producto final un factor Nod característico para cada especie de bacteria diazotrófica (Shamseldin et al., 2013).

Es necesario resaltar que los flavonoides no son la única señal en la rizósfera que induce la síntesis del factor Nod, se ha demostrado que compuestos como: betaínas, ácidos aldónicos, xantonas, jasmonato y fenoles simples; también actúan como inductores de genes *nod*. Por otro lado, el factor Nod no es el único compuesto sintetizado en bacterias que median la interacción, también hay sustancias que son necesarias en la comunicación intercelular que permite abolir los mecanismos de defensa en plantas y facilitar la colonización por parte de las bacterias, como: glicanos cíclicos, lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPS).

- 3. Deformación del pelo radical:** Los factores Nod son una señal esencial de los rizobios para inducir la formación de nódulos en las raíces de la planta hospedera y otras respuestas relacionadas con el proceso de infección (Spaink, 2000). Es necesario resaltar que hay una relación estricta entre los LCOs producidos por los rizobios y las plantas que pueden inducir la formación de nódulos, lo cual está fuertemente relacionado con el reconocimiento de los flavonoides por parte de la proteína NodD, encargada de activar la expresión de genes *nod* (Perret, Staehelin, & Broughton, 2000).

Después de que el factor Nod es producido por la bacteria, es reconocido por las células en las raíces de las plantas y se desencadena una cascada de señalización que termina en la deformación del pelo radicular. A pesar de que este mecanismo no se entiende completamente, se han propuesto diferentes modelos en el que el factor Nod es reconocido por un receptor en la membrada de las células de las raíces, lo que genera el aumento de iones de calcio (Ca^{2+}) y posteriormente la despolarización de la membrana que conduce a la deformación del pelo radicular y formación del nódulo (Radutoiu et al., 2003; Roche et al., 1991; Rodríguez-Navarro, Dardanelli, & Ruíz-Saíenz, 2007).

- 4. Colonización de tejido y fijación de nitrógeno atmosférico:** Al final, los rizobios se convierten en simbiosomas intracelulares en las células de los nódulos, la infección es el proceso que conduce a las bacterias desde el exterior, hasta su nicho endocelular. No todos los rizobios realizan la infección del mismo modo, algunos penetran los tejidos por medio de las capas epidérmicas o corticales. Además, las bacterias son transportadas de célula a célula por medio de simbiosomas en un proceso similar a endocitosis. Una vez

el rizobio se ha adaptado al microambiente en los tejidos del nódulo, los genes *fix*, involucrados en la fijación de nitrógeno atmosférico se activan y se establece la simbiosis tan característica de estas plantas leguminosas con bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae (Masson-Boivin et al., 2009a).

2.2.2.3 Desarrollo y anatomía del nódulo

Los nódulos que se producen a causa de la simbiosis con las bacterias pertenecientes a los Rizobios, pueden presentar morfologías variadas. Sin embargo, hay cuatro características generales que son comunes en estos nuevos órganos: inducción de un nuevo meristema, el cual involucra células corticales; invasión en tejidos y células por las bacterias; desarrollo de un tejido centralizado con limitaciones en la entrada de oxígeno atmosférico en donde la fijación de nitrógeno biológico tiene lugar; y el desarrollo de un tejido vascular periférico localizado por fuera del mismo, pero dentro de la endodermis del nódulo (Brewin, 1974).

Los nódulos se pueden clasificar de diferentes maneras, la más común es calificándolos como efectivos o no, debido a su coloración, si el nódulo presenta un aspecto rosado se le considera efectivo, mientras que el color blanco, indica que no es efectivo. Los nódulos también se pueden clasificar de acuerdo al tipo de desarrollo, como determinados o indeterminados. Los nódulos maduros indeterminados, se caracterizan por la presencia de un meristemo apical persistente, responsable del crecimiento del nódulo y se pueden dividir dentro de cinco zonas de diferenciación: (1) meristemo; (2) zona de invasión; (3) interzona donde de acumulación de amiloplastos y donde la bacteria se diferencia en bacteroides; (4) zona de fijación; (5) zona de senescencia. Al finalizar su desarrollo, estos nódulos toman una forma esférica alargada (Crespi & Gálvez, 2000).

Los nódulos determinados, se presentan particularmente en plantas leguminosas ubicadas en los trópicos o subtrópicos, en estos órganos la actividad meristemática desaparece justo después de la iniciación de la organogénesis del nódulo. En consecuencia, el crecimiento del nódulo se debe a la expansión celular y no por proliferación y debido a esto, los nódulos solo tienen un patrón diferencial temporal en una sola zona de fijación de nitrógeno y presentan una forma circular (Crespi & Gálvez, 2000). Dependiendo del tipo de nódulo que se desarrolle en las raíces, se exportan a la planta diferentes moléculas, por ejemplo, en los nódulos indeterminados se exporta el nitrógeno fijado en forma de asparagina o glutamina y en los determinados se exporta como derivados de urea (Crespi & Gálvez, 2000; HIRSCH, 1992).

Dado que el desarrollo de los nódulos en las raíces, es un proceso energéticamente costoso para las plantas, existe un control genético para prevenir la proliferación en exceso de estos nuevo órganos, mediante un mecanismo de retroalimentación, que consiste en que la planta protege los sitios de proliferación de nuevos tejidos de la raíz (Brewin, 1974; Crespi & Gálvez, 2000).

2.2.2.4 Interacción entre plantas de arroz y sus endófitos

La interacción planta-bacteria fijadora de N_2 , no se restringe a plantas leguminosas, se ha reportado esta asociación para otros grupos taxonómicos como los cereales. Sin embargo, en estas plantas, la interacción no conduce a la formación de nódulos o al desarrollo de estructuras especializadas para la fijación de nitrógeno por parte de las bacterias (Reis, Baldani, Lúcia, & Baldani, 2000).

Algunas bacterias diazotróficas se establecen de forma epífita sobre tejidos de plantas, mientras que otras son capaces de colonizarlos internamente. En ambos casos, la asociación de la bacteria con la planta involucra el mutuo reconocimiento, aunque el proceso de señalización en estos casos no se ha dilucidado completamente (Perret et al., 2000; Perrine-Walker et al., 2007).

Las bacterias endófitas acceden al interior de los tejidos de las plantas a través de los pelos radiculares, lesiones tisulares o a través de la epidermis intacta (Perrine-Walker et al., 2007). Para todos estos casos, se presenta la colonización y establecimiento de los microorganismos y se han identificado genes homólogos en plantas monocotiledóneas como el arroz, involucrados en proceso de infección y posterior desarrollo de nódulos conocidos como ENOD, los cuales se expresan específicamente en tejidos donde se presenta la interacción con rizobios, activando procesos involucrados en la infección y la iniciación de organogénesis (Reddy et al., 1999). Estas observaciones conducen a proponer que la programación genética en plantas para la interacción con rizobios está conservada evolutivamente y se ha derivado de un ancestro común (Reddy et al., 1999; Zhu, Riely, Burns, & Ané, 2006).

Investigaciones realizadas con rizobios marcados con AFP, han mostrado que durante la emergencia de pelos radiculares se liberan flavonoides que sirven como una señal química que atrae a la bacteria hacia la herida que se forma y que promueve una cascada de señalización para la colonización de tejido vegetal (Chi et al., 2005; Ji et al., 2010; Perrine-Walker et al., 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que la ubicación de estos microorganismos no solo se restringe a tejidos de raíz, sino que incluso pueden llegar a localizarse en células de tallos y hojas de plantas de arroz, evidenciando su hábito endófito e identificando esta asociación dinámica en todos los tejidos de la planta (Chi et al., 2005).

2.2.3 Clasificación taxonómica de los Rizobios

2.2.3.1 Identificación molecular

Actualmente, la clasificación e identificación filogenética de bacterias involucran técnicas que ayudan a determinar características tanto genotípicas como fenotípicas. Por el lado de los métodos genómicos, estos se usan para determinar la variabilidad genética a varios niveles taxonómicos (Glaeser & Kämpfer, 2015; Martens et al., 2008). Generalmente se ha utilizado la secuencia del gen 16S rRNA como marcador universal para análisis filogenéticos básicos para bacterias. Si bien el gen 16S rRNA cumple con los requerimientos para ser considerado como un buen marcador filogenético, realizar un análisis evolutivo basado solamente con este gen es insuficiente para distinguir entre especies relacionadas y en algunos casos a nivel de género (Glaeser & Kämpfer, 2015). Por lo que es mejor utilizar herramientas que logren integrar en el análisis filogenético secuencias de múltiple genes, como el análisis de secuencia multilocus (MLSA), el cual permite construir relaciones filogenéticas basadas en secuencias de genes de expresión constitutiva o genes *housekeeping*; o metodologías más recientes como la secuenciación de genoma completo (WGS) (Gomila, Peña, Mulet, Lalucat, & García-Valdés, 2015).

2.2.3.2 Evidencias moleculares que establecen a *Neorhizobium* como un nuevo género en la familia Rhizobiaceae

Los rizobios se clasifican como α y β proteobacterias que pueden fijar nitrógeno atmosférico, con hábitos de vida libre o simbiótica. Las relaciones filogenéticas de los especies incluidas en el género *Rhizobium*, fueron reevaluadas por Mousavi *et al.* (2014), quienes utilizaron seis genes *housekeeping* en el análisis MLSA (*atpD*, *glnA*, *glnII*, *recA*, *rpoB* y *thrC*). Los autores encontraron que *R. alkalisoli*, *R. huautlense*, *R. galegae* sv. *orientalis*, *R. galegae* sv. *officinalis* y *R. vignae*, eran candidatos para la creación de un nuevo género de bacterias perteneciente a la familia Rhizobiaceae, al cual denominaron *Neorhizobium* cuyo significado es nuevo *Rhizobium*.

Para este nuevo género de bacterias, se ha reportado un curioso caso de especificidad por la planta hospedera, siendo *Neorhizobium galegae*, la única bacteria que se puede establecer y formar nódulos efectivos en las plantas leguminosas hospederas *Galega officinalis* y *Galega orientalis*. Roger *et al.* 2010, propone un término “variante simbiótico” o “simbiovariante” (sv.), al hacer referencia a la habilidad de los rizobios para establecer simbiosis y fijar nitrógeno atmosférico en su planta hospedera, para *N. galegae*, se han identificado dos, simbiovariantes: *orientalis* y *officinalis* (Mousavi et al., 2014; Rogel, Ormeño-Orrillo, & Martínez Romero, 2011); los cuales forman nódulos efectivos en las

respectivas plantas hospederas. Más aún, se ha establecido que *N. galegae* sv. *officinalis* es capaz de nodular a *G. orientalis* pero los nódulos formados no son capaces de fijar N₂.

En rizobios se ha demostrado que los genes relacionados con las simbiosis se encuentran en un plásmido que se puede transferir horizontalmente entre bacterias, lo que explicaría que simbiosis de diferentes especies, puedan nodular en un mismo tipo de planta hospedera (Rogel et al., 2011). En el caso de los simbiovars de *N. galegae*, el simbiovar *officinalis* (HAMBI 1141) porta los genes simbióticos en un plásmido, mientras que en el simbiovar (HAMBI 540^T) estos genes se localizan en el cromosoma, lo cual explicaría las diferencias observadas en la especificidad. Al parecer, el plásmido con genes de simbiosis, es un factor determinante en el establecimiento de la interacción con otras plantas leguminosas diferentes al género *Galega*, como: *Astragalus*, *Caragana*, *Lotus*, *Medicago*, *Sesbania*, *Vigna* y *Acacia* (Österman et al., 2014, 2015).

2.2.3.3 SOG26, una bacteria endófito aislada de semillas de arroz

Trabajos realizados en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, condujeron al aislamiento de una bacteria endófito a partir de semillas de arroz, denominada SOG26 (Ghneim-Herrera *et al.*, sin publicar). La identificación molecular de esta bacteria, basada en secuenciación del genoma completo, indica una alta similaridad de SOG26 con *N. galegae* sv. *orientalis*. Análisis bioquímicos han demostrado que esta bacteria promueve el crecimiento de plántulas de arroz; mientras que el marcaje de la bacteria con proteínas autofluorescentes han confirmado su presencia como endófito en los tejidos del arroz (Ghneim-Herrera *et al.*, sin publicar). Hasta la fecha, no existen reportes de que especies del género *Neorhizobium* como endófitos del género *Oryza*. En vista de la especificidad descrita en la sección anterior, SOG26 representa un modelo interesante para evaluar los mecanismos que median los procesos de selección de plantas hospederas en este género en particular.

2.2.4 Parámetros para la descripción de una nueva especie según el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB)

A pesar de los constates esfuerzos por desarrollar tecnologías que permitan la identificación y diferenciación taxonómica de los organismos, también es necesario complementar esta información con estudios fisiológicos que permitan, por un lado, verificar y por el otro, dilucidar ciertos vacíos en la información que los estudios moleculares no pueden cubrir, en la búsqueda de reconstruir la historia natural de cualquier organismo.

Anteriormente, la taxonomía de las bacterias que establecen asociaciones de simbiosis con leguminosas, se basaba en las plantas que colonizaban, por lo que el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB) bajo los estatutos del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (ICSM) y de la División de Bacteriología y Microbiología Aplicada de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS) han propuesto los criterios para establecer nuevos géneros y especies de bacterias que promueven la formación de nódulos en plantas, dado que no solo basta con los análisis filogenéticos y moleculares, sino que también deben de realizarse análisis fenotípicos que permitan recopilar información suficiente acerca de la biología de estas bacterias y su interacción con plantas (Graham et al., 1991).

La nomenclatura de las bacterias debe reflejar las relaciones genotípicas en la medida de lo posible, basándose en métodos moleculares particulares para la clasificación de procariotas como: hibridación DNA-DNA, hibridación DNA-rRNA, secuenciación del gen 16S rRNA y electroforesis de enzimas multilocus. Sin embargo, en el caso de los rizobios es necesario que se lleven a cabo ensayos fenotípicos que permitan respaldar la información que refleja el genoma, por lo que surge la necesidad de realizar pruebas fenotípicas que permitan estudiar la dinámica de estas bacterias con sus plantas hospederas y las características metabólicas y morfológicas de la misma (Graham et al., 1991).

La habilidad de estos organismos para inducir la formación de nódulos en plantas leguminosas es una de las características más importantes en el momento de realizar la descripción de una nueva especie de rizobio, dado que los estudios en nodulación son la prueba final de su identidad. De esta manera se deben de realizar, en primera instancia, pruebas con plantas leguminosas a la que cuales se les considera como “promiscuas”, es decir, a las cuales los rizobios colonizan de manera generalista y son: *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum* y *Galega officinalis*. Además, las hospederas que estén reportadas para la cepa en particular según la literatura y reportar la planta o plantas hospederas de la que se aisló la bacteria en primer lugar (Graham et al., 1991).

2.2.5 Uso de proteínas autofluorescentes como herramienta de estudio de la interacción planta-bacteria

Se denomina proteína autofluorescente a una proteína que emite fluorescencia al recibir un estímulo de luz por una longitud de onda específica (λ) y sin necesidad de unirse a un sustrato, cofactor u otra proteína. La emisión de fluorescencia en estas proteínas se debe a la presencia de un fluoróforo en su estructura, el cuál absorbe fotones a cierta λ , se excita y emite fluorescencia en el proceso (Larrainzar et al., 2005). La primera proteína autofluorescente que se reportó, fue

en la medusa *Aequorea victoria*, y a causa de su color verde característico se le denominó GFP (Green Fluorescent Protein), ($\lambda_{\text{excitación}}=470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=509 \text{ nm}$).

2.2.6 Uso de microscopía de fluorescencia

Una manera útil y eficiente de estudiar los procesos que ocurren *in vivo* de manera no destructiva, es el uso de a microscopia de fluorescencia, en la que se utiliza como herramienta un microscopio de luz ultra violeta en el que las placas son iluminadas por una determinada longitud de onda. Una de las ventajas que representa esta técnica, es que se pueden identificar tanto sustancias o células o partes de ella específicas cuando se encuentran marcadas con un fluoróforos o fluorocromos.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno atmosférico de una nueva especie de *Neorhizobium* aislada de tejidos de arroz.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.2.1 Diseñar un montaje experimental que permita el mantenimiento *in vitro* de plantas colonizadas por bacterias modificadas genéticamente con GFP.

- ✓ **Indicador:** El montaje, además de soportar altas temperaturas y humedad, permite la visualización de las raíces al microscopio.

2.3.2.2 Implementar un protocolo de inoculación de *Neorhizobium* en plantas leguminosas y gramíneas (arroz).

- ✓ **Indicador:** Presencia de bacterias marcadas con GFP en tejido vegetal de plantas leguminosas y de arroz.
- ✓ Inducción de formación de nódulos en plantas leguminosas.

2.3.2.3 Optimizar un protocolo de inducción y visualización *in vitro* de formación de nódulos efectivos en leguminosas.

- ✓ **Indicador:** Se logra inducir la formación de nódulos verdaderos en las raíces de plantas leguminosas.
- ✓ Se confirma que la bacteria que induce los nódulos es *Neorhizobium*, por medio de microscopia de fluorescencia.
- ✓ Se desarrolla un protocolo para la inducción de nódulos y su posterior visualización

2.3.2.4 Identificar el hábito endófito y establecer la localización tisular de esta nueva especie de *Neorhizobium* en los tejidos de arroz (*Oryza sativa* L.), de la cual fue originalmente aislada, empleando para ello marcaje con proteínas autofluorescentes.

- ✓ **Indicador:** Se logra identificar los tejidos en los cuáles las bacterias han colonizado por medio de microscopia de fluorescencia.

2.3.2.5 Evaluar la capacidad de una nueva especie de *Neorhizobium* (aislada de tejidos de arroz), de promover la formación de nódulos en especies de leguminosas utilizadas como indicadoras.

- ✓ **Indicador:** Se da la formación de nódulos en las raíces como respuesta afirmativa de la interacción en plantas leguminosas.
- ✓ Se confirma la presencia de *Neorhizobium* en el tejido vegetal por medio de microscopia de fluorescencia.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 Materiales y métodos

2.4.1.1 Material vegetal

En la Tabla 2 se expone el material vegetal que se utilizó en el estudio de la interacción planta-bacteria, como también los datos referentes a su ubicación a nivel mundial y su sitio de origen (<http://www.gbif.org>). Para los estudios de nodulación, se utilizaron semillas de plantas leguminosas “generalistas”, seleccionadas según la literatura (Mousavi et al., 2014). Por otro lado, para los estudios de colonización de tejidos de arroz, se evaluaron los genotipos a partir de las cuales la bacteria *Neorhizobium sp.* SOG26 fue originalmente aislada. Cabe resaltar que la mayoría de las especies de plantas que utilizaron en el presente estudio son silvestres, con la excepción de *O. sativa*.

Tabla 2. Listado de especies de plantas leguminosas y de arroz

	Planta	Número de Acceso	País de origen de semillas	Nativa	Coordenadas de ubicación a nivel mundial	Identificador (es)	Proveedor semillas
Leguminosas	<i>Vigna radiata</i>	4962	Zimbabue	India	161.37 -77.60...-117.77 -77.60	(L.) R.Wilczek	Programa de recursos genéticos - CIAT
	<i>Sesbania herbacea</i>	21275	Colombia	Colombia y Estados Unidos	91.05 -89.14...-107.23 -89.14	(Mill.) McVaugh	
	<i>Sesbania rostrata</i>	21263	Inglaterra	África	-41.04 -37.72...69.17 -37.72	Bremek. & Oberm.	
	<i>Medicago lupulina</i>			Portugal y Dinamarca	139.57 -75.75...-139.57 -75.75	L.	
	<i>Leucaena leucocephala</i>	17492	El Salvador	Brasil	138.87 -79.61...-140.27 -79.61	(Lam). De Wit	
	<i>Trifolium semipilosum</i>	7835	Inglaterra	África	9.01 -15.22...64.12 -15.22	Fresen	
	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	9002	El Salvador	Brasil	29.88 -89.14...-168.40 -89.14	(DC.) Urb.	
Arroz	<i>Oryza glumaepatula</i>	114	Venezuela	Brasil	-89.43 -24.56...-34.32 -24.56	Steud.	Universidad Icesi
		131					
		192					
	<i>Oryza sativa</i>	Nipponbare	Venezuela	Japón	149.41 -74.31...-129.73 -74.31	L.	

2.4.1.2 Bacteria, plásmido y cultivo

Para este proyecto se utilizaron dos cepas de bacterias pertenecientes al grupo de los Rhizobiales. SOG26, cepa de interés de este estudio, aislada de semillas de *Oryza glumaepatula* y *Oryza sativa* (Ghneim-Herrera *et al.*, sin publicar), en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Molecular de Plantas en la Universidad Icesi. Para esta cepa se ha confirmado mediante PCR (NifH Universal: GCRTAIABNGCCATCATYTC, NifH forA: CGIWTITAYGGNAARGGNGG), la presencia de genes que codifican para la actividad nitrogenasa (*nifH*) y se ha demostrado su capacidad de promover el crecimiento en plántulas de arroz mediante bioensayos (Ghneim-Herrera *et al.*, sin publicar). Por otro lado, análisis en el mismo laboratorio han identificado a esta bacteria taxonómicamente mediante secuenciación de la región hipervariable V3 del gen 16S rRNA, identificando a SOG26 como parte del género de *Neorhizobium*, con una similaridad del 95% con las especies pertenecientes a este grupo, lo cual indicaría que se trata de una nueva especie. Actualmente se trabaja en el ensamble del genoma completo de esta especie, pero análisis preliminares confirman su clasificación dentro del género (Ghneim-Herrera *et al.*, sin publicar).

Además, con el objetivo de estudiar el hábito endófito de esta bacteria, se ha marcado mediante conjugación triparental (Sincalir *et. al*, 1992) con un plásmido de expresión constitutiva para la proteína GFP, PCH60 (Cheng & Walker, 1998). Este vector codifica resistencia a la tetraciclina y contiene el gen *gfp* de expresión constitutiva a niveles del promotor LacZ constitutivos sin necesidad de la expresión de LacZ. Este vector también cuenta con una región de estabilidad en pro de mantener la expresión de la proteína en ausencia de una presión de selección. Asimismo, para este plásmido se ha cuantificado una vida media de la proteína de 24 horas (Chi *et al.*, 2005; Perrine-Walker *et al.*, 2007).

Por otro lado, se utilizó a *Neorhizobium galegae sv orientalis* (HAMBI 540) como cepa para el control en los ensayos de nodulación, proveniente del cepario del mismo laboratorio. *N. Galegae sv. orientalis*, se caracteriza por establecer interacción solo con *Galega orientalis* (Mousavi *et al.*, 2014; Österman *et al.*, 2014, 2015). Las bacterias fueron cultivadas en Agar Yeast Mannitol (YM), en el caso de *Neorhizobium sp.* (SOG 26), al medio de cultivo se le adicionó el antibiótico de selección, tetraciclina en una concentración de 10 ug/mL. Los medios se incubaron a una temperatura de 30°C, óptima para el crecimiento bacteriano.

2.4.1.3 Esterilización de semillas y germinación

Para cada accesión se seleccionaron 25 semillas, las cuales fueron escarificadas y posteriormente esterilizadas. Para las semillas de arroz se utilizó el protocolo de esterilización estandarizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas de la Universidad Icesi. Las semillas de *Oryza glumaepatula*, se sometieron a choque térmico por 3 días a 50 °C previo a la escarificación, mientras que las de *Oryza sativa*, se escarificaron antes de someterlas al procedimiento. Las semillas tuvieron en primera instancia, un lavado con agua autoclavada por tres minutos, luego se sumergieron en nistatina (1 mL/L) por 10 minutos, posteriormente en solución desinfectante (Ver Tabla 1 en anexos) por 20 minutos y luego se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio por al 1% por 30 minutos. Para finalizar, se les realizaron tres lavados con agua estéril, por un minuto cada uno para retirar el exceso de hipoclorito de sodio de las semillas. Cabe resaltar que cada uno de los pasos mencionados anteriormente se deben de realizar en agitación constante y en que todo el proceso se debe de realizar en la cabina de bioseguridad para asegurar la asepsia del procedimiento. Una vez terminado el protocolo de esterilización, las semillas se trasladaron a cajas de Petri con agar en 0.2% KNO₃ a pH de 6.5 y se colocaron de manera horizontal para luego ubicar la caja verticalmente, para que la dirección de germinación sea de 90°.

Por otro lado, dado que la cáscara de las semillas de plantas leguminosas es hidrofóbica y no permite el paso de agua, se realizó con un bisturí un corte al lado opuesto del embrión, con la finalidad de inducir la germinación. Para la esterilización de estas semillas se realizaron ajustes al protocolo que se mencionó anteriormente. En este caso las semillas se clasificaron en dos grupos, de acuerdo a su tamaño: grandes y pequeñas. Para las semillas grandes (*Leucaena leucocephala*, *Sesbania rostrata*, *Sesbania herbacea*, *Vigna radiata* y *Macroptilium atropurpureum*), el protocolo se modificó en el tiempo de exposición a los reactivos, dado que se sumergieron en nistatina por 5 minutos, luego en solución desinfectante por 10 minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. Al finalizar, se realizaron 3 lavados con agua estéril y se dejaron por 30 minutos embebidas en agua. Mientras que para las pequeñas (*Medicago lupulina*, *Desmodium microphyllum* y *Trifolium semipilosum*), en el protocolo se acortaron los tiempos de exposición a 5 minutos en nistatina, 5 minutos en solución desinfectante y 5 minutos en hipoclorito de sodio al 1%. Estas semillas se embebieron por un tiempo de 15 minutos en agua estéril.

Al finalizar el proceso de esterilización, las semillas se pasaron a cajas de petri con agar en 0.2% de KNO₃ y se ubicaron de manera horizontal y después se colocó la caja de petri vertical para favorecer la dirección de germinación. Cabe resaltar, que al igual que las semillas de arroz, el protocolo se realizó bajo condiciones de esterilidad y en agitación constante.

2.4.1.4 Montaje experimental

Las plántulas de arroz se pasaron a montajes de vidrio (portaobjetos 76x25x1 mm y cubreobjetos 60x24x0.13 mm), pegados y sellados con silicona transparente SuperFlex®, cuatro días después de su germinación y se organizaron en tubos Falcon de 50mL, con 40 mL de solución nutritiva F10 suplementada con 10mM KNO₃ (Perrine-Walker et al., 2007; Vincent, 1970), y nistatina (1 mL/L). Los tubos Falcon se ubicaron en un beaker al que se cubrió con papel PlastiFilm, permitiendo de esta manera el paso de la luz sin afectar la esterilidad del medio de cultivo. Las semillas fueron mantenidas en estas condiciones durante 7 días. Las plantas se incubaron bajo condiciones semi-controladas en el cuarto de crecimiento *in vitro* de la Universidad Icesi, con un fotoperiodo de 12h-luz/12h-oscuridad y una temperatura promedio de 28°C (Figura 1A-B).

Para establecer si SOG26 es capaz de inducir la formación de nódulos, se adaptaron dos metodologías de cultivo. En la primera se utilizó solución nutritiva F10 suplementada con nistatina (1mL/L); cada planta se transfirió individualmente al medio de crecimiento cuando la longitud de la raíz alcanzó de 2 a 4 centímetros (Figura 1B). La segunda metodología consistió en el cultivo de las plántulas de acuerdo al protocolo propuesto por Vincet (1970), conocida como Metodología del tubo. El medio de cultivo consistió de solución nutritiva F10 suplementada con agar a 1.5%, y sacarosa al 3%. Los tucos se ubicaron en una gradilla de espuma gris oscura, con el objetivo de proteger a las raíces de la luz (Figura 1C-B)

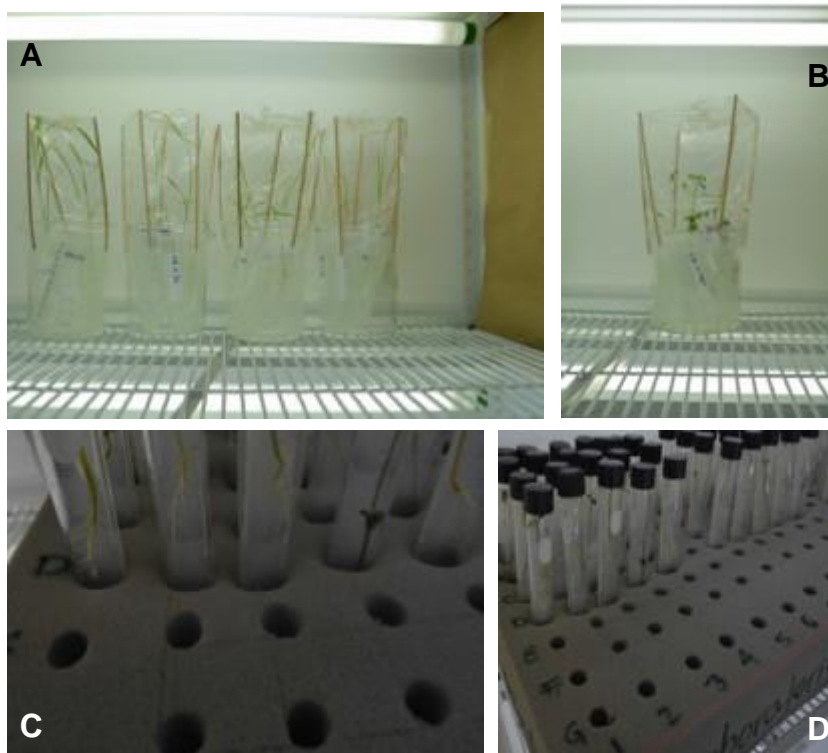


Figura 1. Organización del montaje experimental para ensayos de colonización en raíces. Organización de plántulas en sus montajes experimentales en el cuarto de crecimiento *in vitro*: arroz (A) y leguminosas (B). Montaje en tubos con agar para leguminosas en gradilla de espuma gris, para proteger a las raíces de la luz (C-D). Todas las plantas se incubaron a una temperatura promedio de 28°C y un fotoperiodo de 12 h-luz /12 h-oscuridad.

2.4.1.5 Ensayos de colonización en arroz

Para evaluar la colonización de tejidos por parte de bacterias, se utilizó la metodología propuesta por Perrine-Walker et al. (2007), en donde se seleccionaron aquellas plántulas con una longitud de raíz de 2 a 4 cm. El inóculo se preparó a partir de una suspensión de bacterias en agua estéril, en la que se midió una absorbancia de 0.1 a una densidad óptica de 600 nm, y posteriormente se diluyó 1:20 en agua estéril. Para inocular las plántulas, se sumergieron por 90 minutos sus raíces en una caja de Petri que contenía la solución bacteriana y luego se ubicó cada una de ellas en un montaje de vidrio (previamente autoclavado). Este montaje se depositó en un tubo Falcon de 50 mL con solución nutritiva F10, esta receta contaba con la adición de nitrógeno en forma de nitrato de potasio (KNO_3) en una concentración final de 10mM, la cual es la

concentración mínima requerida por la planta para su correcto funcionamiento (Perrine-Walker et al., 2007). Los controles negativos para cada ensayo, se prepararon remojando las raíces en agua estéril sin bacteria por 90 minutos. Es necesario aclarar que se utilizó un número de réplicas de 5 plantas por tratamiento.

Para la evaluación de la colonización se realizó un curso temporal de observación por 9 días después de la inoculación. Las observaciones se realizaron con el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 55i trinocular) con contraste de fase de la Universidad Icesi.

2.4.1.6 Inducción de formación de nódulos en leguminosas

Para establecer la capacidad de SOG26 de inducir la formación de nódulos en plantas leguminosas se implementaron dos metodologías. La primera consistió en cultivar *in vitro* cada una de las especies de plantas por período de 8 a 10 semanas, en un medio de cultivo F10 sólido (1,5 % agar), suplementado con nistatina (1mL/L) y sacarosa al 3%. En la segunda metodología, un grupo de plantas fue cultivado *in vitro* y luego transferido a suelo a los 15 dpi, las plantas se mantuvieron en la casa de malla de la Universidad Icesi, por 3 semanas. En ambos casos, se realizó la inoculación de acuerdo a la metodología propuesta por Perrine-Walker *et al.* (2007), remojando las raíces (longitud de 2 a 4 cm) por 90 minutos en una dilución de 1:20 de una suspensión de bacterias (D.O 600 nm=0.1), tomadas de un medio de cultivo solido YM suplementado con tetraciclina (10 µg/mL) en el caso de SOG26 y sin antibiótico para HAMBI 540.

2.4.1.7 Cortes de raíces inoculadas con SOG 26

Para confirmar la presencia de la bacteria SOG26 como endófito en los tejidos de raíces tanto de plantas de arroz como leguminosas, se realizaron cortes transversales en raíces de plantas 9 días después de la inoculación en arroz y 11 días después para las leguminosas. Estos cortes se observaron en el microscopio Nikon Eclipse 55i trinocular con contraste de fase de fluorescencia de la Universidad Icesi.

2.4.1.8 Microscopía de fluorescencia

La visualización inicial de los tejidos, para confirmar la presencia de bacterias, se realizó en el microscopio Nikon Eclipse 55i trinocular con contraste de fase de fluorescencia de la Universidad Icesi, y posteriormente las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM-700 en la Universidad del Valle-Sede San Fernando.

2.4.1.9 Efecto de la colonización bacteriana sobre el crecimiento de plantas inoculadas

Diez días después de la inoculación con SOG26, las plantas de arroz se transfirieron a suelo y se mantuvieron en la casa de malla de la Universidad Icesi. Con el objetivo de establecer los beneficios a largo plazo de la asociación con SOG26, se tomaron las medidas de altura, número de hojas y número de tallos, 112 días después de la inoculación.

Por otro lado, las plantas leguminosas inoculadas con SOG26 y HAMBÍ 540, en casa de malla, se desenterraron y se evaluaron sus raíces en busca de nódulos. Adicionalmente se realizaron mediciones de altura, longitud de sistema radicular, número de hojas y número de nódulos (en el caso de que los presentara). Cabe aclarar que se utilizó un número de réplicas de 5 plantas por tratamiento. Para cada uno de los procedimientos, se realizó un registro fotográfico para cada tratamiento.

2.4.1.10 Análisis estadístico

La existencia de diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de crecimiento en respuesta a la inoculación con las distintas cepas bacterianas fue evaluada con ayuda del programa Minitab 17.2.1 (Minitab, Inc). Para cada grupo de datos validaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Es necesario aclarar que se utilizó un número de réplicas de 5 plantas por tratamiento.

Las mediciones de altura realizadas en arroz cumplieron estos supuestos y se analizaron según un modelo lineal general; mientras que las mediciones de número de hojas y tallos, se analizaron empleando estadística no-paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis).

Los datos obtenidos para leguminosas no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se analizaron empleando la prueba de Krukal Wallis.

2.4.2 Matriz de marco lógico

Objetivo general
Determinar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno atmosférico de una nueva especie de <i>Neorhizobium</i> aislada de tejidos de arroz.

Objetivos específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
<p>1. Diseñar un montaje experimental que permita el mantenimiento <i>in vitro</i> de plantas colonizadas por bacterias modificadas genéticamente con AFLP's</p>	<p>Evaluar la resistencia de diferentes tipos de siliconas y materiales (vidrio y madera) a altas temperaturas y humedad permanente, para diseñar un montaje que permita el mantenimiento y visualización de las raíces de plantas inoculadas con <i>Neorhizobium</i>.</p>	<p>El montaje, además de soportar altas temperaturas y humedad, permite la visualización de las raíces al microscopio</p>	<p>Disponibilidad de materiales para realizar montajes, como: silicona, diferentes pegamentos.</p>
<p>2. Implementar un protocolo de inoculación de <i>Neorhizobium</i> en plantas leguminosas y gramíneas (arroz).</p>	<p>Disponer de plantas con al menos 2 cm de longitud en raíz.</p> <p>Cultivar bacterias en medio líquido o sólido</p> <p>Realizar el inóculo en las raíces de las plantas seleccionadas, variando dos factores: la densidad óptica y la concentración de bacteria.</p> <p>Verificar la presencia de la bacteria en tejido vegetal por medio de microscopia de fluorescencia.</p> <p>Evaluar resultados en</p>	<p>Presencia de bacterias marcadas con AFLP's en tejido vegetal de plantas leguminosas y de arroz.</p> <p>Inducción de formación de nódulos en plantas leguminosas.</p>	<p>Disponibilidad de materiales y reactivos para realizar el bioensayo.</p> <p>Disponibilidad de material vegetal: plántulas con al menos 2 centímetros de longitud de raíces.</p> <p>Disponibilidad de equipos, especialmente el espectrofotómetro o y el microscopio de fluorescencia.</p>

	un curso temporal, de manera cualitativa y cuantitativamente.		
3. Optimizar un protocolo de inducción y visualización <i>in vitro</i> de formación de nódulos en leguminosas.	<p>Disponer de plántulas de las leguminosas indicadoras seleccionadas, germinadas <i>in vitro</i></p> <p>Implementar la metodología del tubo propuesta por Vicent (1970), para la inducción de formación de nódulos.</p> <p>Inocular plantas con bacterias de <i>Neorhizobium</i> y <i>S. meliloti</i> marcadas con AFLP's, bajo condiciones <i>in vitro</i>.</p> <p>Verificar la presencia de las bacterias marcadas con AFLP's mediante microscopía de fluorescencia.</p>	<p>Se logra inducir la formación de nódulos verdaderos en las raíces de plantas leguminosas.</p> <p>Se confirma que la bacteria que induce los nódulos es <i>Neorhizobium</i>, por medio de microscopía de fluorescencia.</p> <p>Se desarrolla un protocolo para la inducción de nódulos y su posterior visualización</p>	<p>Disponibilidad de semillas de leguminosas indicadoras.</p> <p>Disponibilidad de materiales y reactivos para realizar el ensayo <i>in vitro</i> de inducción de nódulos en raíces.</p> <p>Mantenimiento del bioensayo en condiciones de esterilidad.</p> <p>Disponibilidad del espectrofotómetro, cabina de bioseguridad, cuarto de crecimiento <i>in vitro</i> y del microscopio de fluorescencia.</p>
4. Identificar el hábito endófito y establecer la localización tisular de esta nueva especie de <i>Neorhizobium</i> en los tejidos de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. y <i>Oryza glumaepatula</i>), de la cual fue	<p>Realizar un bioensayo de colonización <i>in vitro</i> con plantas de arroz de las cuáles se aisló la bacteria</p> <p>Establecer la localización de las bacterias marcadas con AFLP's por medio del</p>	<p>Se logra identificar los tejidos en los cuáles las bacterias han colonizado por medio de microscopía de fluorescencia.</p>	<p>Disponibilidad de material vegetal</p> <p>Disponibilidad de equipos, como el microscopio de fluorescencia</p>

<p>originalmente aislada, empleando para ello marcaje con proteínas autofluorescentes.</p>	<p>microscopio de fluorescencia</p>		
<p>5. Evaluar la capacidad de una nueva especie de <i>Neorhizobium</i> de promover la formación de nódulos efectivos en especies de leguminosas utilizadas como indicadoras.</p>	<p>Realizar ensayos <i>in vitro</i> para identificar la capacidad de la bacteria para inducir la formación de nódulos en tejido de raíces de plantas de leguminosas indicadoras.</p> <p>Comparar entre las distintas plantas, la respuesta a la interacción con la bacteria, cuantificando los nódulos y la tasa de fijación de nitrógeno atmosférico.</p>	<p>Se da la formación de nódulos en las raíces como respuesta afirmativa de la interacción en plantas leguminosas.</p> <p>Se confirma la presencia de <i>Neorhizobium</i> en el tejido vegetal por medio de microscopia de fluorescencia</p>	<p>Disponibilidad de material para realizar montaje <i>in vitro</i>.</p> <p>Disponibilidad de reactivos para preparar medios de crecimiento.</p> <p>Disponibilidad del microscopio de fluorescencia.</p>

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Diseño de montaje experimental para plantas inoculadas

Con el objetivo de estudiar la interacción planta-bacterias, se adaptó un montaje experimental que permitió el crecimiento de las plántulas y su posterior visualización en el microscopio, para detectar la presencia de las bacterias en los tejidos vegetales. En la Figura 2, se puede observar el montaje de vidrio utilizado en los experimentos, el cuál consistía en un portaobjetos (76x25x1 mm) y un cubreobjetos (60x24x0.13 mm), pegados y sellados con silicona transparente SuperFlex®.

Las plántulas cultivadas en este montaje mostraron un correcto desarrollo de su sistema radicular (Figura 2B).

Entre las ventajas del montaje experimental se cuentan: 1) Componentes autoclavables y 2) Manipulación de cada planta de forma individual y su contención en un tubo Falcon de 50 mL (Figura 2C), 3) El dispositivo puede colocarse directamente en el microscopio, permitiendo la observación de las raíces sin necesidad de manipular la planta.

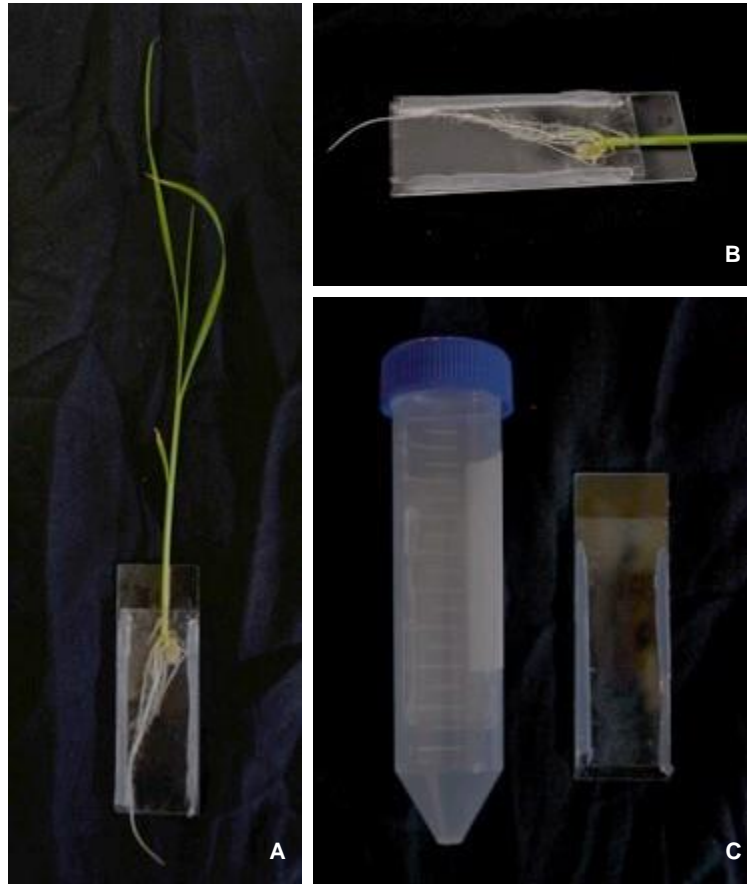


Figura 2. Montaje experimental para ensayos de colonización en tejidos de raíces. Plántula de arroz creciendo dentro del montaje experimental de vidrio (A) y visualización de raíces creciendo sin limitaciones evidentes (B). Montaje de vidrio dentro de un tubo Falcon de 50 mL y montaje individual (C).

2.5.2 Visualización de SOG26 en tejidos de plantas inoculadas

Durante el desarrollo de la investigación, se realizó seguimiento del proceso de colonización en tejidos de las raíces de las plantas inoculadas con SOG26, durante un curso temporal de 9 días después de la inoculación (dpi) para las plantas de arroz, y 11 dpi para las leguminosas, empleando microscopía de fluorescencia. En todas las especies evaluadas se confirmó la presencia y proliferación de la bacteria en los tejidos de la raíz (Figuras 3-14).

La colonización por parte de SOG26 (*Neorhizobium sp.*) en tejidos de arroz, se evaluó en las accesiones a partir de las cuales se aisló originalmente (Tabla 2). En las Figuras 3, 4, 5, se presenta el curso temporal para la colonización en las accesiones OG114, OG131 y OG192 de *Oryza glumaepatula*, respectivamente. La colonización de *Oryza sativa*, accesión Nipponbare se muestra en la Figura 5. En estas imágenes puede observarse una mayor densidad de la fluorescencia en las regiones de emergencia de pelos radicales y de raíces secundarias durante las fases tempranas del proceso de colonización (2 dpi), lo cual apoyaría la idea de que la entrada de la bacteria a la planta se da a través de las heridas que dejan estas estructuras en el tejido de la raíz. La colonización de los tejidos de arroz por parte de SOG26 es interna y se dio tanto a nivel intracelular como intercelular. Las bacterias se visualizaron tanto de manera disgregada (parches) como formando hilos de infección (líneas).

Es importante resaltar que se observó una mayor densidad de SOG26 en *O. sativa* – accesión Nipponbare (Figura 7D), en comparación a las accesiones de *O. glumaepatula*.

Para confirmar la presencia de SOG26 en los tejidos internos de las raíces, se realizaron cortes transversales a los 9 dpi. En la Figura 7, se puede observar la presencia de la bacteria en las 3 capas más externas del corte, que van desde la epidermis al córtex. La bacteria también se observó en la endodermis, tejido vascular y espacios intercelulares.

SOG26 también mostró la capacidad de colonizar los tejidos de las especies de leguminosas generalistas utilizadas en este estudio (Tabla 2) (Figuras 8 a 14). Debido al grosor de las raíces de varias de las especies fue necesario realizar cortes para confirmar la presencia de la bacteria en las raíces. En *Leucaena leucocephala*, se pudo observar a SOG26 localizada en la epidermis, la endodermis y en espacios intercelulares (Figura 8). Por otro lado, en las especies de leguminosas *M. atropurpureum* (Figura 9), *M. lupulina* (Figura 10), *S. herbacea* (Figura 11), *S. rostrata* (Figura 12) y *T. semipilusum* (Figura 14), al igual que en arroz, se pudo observar que, durante las primeras etapas de la infección, los pelos radicales juegan un rol importante en la colonización del tejido de raíces, como vía de entrada al interior de los tejidos.

Las fotografías muestran la presencia de las bacterias en los espacios intercelulares de los tejidos de la raíz de todas las plantas leguminosas (Figura 9-14) y solo se visualizó la colonización a nivel intracelular en *M. lupulina* (Figura 10). Se observó una mayor abundancia de las bacterias en el córtex, en todas las especies evaluadas.

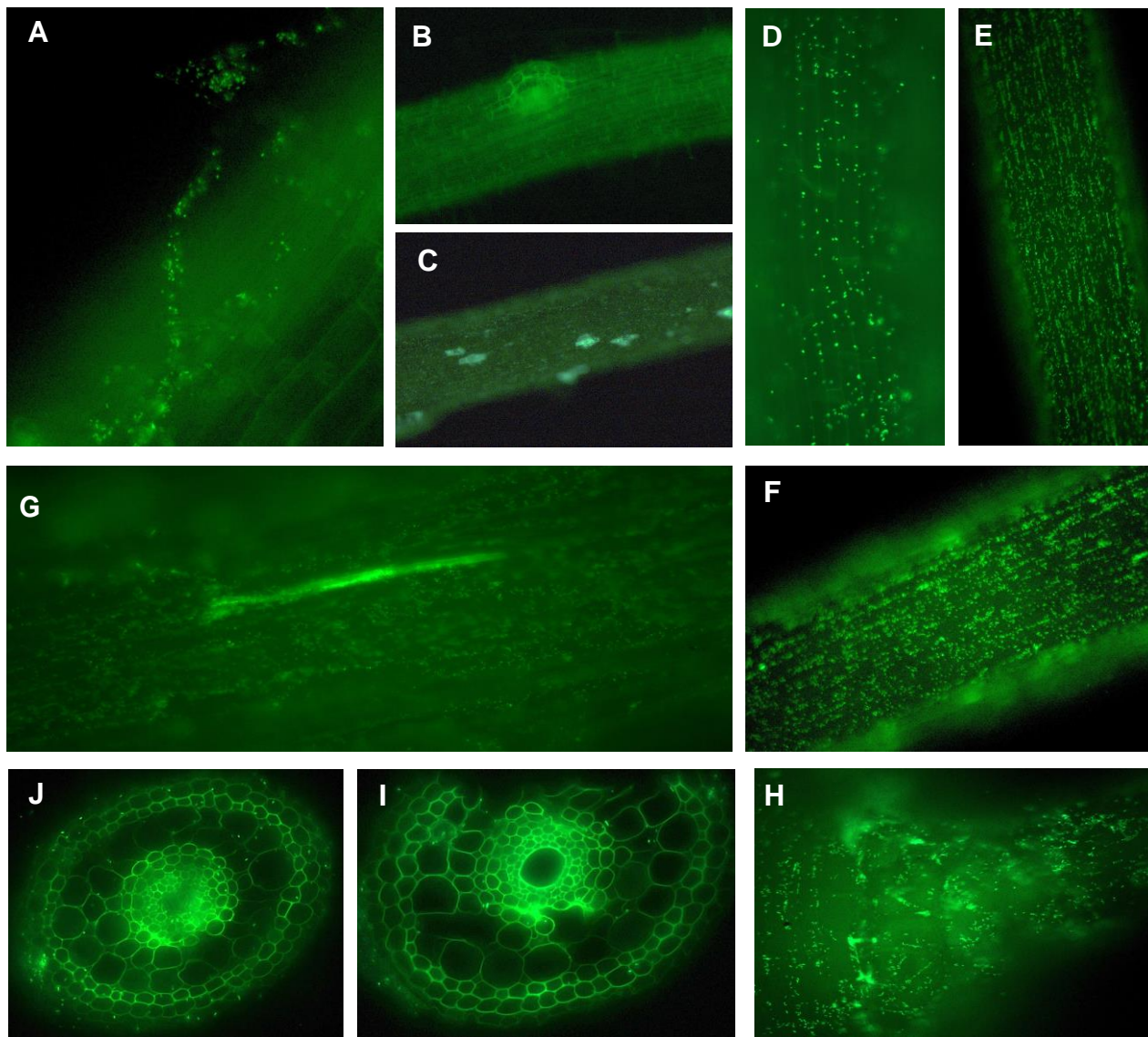


Figura 3. Colonización de *Neorhizobium* sp. (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en *Oryza glumaepatula* - accesión OG114. Pelo radical (A) y emergencia de raíz secundaria (B) colonizados por SOG26, como vía de entrada a los tejidos de la raíz a los 2 y 3 dpi respectivamente.

Visualización de parches en células colonizadas por SOG26 a los 5 dpi (C). Establecimiento de hilos de infección a los 5 dpi (D) y aumento de número de bacterias a los 6 (E) y 7 dpi (F). Bacterias en los espacios intercelulares a los 7 dpi (G). Base de la emergencia de raíz secundaria colonizada por SOG26 (H). Localización de SOG26 en un corte transversal de raíz (J) e (I), desde la epidermis hasta el tejido vascular 9 dpi.

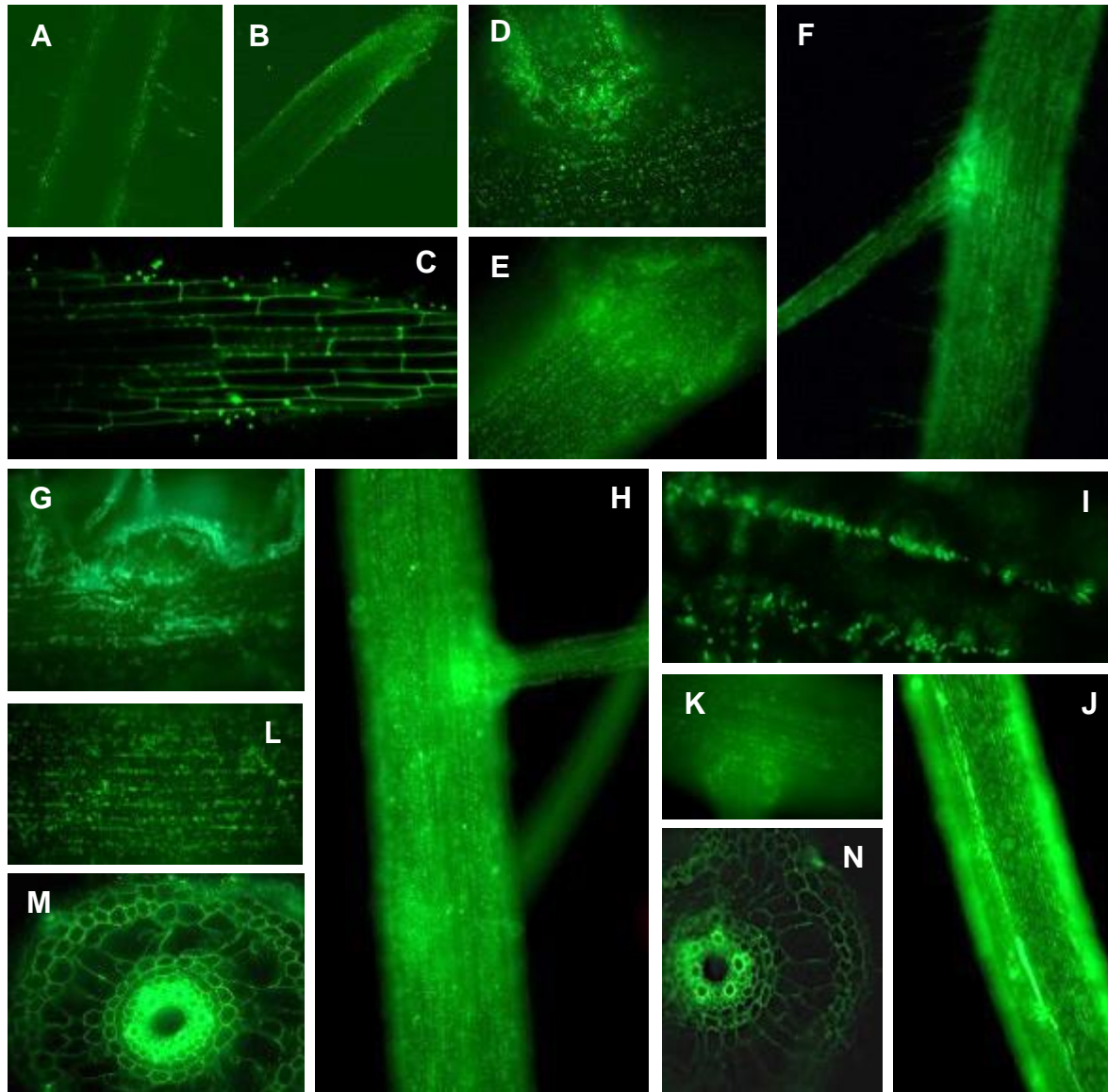


Figura 4. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en *Oryza glumaepatula* - accesión OG131. Pelos radiculares (A), punta de la raíz (B) y células de la raíz (40X) (C) colonizadas por SOG26 2 dpi. Base de raíz secundaria y establecimiento de hilos de infección (D), a los 4 dpi. Visualización de hilos de infección y aumento de número de bacterias en tejido de raíz 5 (E), a los 6 (F) y 7 dpi (H). Aglomeración de SOG26 en pelos y sitio de emergencia de raíz secundaria (G). Localización de bacterias en espacio entre células a los 7 dpi (I-L) y en cortes transversales de raíces a los 9 dpi (M y N).

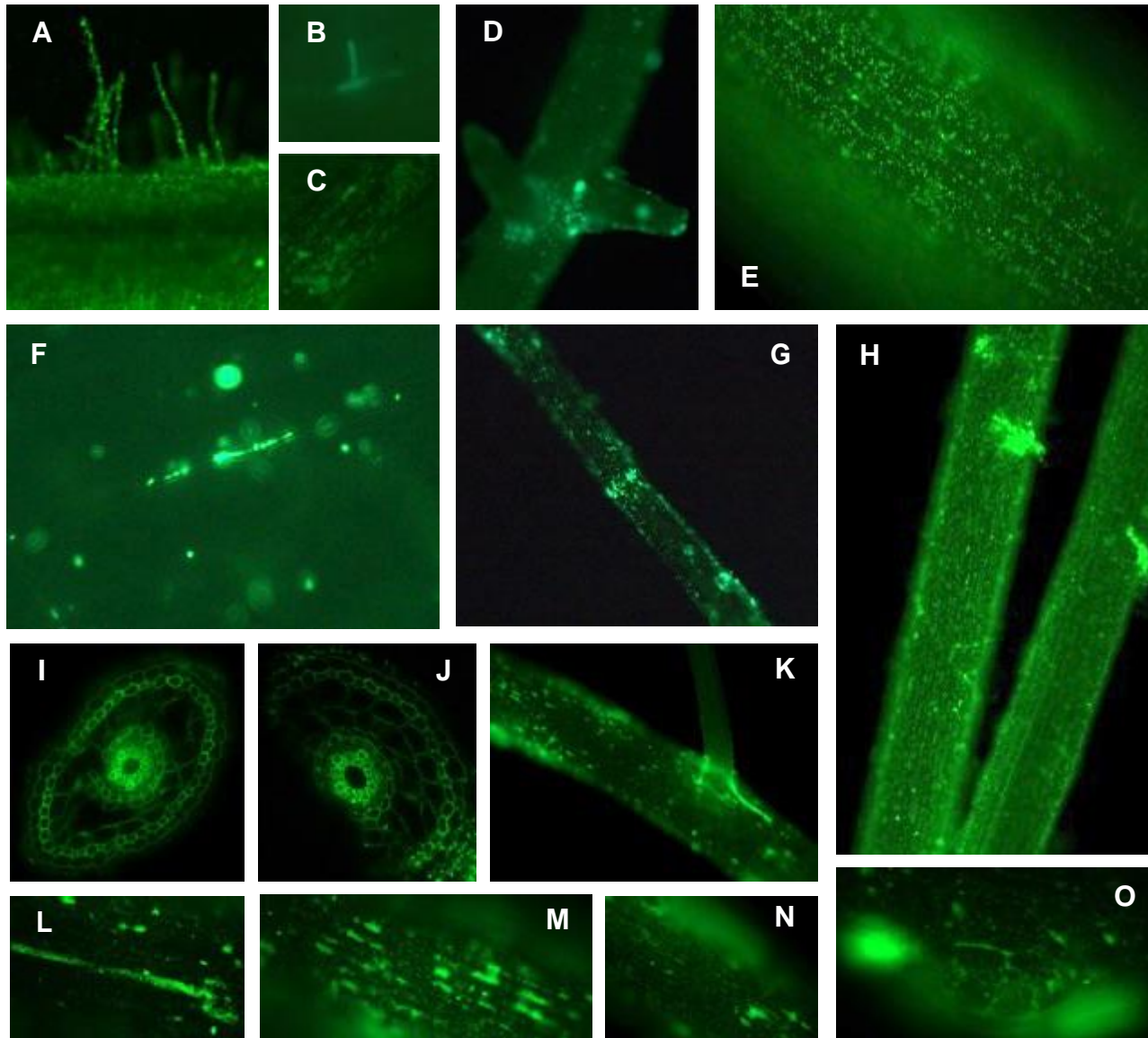


Figura 5. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en *Oryza glumaepatula* accesión OG192. Pelo radicales colonizados por SOG26, a los 2 dpi (A y B). Visualización de hilos de infección a los 4 dpi C. Base de emergencia de raíces secundarias colonizadas por SOG26, a los 6 dpi (D). Hilos de infección y ubicación de bacterias en espacios entre células (E y F). Visualización de parches de colonización en células y entre células a los 7 dpi (G, H, K-O). Localización de SOG26 en un corte transversal de raíz (J) e (I), desde la epidermis hasta el tejido vascular a los 9 dpi.

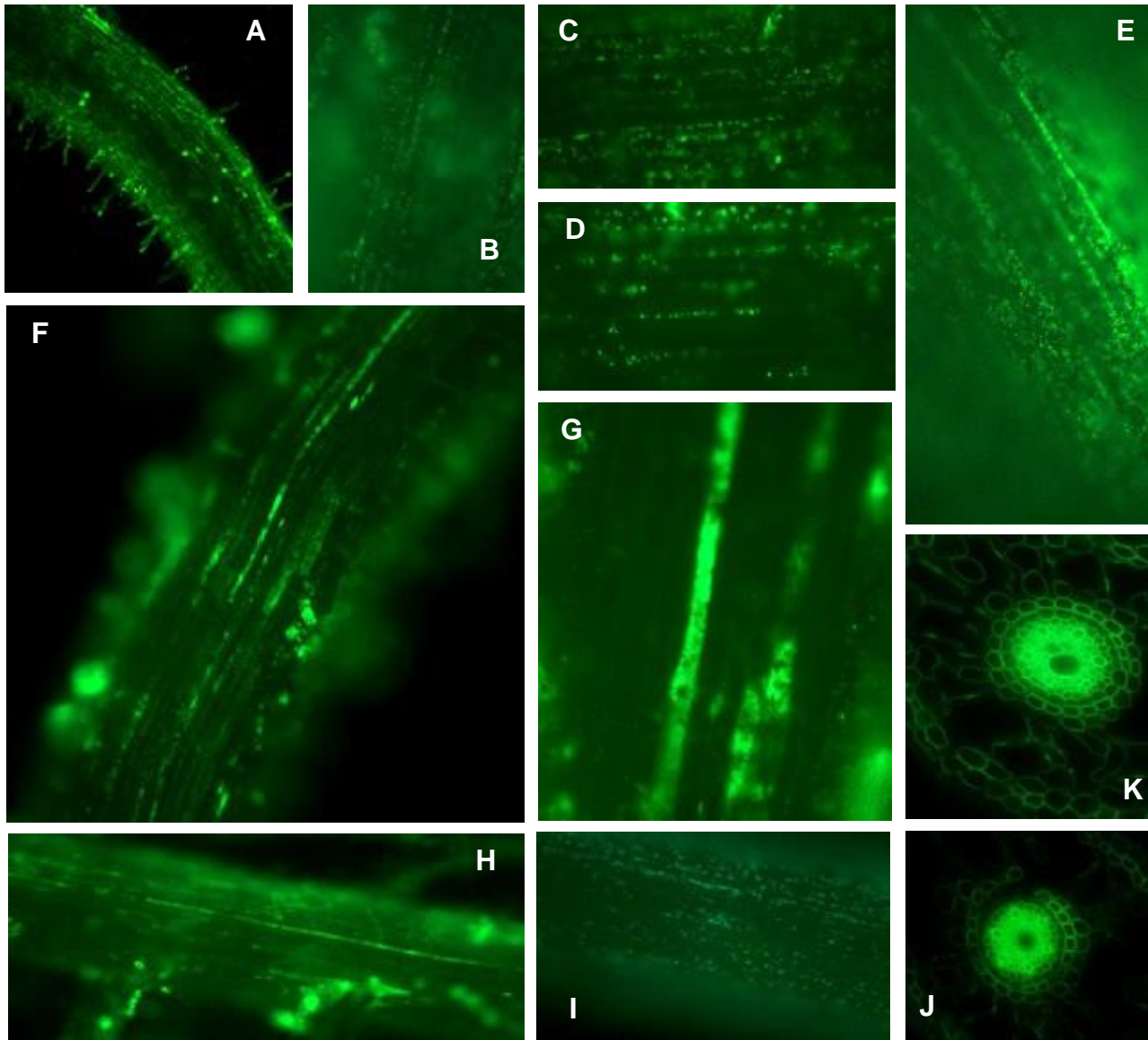


Figura 6. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en un curso temporal de 9 días después de inoculación (dpi) en *Oryza sativa* - accesión Nipponbare. Pelos radiculares colonizados por SOG26 a los 2 dpi (A). Visualización de hilos de infección, a los 4 dpi (B) y localización de bacterias entre células a 40x y 100X (C y D), a los 5 dpi. Establecimiento de hilos de infección (E). Identificación de parches largos de colonización del tejido (F-I). Localización de SOG26 en un corte transversal de raíz (J y K), desde la epidermis hasta el tejido vascular a los 9 dpi.

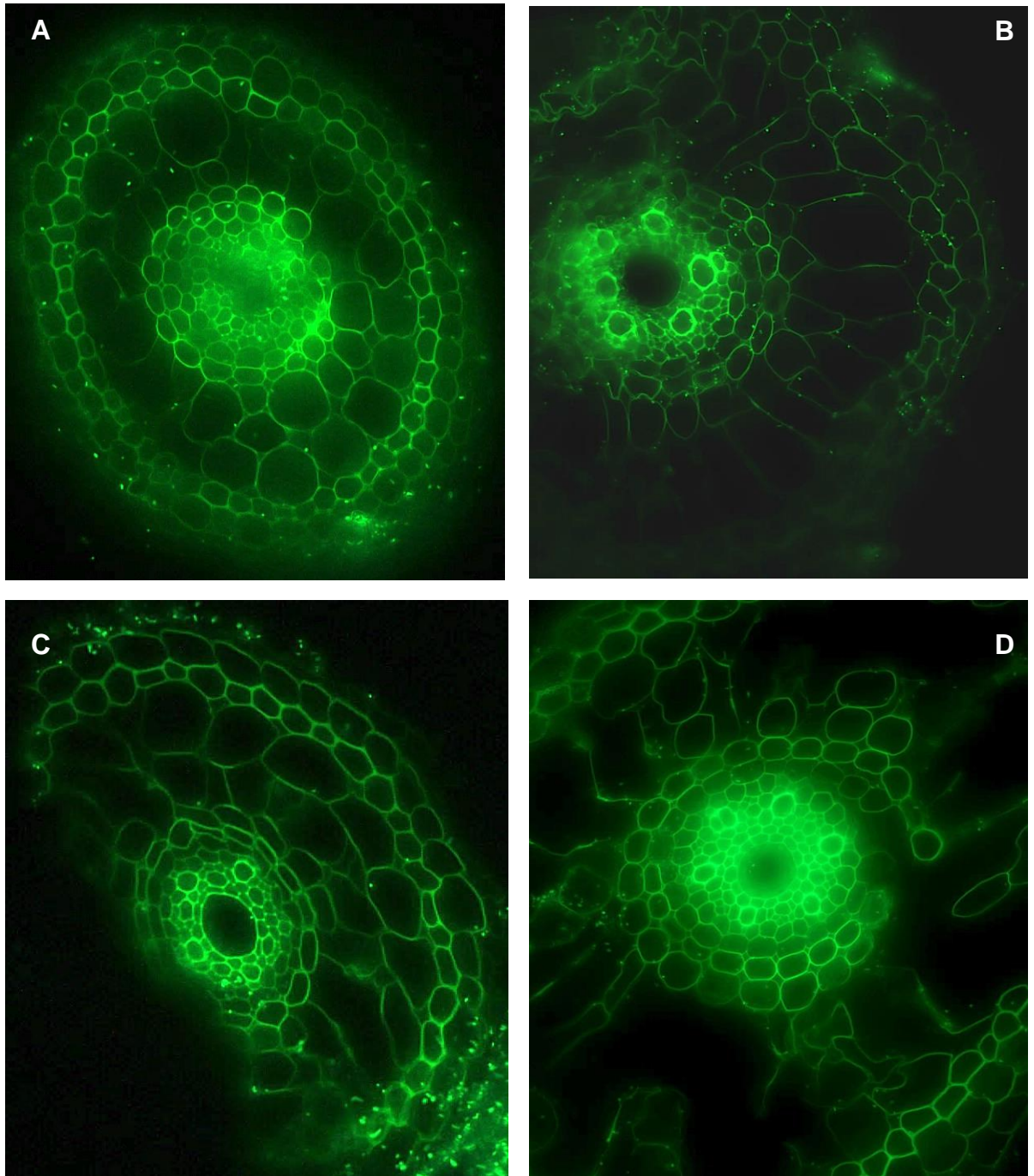


Figura 7. Ubicación tisular en cortes de raíces de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en arroz. *Oryza glumaepatula* accesiones: OG114 (A), OG131 (B), OG192 (C) y *Oryza sativa* - accesión Nipponbare (D).

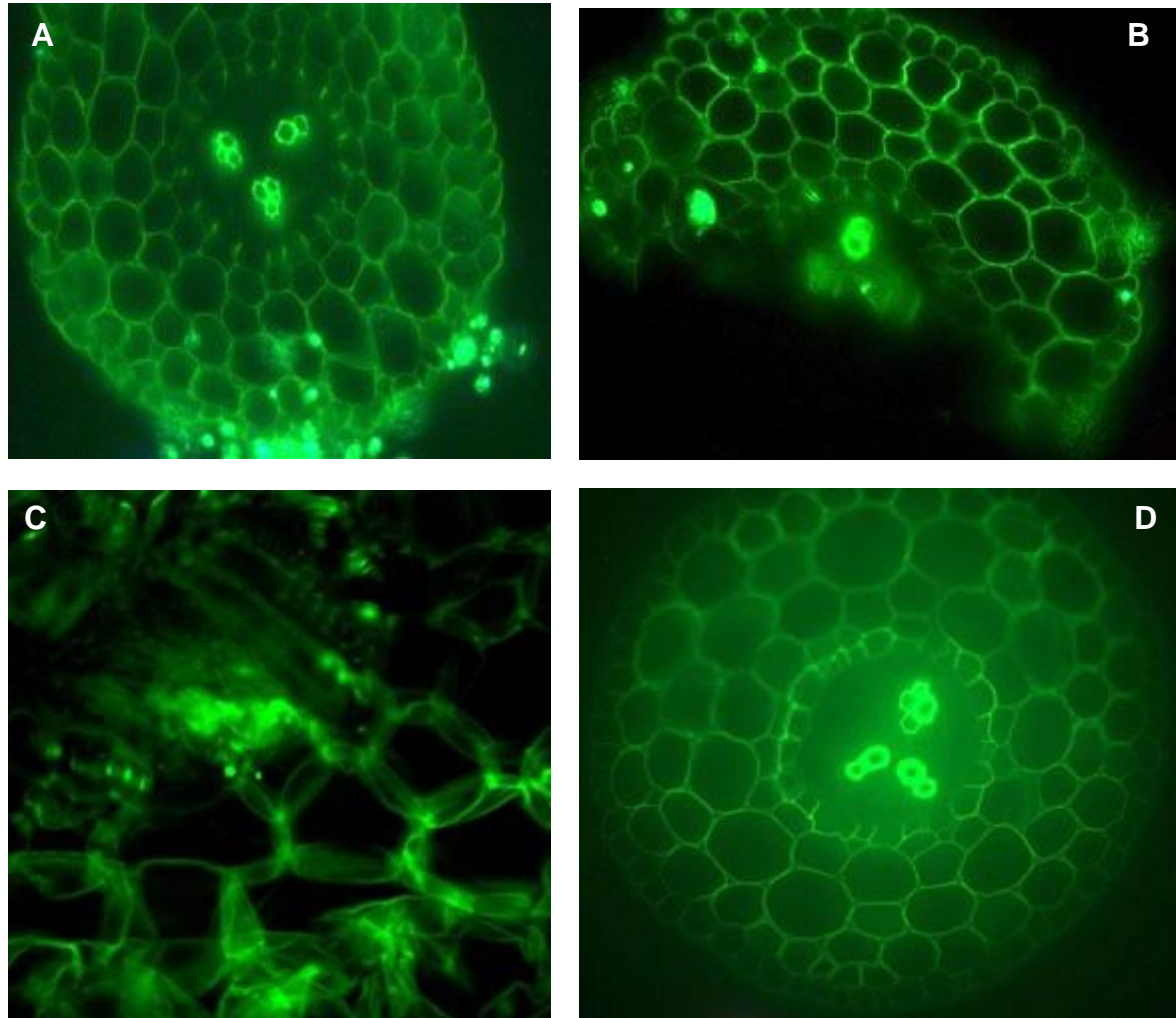


Figura 8. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en tejidos de *Leucaena leucocephala* observada 11 días después de inoculación (dpi). Visualización de SOG26 en tejido de raíces de *L. leucocephala*, 11 dpi (A-C). Control negativo del tratamiento (D).

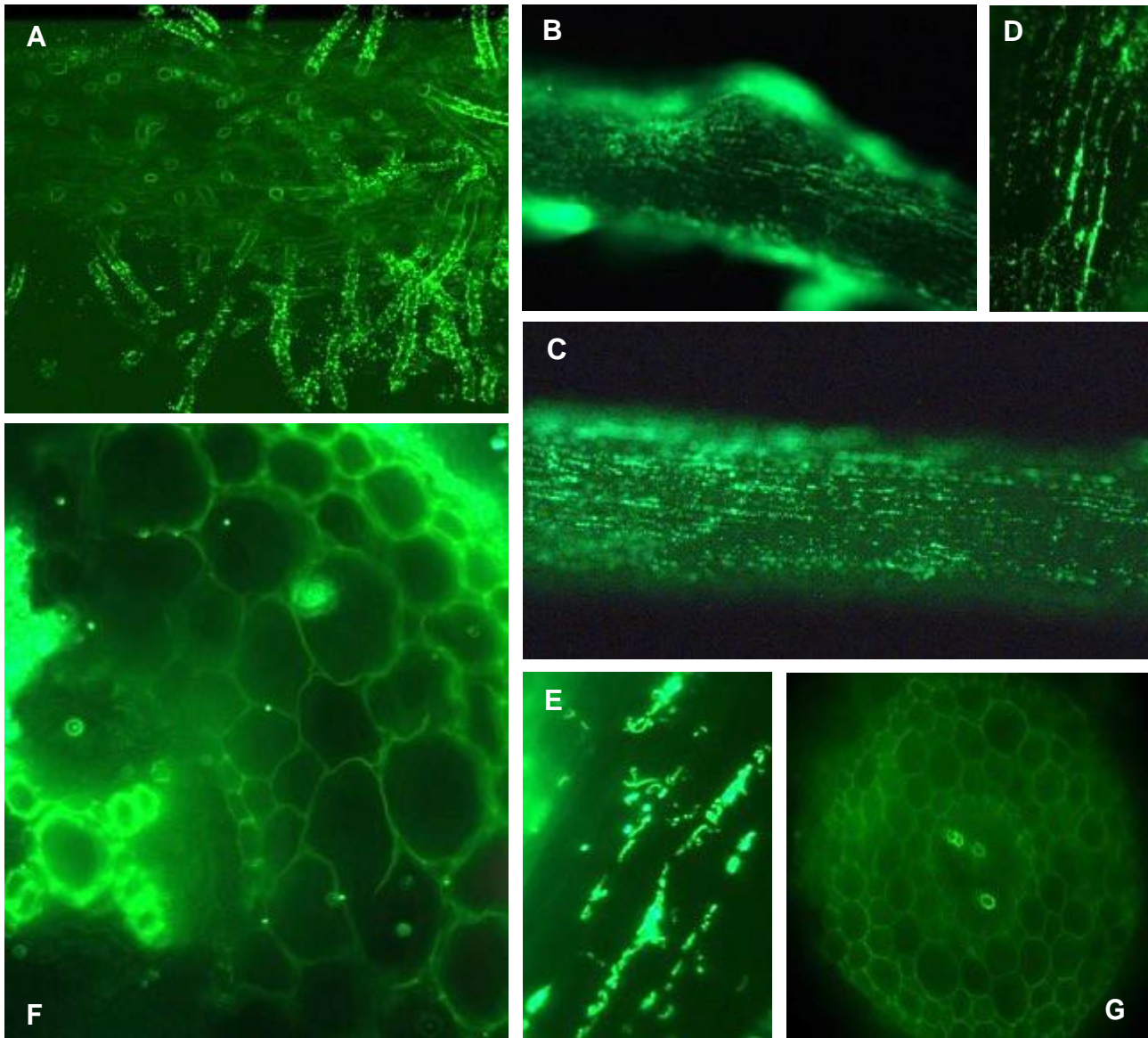


Figura 9. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en raíces de *Macroptilium atropurpureum* observada a los 11 días después de inoculación (dpi). Pelos radiculares colonizados por SOG26, a los 2 dpi (A). Establecimiento de hilos de infección y visualización de hilos de infección y localización entre células (B-E). Visualización de SOG26 en tejido de corte transversal de raíces de *M. atropurpureum*, a los 11 dpi (F). Control negativo del tratamiento (G).

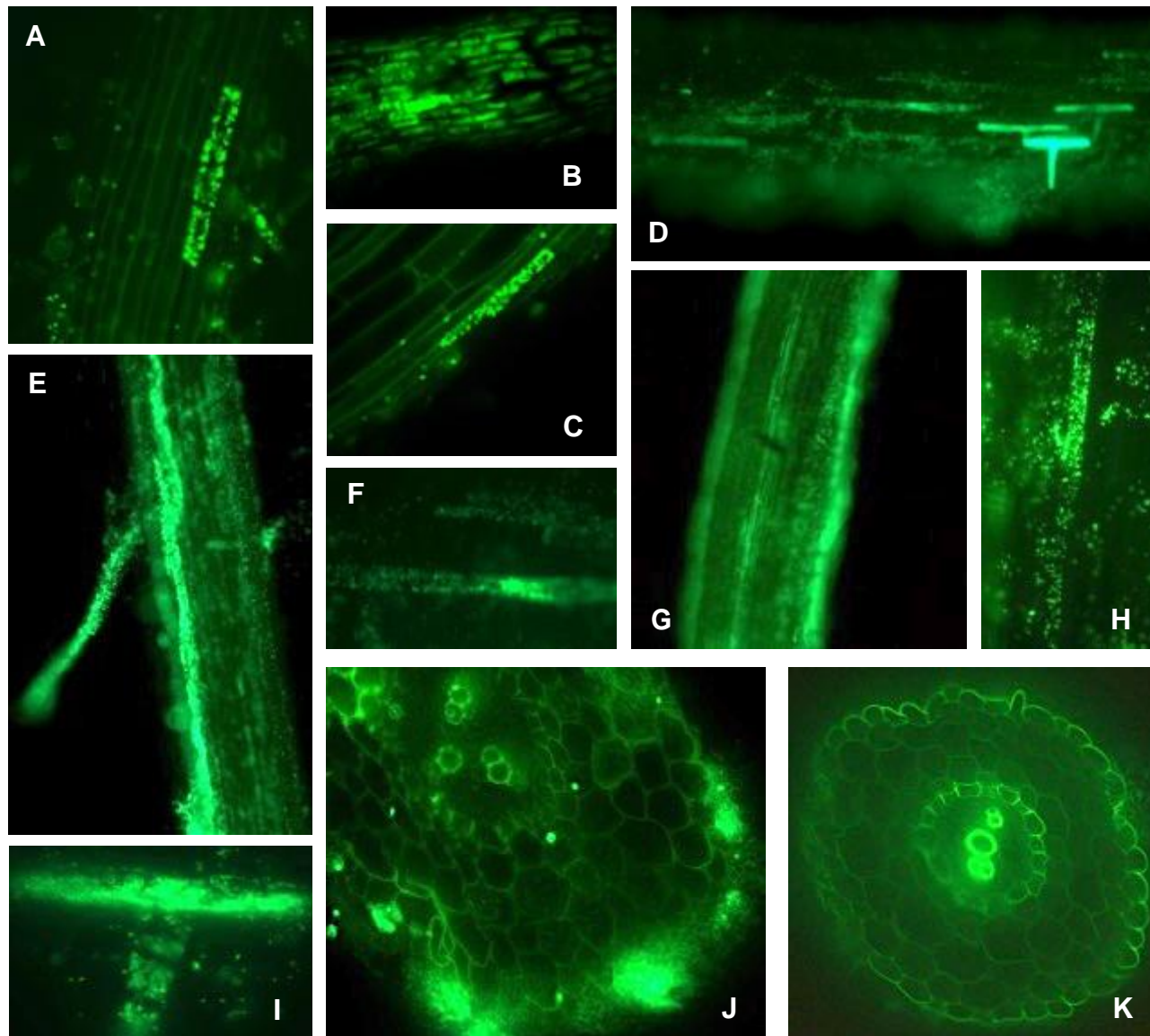


Figura 10. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en *Medicago lupulina* observada a los 11 días después de inoculación (dpi) a. Visualización de parches de colonización en raíces de *M. lupulina* en pelos radiculares, punta de la raíz y células enteras (A-C). Aumento de zonas colonizadas en *M. lupulina* (D), a los 9 dpi. Parches de colonización, hilos de infección y visualización e bacterias entre células (E-I). Visualización de SOG26 en tejido de corte transversal de raíces de *M. lupulina*, a los 11 dpi (J). Control negativo del tratamiento (K).

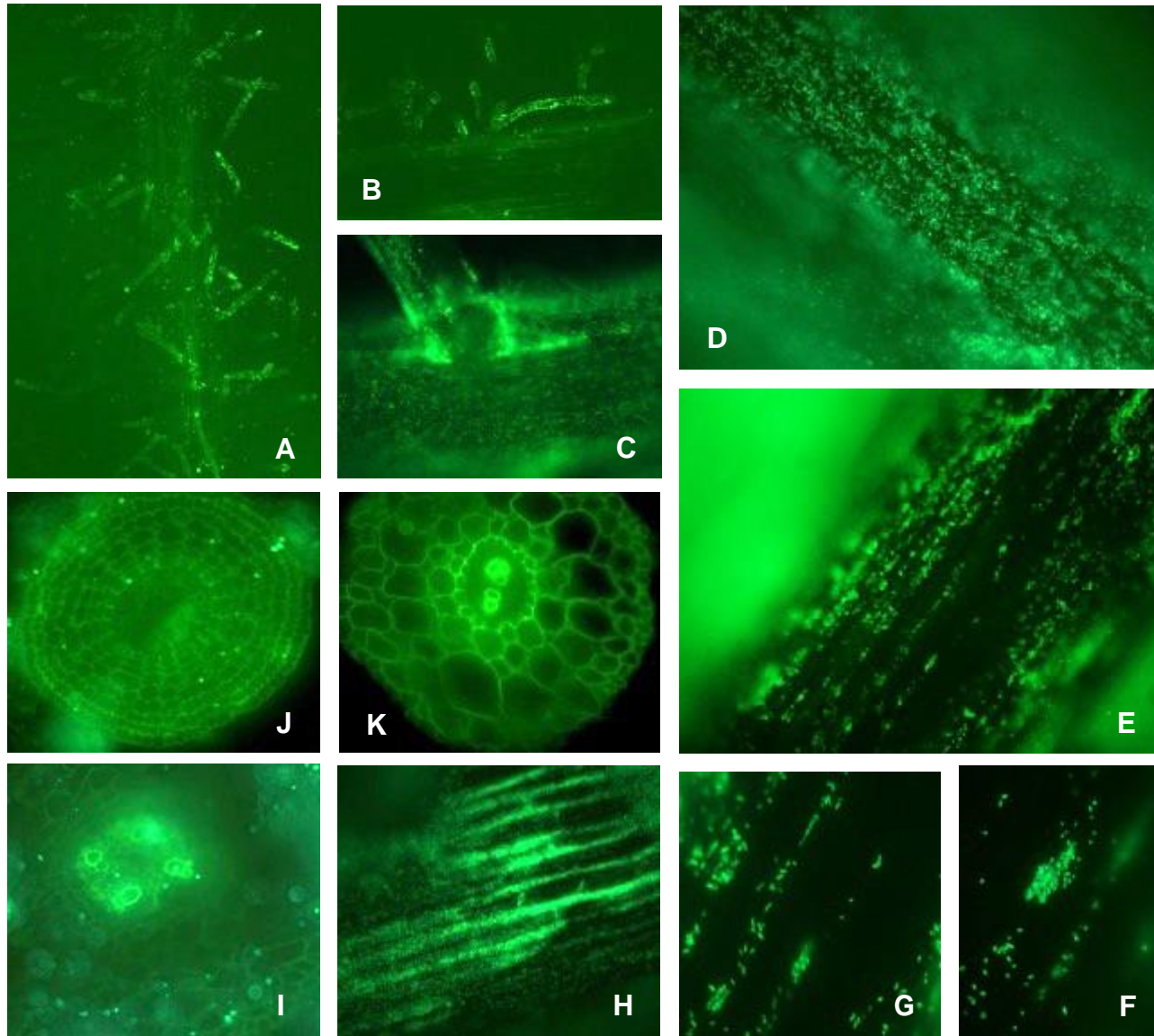


Figura 11. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) en *Sesbania herbacea* observada a los 11 días después de inoculación (dpi). Pelos radiculares colonizados por SOG26 2 dpi (A-B). Base de raíz secundaria colonizada e inicio de hilo de infección por medio de la emergencia de la raíz (C). Visualización de hilos de infección en raíces y localización de bacteria entre células (D-H). Visualización de SOG26 en tejido de corte transversal de raíces de *S. herbacea*, a los 11 dpi (J-I). Control negativo del tratamiento (K).

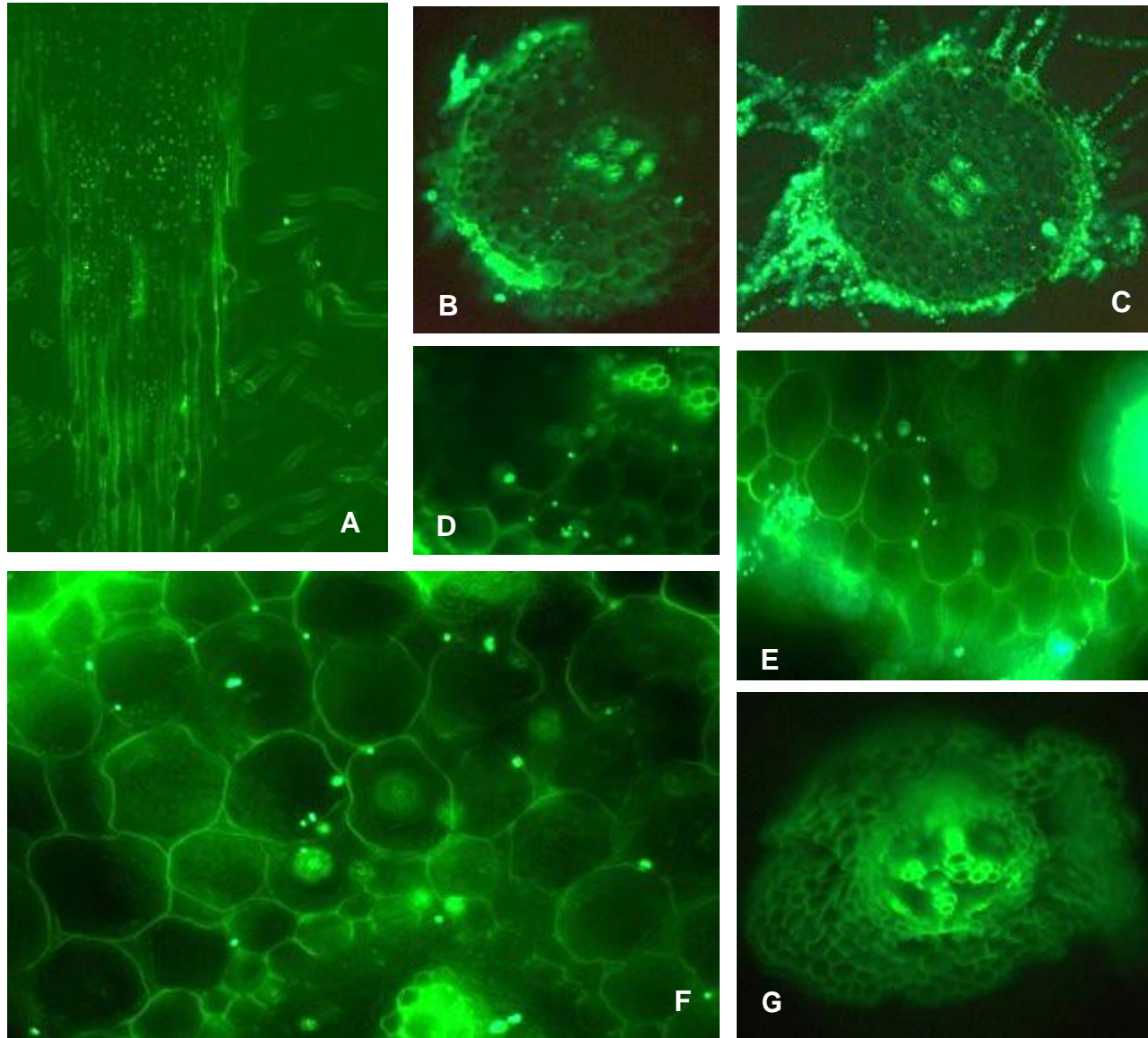


Figura 12. Colonización *Neorhizobium sp.* (SOG26) *Sesbania rostrata* observada 11 días después inoculación (dpi) Pe radiculares colonizados SOG26, 2 dpi (A). Visualización de SOG26 en tejido de corteza transversal de raíces de *rostrata*, 11 dpi (B-F). Control negativo del tratamiento (K).

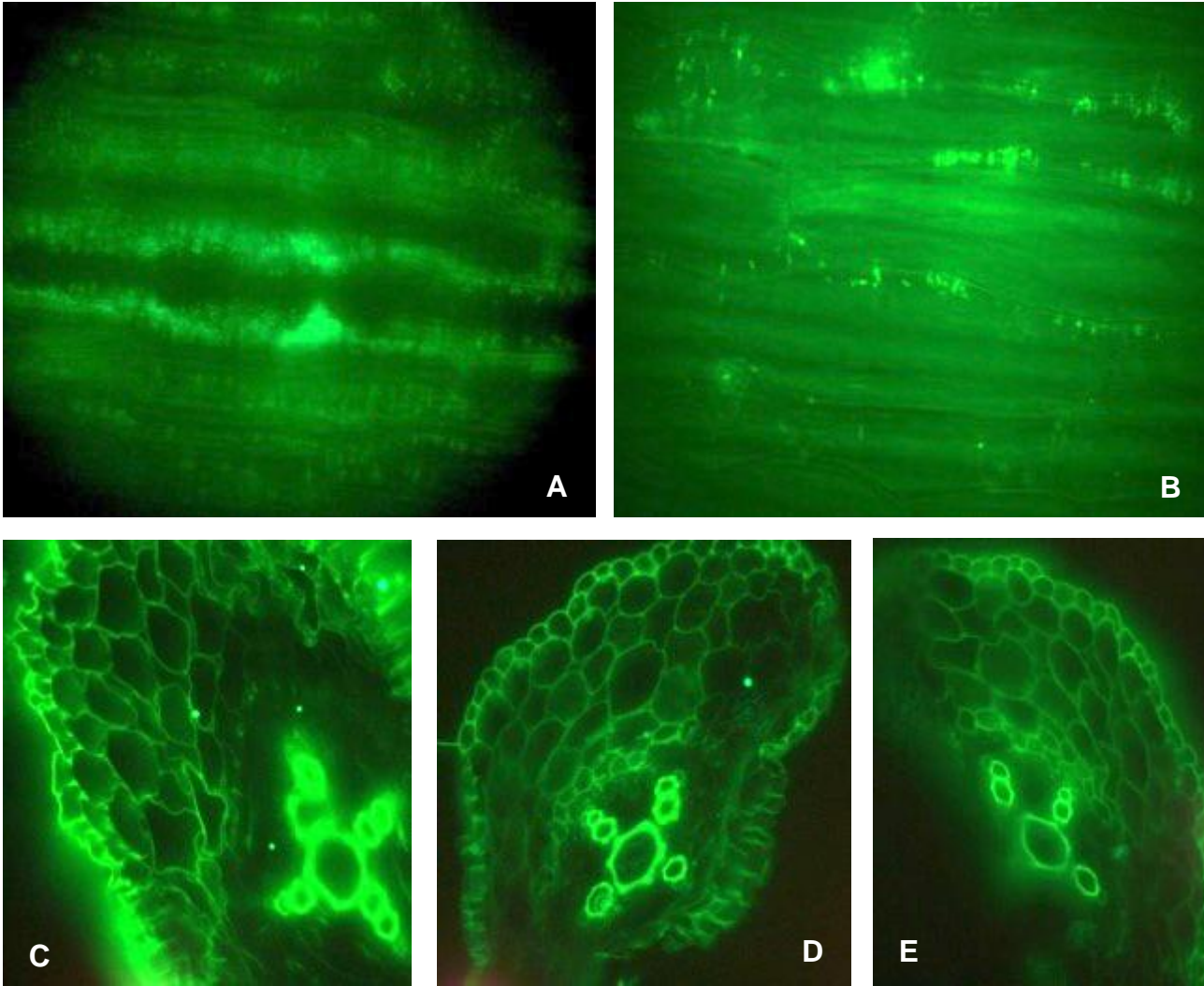


Figura 13. Colonización de *Neorhizobium sp.* (SOG26) observada a 11 días después de inoculación (dpi) en *Vigna radiata*. Visualización de parches de colonización en raíces de *V. radiata* y su localización entre células a los 11 dpi (A-B). Observación de SOG26 en tejido de corte transversal de raíces de *M. lupulina*, a los 11 dpi (C-D). Control negativo del tratamiento (E).

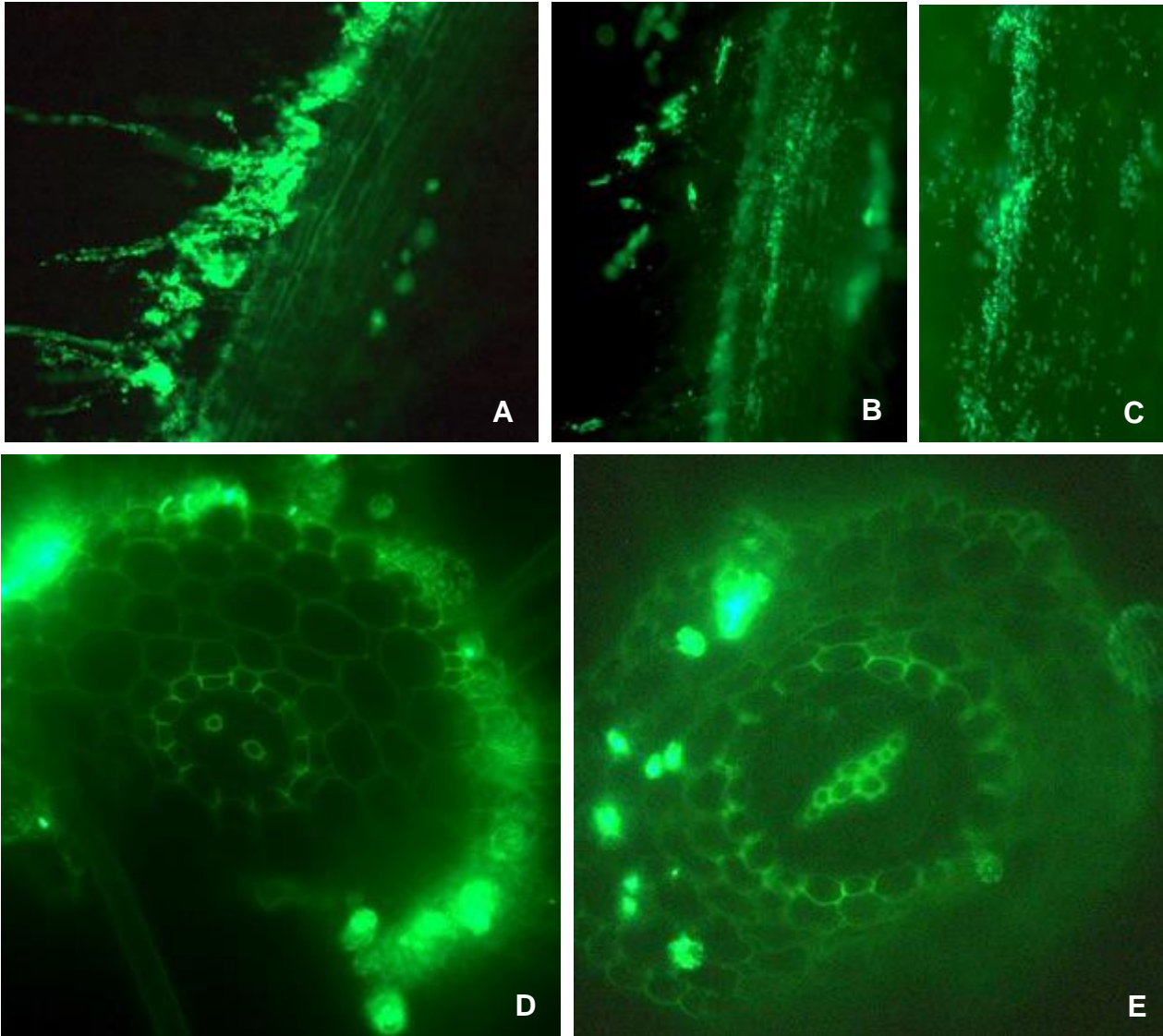


Figura 14. Colonización d *Neorhizobium* sp. (SOG26) observada a 11 días después d inoculación (dpi) en *Trifolium semipilosum*. Pelos radiculare colonizados por SOG26 en raíz de *T. semipilosum*, 2 dpi (A) Visualización de parches d colonización y de hilos d infección a los 11 dpi (B-C) Observación de SOG26 en tejido de corte transversal de raíces los 11 dpi (D y E).

2.5.3 Efecto de SOG26 sobre el crecimiento de plantas de arroz inoculadas

Después de realizar el seguimiento de la colonización de SOG26 en la raíces de las plantas de arroz a los 9 dpi, las plantas se transfirieron a suelo y se mantuvieron en la casa de malla de la Universidad Icesi. Pasados 112 dpi se cuantificó la altura, el número de hojas y el número de tallos de cada una de las plantas y se realizó un registro fotográfico.

La inoculación de las plantas de arroz con SOG26 promovió un aumento de la altura (Figura 15), aunque este no fue estadísticamente significativo para ninguna de las accesiones (Figura 16). Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas para el número de tallos y número de hojas.



Figura 15. Efecto de la colonización de SOG26 en plantas de arroz 112 días después de la inoculación (100 dpi). Visualización de diferencias en altura de plantas de arroz inoculadas con SOG26 comparadas con los controles negativos.

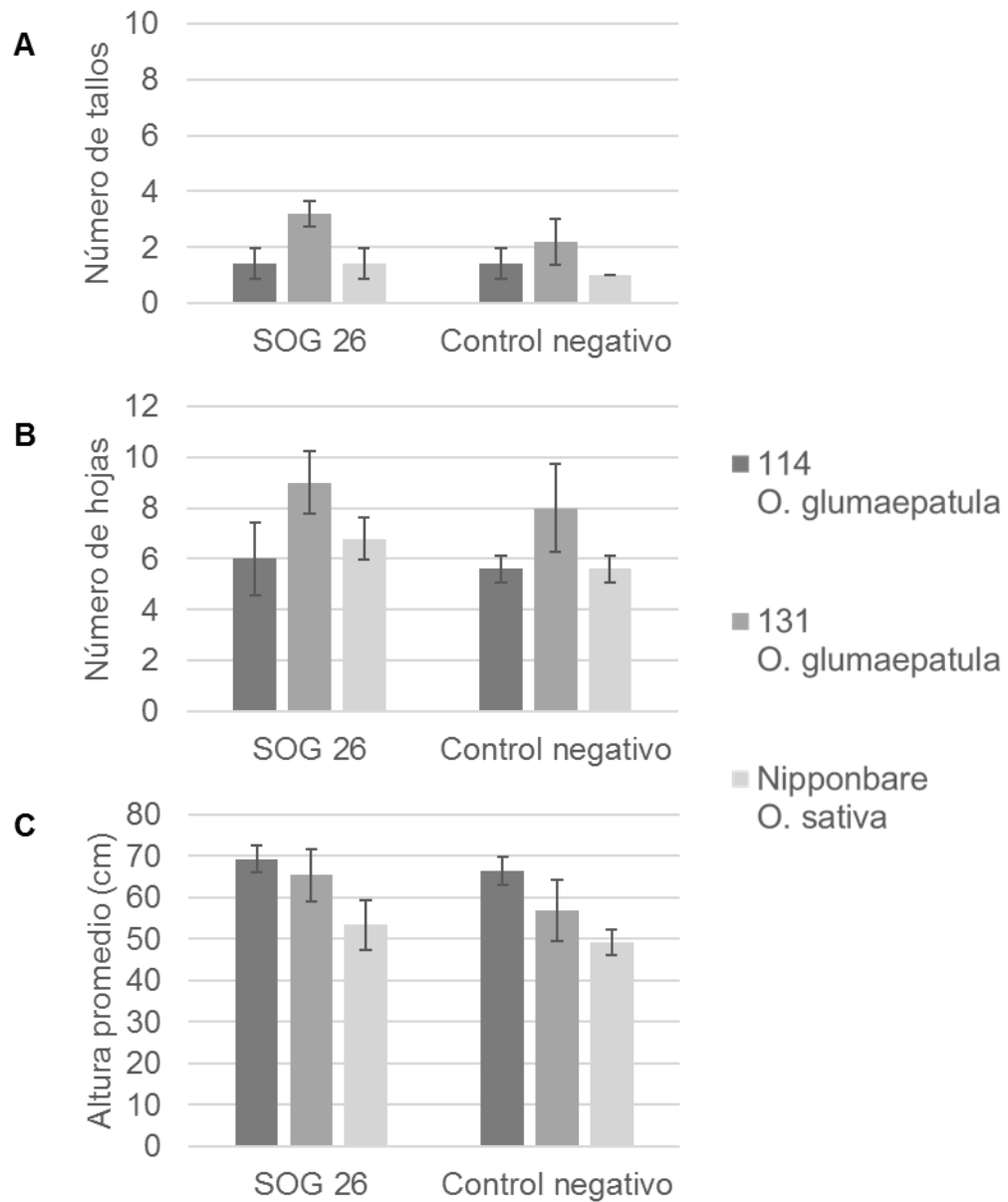


Figura 16. Efecto de la colonización de SOG 26 sobre el crecimiento de plantas de arroz 112 dpi. Número de tallos (A), número de hojas (B) y altura (C). Se determinó la significancia de acuerdo a un número de réplicas de 5 plantas por tratamiento.

2.5.4 Efecto de SOG26 y HAMB1540 sobre el crecimiento de plantas leguminosas inoculadas

La respuesta de crecimiento inducida por la inoculación con SOG26 y HAMB1540 en plantas leguminosas se evaluó para cada una de las condiciones de cultivo (Método del tubo y cultivo en suelo). Para ello, las plantas se retiraron de sus respectivos montajes y se fotografiaron.

Las condiciones de cultivo influyeron sobre el desarrollo de las plantas y en su respuesta a la inoculación con SOG26 y HAMB1540, observándose una limitación al crecimiento bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Figura 17 y 18).

Bajo ambas condiciones de cultivo, se observó un efecto positivo de la inoculación con SOG26. El efecto de la bacteria HAMB1540 fue más modesto (Figura 17). El efecto de la inoculación fue diferencial en las distintas especies de leguminosas, con una respuesta más notoria en *Sesbania herbácea*, *Sesbania rostrata* y *Macroptilium atropurpureu* (Figura 17).

Para el ensayo montado en suelo, se cuantificó la respuesta de crecimiento asociada a la inoculación mediante la medición de la altura, número de hojas y longitud de la raíz más profunda (Figura 18). Si bien se detectaron diferencias en estos parámetros, las mismas no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, estas plantas aún están muy jóvenes para reportar un cambio significativo en su biomasa, puesto que apenas tienen 35 dpi (Figura 17)

Para cada una de las especies de leguminosas se evaluó si la inoculación con SOG26 y HAMB1540 promovió el desarrollo de nódulos. Sólo la especie *Sesbania herbácea* mostró estas estructuras, tanto al ser inoculada con SOG26 como con HAMB1540 (Figuras 20 y 21). El color rosado es una de las características más importantes para determinar si un nódulo es efectivo o no, si su color es rosado, en el nódulo se están llevando a cabo procesos de fijación de nitrógeno atmosférico, si por el contrario su color es blanco, quiere decir que la bacteria tiene la capacidad de inducir su formación, pero que no tiene la capacidad de fijar nitrógeno.

Además, los nódulos deben de presentar una forma lobulada o circular, de acuerdo a su hábito de crecimiento y no ser una masa desorganizada de células. En nuestro caso, los nódulos exhibieron una forma circular y eran de color rosado, por lo que se puede afirmar que SOG26 y HAMB1540 indujeron la formación de nódulos efectivos. Por otro lado, las bacterias que se lojan dentro de estos tejidos, tienen a diferenciarse en bacteroides y se pueden visualizar como aglomeraciones en células del tejido, como lo muestra la Figura 22.

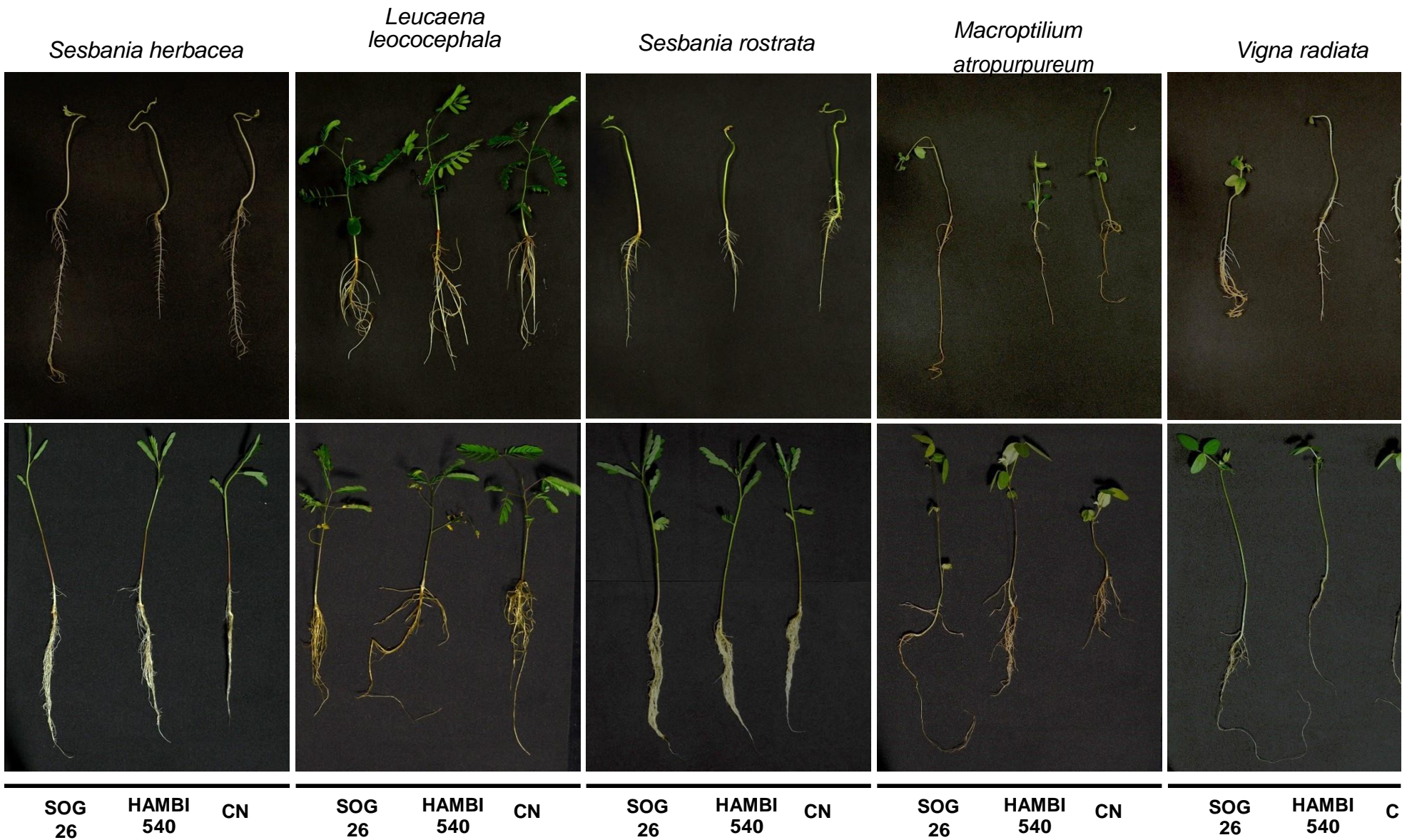


figura 17. Efecto de la colonización de SOG26 y HAMBI 540 en plantas leguminosas 35 días después de la inoculación (35 dpi). Visualización de diferencias en altura, número de hojas y sistema radicular de plantas inoculadas con SOG26 y HAMBI 540 comparadas con los controles en las diferentes metodologías utilizadas. Panel (A) Cultivo en tubo, Panel (B) Cultivo en tierra (B).

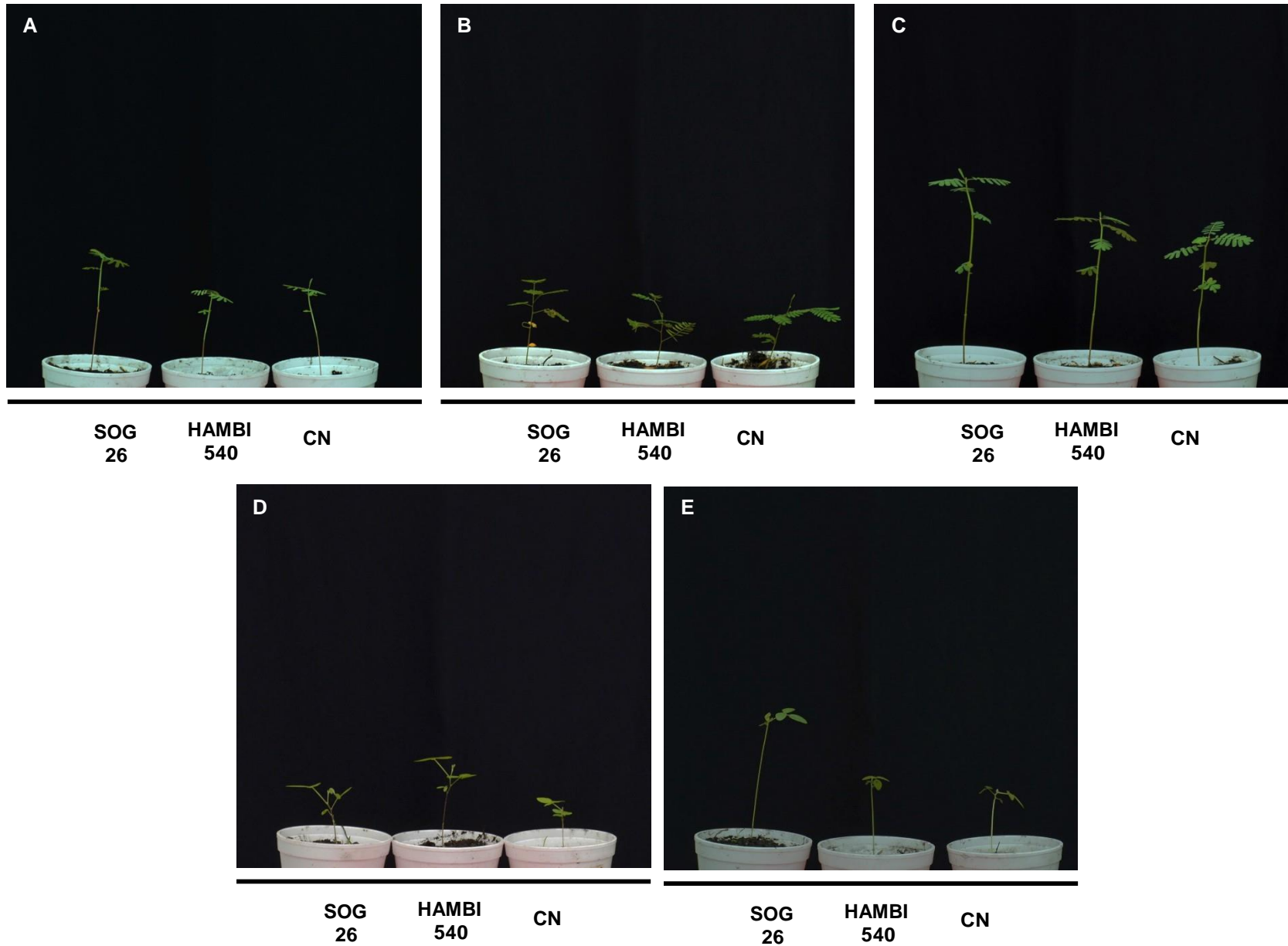


figura 18. Efecto de la colonización de SOG26 y HAMBI 540 en plantas leguminosas 35 días después de la inoculación (35 isualización de difectencias en altura, número de hojas de plantas en plantas inoculadas con SOG26 y HAMBI 540 compradas con ontroles negativos. *S. herbacea* (A), *L. leucocephala* (B), *S. rostrata* (C), *M. arthroporpureum* (D) y *Vigna radiata* (E)

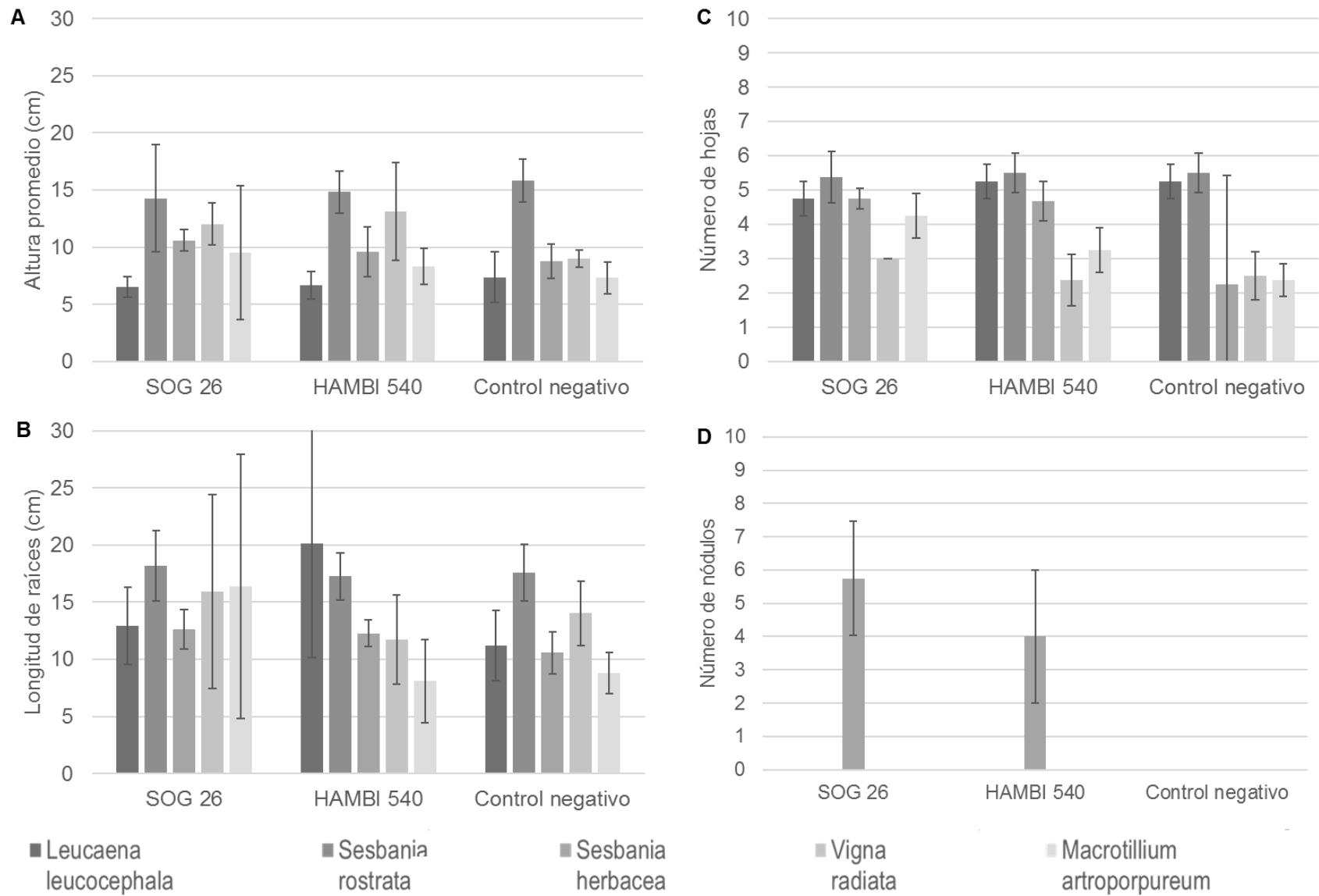
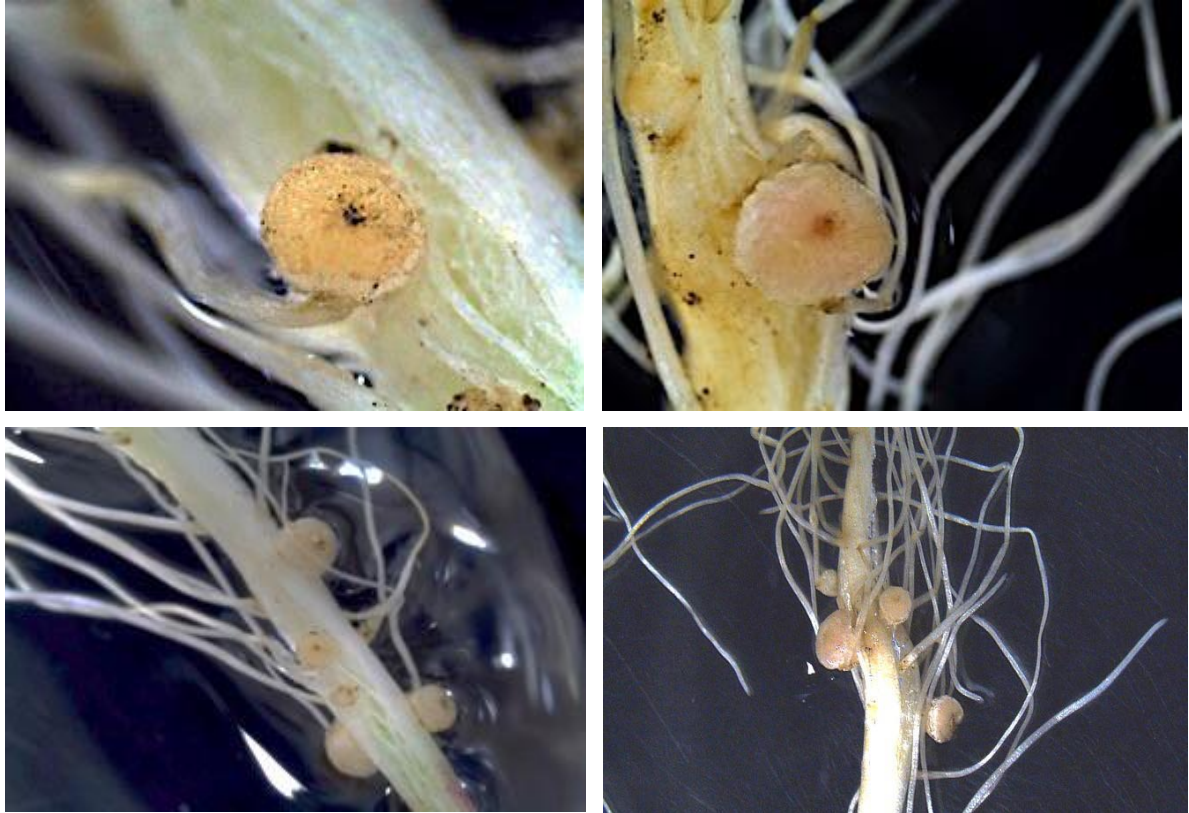


Figura 19. Medidas promedio para el efecto de la colonización de SOG 26 sobre el crecimiento de plantas leguminosas 35 dpi. Altura (A), longitud de raíces (B), Número de hojas (C) y Número de nódulos (D). Según el análisis estadístico no hay diferencias entre los tratamientos, por lo que no hay un efecto de la inoculación. Se determinó la significancia de acuerdo a un número de réplicas de 5 plantas por tratamiento.



Figura 20. Raíces de *S. herbacea* plantas inoculadas con SOG26, HAMBI540 y control negativo. Las plantas de *S. herbacea*, presentaron nódulos a los 35 dpi. Estos nódulos son efectivos, debido a su coloración rosada característica. Los nódulos están ubicados en la raíz principal, cerca de punto de unión con el tallo.



SOG 26

HAMI 540

Figura 21. Visualización de nódulos en raíces de *S. herbacea* inoculadas con SOG26 y HAMI 540. Las plantas de *S. herbacea*, presentaron nódulos 35 dpi. Estos nódulos son efectivos, debido a su coloración rosada característica. Los nódulos están ubicados en la raíz principal, cerca de punto de unión con el tallo.

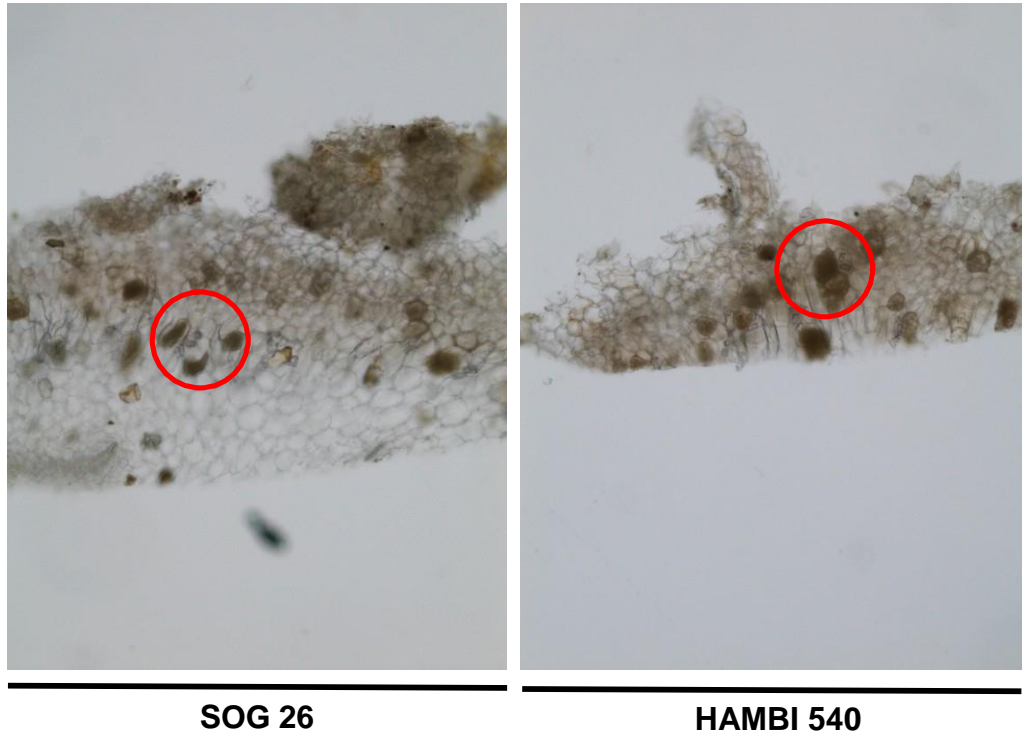


Figura 22. Visualización de bacterias dentro del tejido de los nódulos en raíces de *S. herbacea* inoculadas con SOG26 y HAMBI 540. Las plantas de *S. herbacea*, presentaron nódulos 35 dpi. Cortes realizados a mano alzada de estos nódulos evidencian la presencia de bacterias (círculos rojos) dentro de las células diferenciadas en nódulos.

2.6 DISCUSIÓN

2.6.1 Montaje experimental

En el estudio de la interacción planta-bacteria endófitas se requiere que se apliquen metodologías en las que predominen condiciones de asepsia, con el objetivo de eliminar toda fuente biológica de error. Al mismo tiempo, estas condiciones deben de ser viables para el mantenimiento, manejo y visualización del material al microscopio, por medio de métodos no destructivos. El montaje que se utilizó en este trabajo es una modificación del sistema propuesto por Perrine-Walker y colaboradores (2007). Este montaje permitió eliminar las fuentes de contaminación del medio de crecimiento *in vitro*. Entre las ventajas del diseño de este montaje experimental fueron: 1) Componentes autoclavables y 2) Manipulación de cada planta de forma individual y su contención en un tubo Falcon de 50 mL, permitiendo su monitoreo constante y descarte de contaminaciones en el experimento.

Entre los aspectos a resaltar del dispositivo utilizado están el sellado de los vidrios con un material (SuperFlex®) inerte, translucido y resistente tanto al calor como a la humedad. No obstante, el sistema mostró como limitación la restricción de la visualización bajo el microscopio al objetivo de 100X. La observación con el objetivo 100X exige que la planta sea retirada del dispositivo. Sin embargo, esta es una limitación menor, considerando que permite la manipulación no-destructiva de las plantas por periodos extendidos.

2.6.2 Colonización del tejido radicular por parte de SOG26

Los endófitos, como bien su nombre lo indica “en la planta”, son aquellos hongos o bacterias que pueden sobrevivir dentro de los tejidos de las plantas (Schulz, Boyle, & Sieber, 2006). Sin embargo, el término también posee connotación funcional y para denominarse endófitos, estos microorganismos deben ser “competentes”, es decir, deben colonizar con éxito una planta y ser capaces de modular su fisiología, de manera que son favorecidos selectivamente por la planta. De esta forma, se establece y mantiene la asociación planta-bacteria (Pablo R. Hardoim, van Overbeek, & Elsas, 2008).

En los ensayos de inoculación realizados con SOG26 marcada con GFP, se confirmó su hábito endófito en tejidos radiculares de las accesiones de arroz de las cuales fue originalmente aislada. SOG26 fue detectada en distintas capas celulares de la raíz, tanto a nivel intercelular como intracelular.

El monitoreo del proceso de colonización de tejidos de arroz por SOG26 mostró

que la entrada de la bacteria ocurre durante las primeras 48 h de incubación, siendo los pelos radiculares y los sitios de emergencia de las raíces laterales, los puntos de entrada más probables. Esto coincide con reportes en otras especies y se ha propuesto que durante las primeras etapas de la colonización, las bacterias se nutren a partir de los exudados radiculares, de células muertas del córtex y por último de residuos vegetales. (Chi et al., 2005; Pablo R. Hardoim et al., 2008; Perrine-Walker et al., 2007; Ryan, Germaine, Franks, Ryan, & Dowling, 2008; Santi et al., 2013; Schulz et al., 2006)

Una vez dentro de los tejidos, las bacterias endófitas colonizan inicialmente los espacios intercelulares, luego migran hacia el simplasma y por último se localizan en los tejidos vasculares, lugares ricos en nutrientes (Pablo R. Hardoim et al., 2008; Ryan et al., 2008; Schulz et al., 2006).

Se ha reportado que la migración de los endófitos en los tejidos de su planta hospedera es afectada por la presencia de flagelos, la producción de lipooligosacáridos, pilis, la movilidad espasmódica nerviosa, y por la secreción de enzimas que degradan la pared celular (CWDEs) (Compant, Clément, & Sessitsch, 2010; Ryan et al., 2008; Schulz et al., 2006). Es importante resaltar que no todos los endófitos tienen la capacidad de pasar del córtex, puesto que la endodermis representa una barrera difícil de traspasar, por lo que se cree que sólo las bacterias que secretan CWDEs, son capaces de colonizar los tejidos vasculares, flores, frutos y semillas (Compant et al., 2010).

Sin embargo, la planta ejerce control hormonal frente a los procesos de colonización por parte de los endófitos (Schulz et al., 2006; Sturz & Nowak, 2000). En plantas monocotiledóneas, como el arroz, este control es mediado por el ácido salicílico, el cual está involucrado en las respuestas del sistema basal de defensa de la planta, lo que quiere decir que los endófitos pueden ser percibidos como patógenos cuando su densidad poblacional no se controla (Ailloud et al., 2016; Compant et al., 2010). Este control es más agresivo cuando los endófitos infectan tejidos vasculares, como el xilema, dado que una vez ahí, las bacterias tienen la posibilidad de llegar a cualquier órgano de la planta (Compant et al., 2010; Pablo R. Hardoim et al., 2008; Schulz et al., 2006).

La asociación de un endófito a una planta, reporta diferentes beneficios para ésta, por lo que se considera una relación de mutualismo. En la mayoría de casos, las bacterias han demostrado ser promovedoras del crecimiento, rendimiento o agentes de biocontrol (Chi et al., 2005; Compant et al., 2010; Ryan et al., 2008; Schulz et al., 2006). En el caso de las bacterias endófitas capaces de fijar nitrógeno atmosférico, se ha demostrado su efecto promotor del crecimiento y del rendimiento en cereales. Otros efectos positivos incluyen: incremento de la tasa de germinación, tasa de elongación radical, vigor de plántulas, arquitectura radical, crecimiento del tallo, actividad fotosintética, conductancia estomática y contenido total de nitrógeno en tallos y granos (Chi et al., 2005; Kandel, Herschberger, Kim,

& Doty, 2015).

SOG26 se ha identificado como una bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico. En nuestra evaluación del efecto de la inoculación de esta bacteria sobre el crecimiento del arroz a los 112 dpi, no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la altura, número de tallos y número de hojas, a pesar de que cualitativamente se observó una respuesta a la inoculación. Sin embargo, en ensayos realizados previamente en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, se registró un efecto significativo de esta cepa sobre el crecimiento de plantas de arroz (Ghneim-Herrera *et al.*, sin publicar). La ausencia de tales efectos en el presente estudio pueden deberse al bajo número de réplicas evaluado que determinó una varianza importante en los datos.

Como se mencionó anteriormente, la asociación planta-bacteria se puede establecer durante todo el ciclo de vida de la planta y afectar diferentes procesos desde la adquisición de un nutriente específico, hasta la producción de hormonas o la respuesta de la planta al ataque de patógenos, de modo que la bacteria, a través de diferentes mecanismos modula la fisiología de la planta y puede afectar hasta características morfológicas (Sasaki *et al.*, 2013). La planta puede regular la interacción con la bacteria, modulando la entrada de la bacteria en sus tejidos y la densidad alcanzada por la bacteria una vez establecida (Ryan *et al.*, 2008).

En el análisis de los cortes realizado a los 9 dpi, se observó una mayor densidad de SOG26 en las raíces de *O. sativa* – cv. Nipponbare, en comparación con las accesiones de *O. glumaepatula*. Este resultado indica la existencia de factores reguladores de la interacción de SOG26 con genotipos de arroz y que determinan especificidad genotipo-genotipo (Chi *et al.*, 2005).

Las comunidades bacterianas que se asocian a plantas se pueden ver afectadas por diversos factores que determinan su presencia y sobrevivencia en el medio. El primero es el suelo, dado que actúa como una fuente o reservorio de bacterias que pueden colonizar tejidos, ya sea de manera endófito o epífita. Pero, es necesario recordar que las plantas, por medio de sus exudados, favorecen la colonización por parte de algunos microorganismos presentes en la rizósfera, mientras limita la entrada de otros. Por lo tanto, el genotipo de la planta puede considerarse un factor importante para el establecimiento de una asociación planta-bacteria, determinando la especificidad de la interacción. Sin embargo, existen otros factores que influyen sobre la composición y la diversidad de las comunidades bacterianas en tejidos de las raíces como el estatus fisiológico de la planta, mecanismos para la colonización de tejidos, condiciones abióticas, y en algunos casos el manejo agrícola aplicado a la planta (Dakora & Phillips, 2002; Pablo Rodrigo Haridoim *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2013).

En arroz se ha documentado la existencia de diferencias en las comunidades bacterianas dependientes del genotipo de la planta. Investigaciones que han

comparado los genotipos silvestres de arroz con los cultivares de *Oryza sativa*, indican que los genotipos silvestres tienen asociadas comunidades bacterianas menos diversas que *O. sativa*. Los autores asocian este fenómeno a los distintos hábitos de crecimiento y diferencias en la composición de sus exudados (Pablo Rodrigo Hardoim et al., 2011; Hung, Kumar, Govindsamy, & Annapurna, 2007). Sin embargo, no se debe descartar la influencia del control genético y hormonal ejercido por la planta sobre la población de endófitos que colonizan sus tejidos, la cual puede ser más estricta en genotipos silvestres que en cultivares, lo que explicaría porque los genotipos de *O. glumaepatula*, exhibieron una menor densidad de SOG26 en comparación con *O. sativa* - Nipponbare.

2.6.3 Inducción a la formación de nódulos y evaluación de la colonización en plantas leguminosas generalistas por parte de *Neorhizobium sp.* SOG26 y *Neorhizobium galegae* sv. *orientalis* HAMBI 540

Las plantas leguminosas se caracterizan por establecer relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico pertenecientes al grupo de los Rizobios. Esta interacción requiere de un intercambio de señales entre las células de la raíz de las plantas y las bacterias. Una vez la relación se establece, se generan señales que inducen la formación de un órgano especializado (nódulo) para el alojamiento de las bacterias y la síntesis de una molécula similar a la hemoglobina llamada leghemoglobina, la cual disminuye la concentración de oxígeno en el nódulo. La síntesis de leghemoglobina es un indicador de funcionamiento del nódulo, pues la fijación biológica de nitrógeno es inhibida en presencia de oxígeno (Beermann, Piccoli, Viereck, & Thum, 2016; Brewin, 1974; Cohn, Bradley Day, & Stacey, 1998; Masson-Boivin, Giraud, Perret, & Batut, 2009b).

El desarrollo de nódulos y la colonización en tejidos vegetales por parte de los rizobios está localmente controlada mediante mecanismos de retroalimentación entre la bacteria y su planta hospedera, conocido como “autoregulación de nodulación” (AON) y es un sistema de señalización a larga distancia, dado viaja desde el tallo hasta la raíz; los péptidos de cadena corta y hormonas han sido propuestos como señales en este proceso (B. J. Ferguson & Mathesius, 2014; B. Ferguson, Meng-Han, & M., 2013). Esta señalización media la percepción de factores Nod por la planta y la infección, iniciación, desarrollo, posición y autorregulación del nódulo (B. J. Ferguson & Mathesius, 2014).

La inducción a la formación de nódulos involucra dos procesos, el primero es la colonización de la células del córtex y el segundo el desarrollo del nódulo. Debido a que estos procesos involucran un alto gasto energético, la planta hospedera regula cada uno de ellos, llegando a controlar hasta el número de nódulos que se pueden desarrollar en sus raíces, en función de la presencia de factores Nod y la disponibilidad de nitrógeno (Brewin, 1974; Cohn et al., 1998; B. J. Ferguson &

Mathesius, 2014). Por otro lado, se ha señalado que en estos procesos de inducción de la nodulación, están implicados RNAs funcionales, el más estudiado hasta la fecha es el ENOD40, el cual está clasificado como un RNA con propiedades codificantes en la regulación del metabolismo de azúcares y el crecimiento de cotiledones y raíces; y no codificantes en la formación de nódulos (Sampath & Ephrussi, 2016; Shin & Shin, 2016). Por otro lado, el proceso de nodulación también es afectado por el medio de crecimiento de la planta hospedera, debido a que factores como la composición del suelo, el contenido de agua, la temperatura, disponibilidad de oxígeno y el pH pueden influir sobre señales presentes en la rizósfera, promoviendo o inhibiendo la nodulación (B. Ferguson et al., 2013; Wang & Martinez-Romero, 2000).

En esta investigación se demostró la capacidad de SOG26 de la colonizar el córtex de la raíz en las diferentes plantas leguminosas evaluadas, tanto los espacios intercelulares como intracelulares. Al igual que en los ensayos de colonización realizados con arroz, se observó una mayor densidad bacteriana en las zonas de emergencia de los pelos radiculares y raíces secundarias, lo cual indicaría que estas son los puntos de entrada de la bacteria al interior de los tejidos. En varias leguminosas, se observó la formación de líneas intercelulares de colonización conocidas como “hilos de infección”, comunes en etapas de la infección previas a la desarrollo del primordio de los nódulos (Perrine-Walker et al., 2007). Sin embargo, con la excepción de *Sesbania herbácea*, ninguna de las leguminosas colonizadas por SOG26 desarrolló nódulos. Esta especie también desarrolló nódulos al ser inoculada con HAMB1540.

Es importante mencionar que una vez la bacteria ha colonizado el tejido radicular, se diferencia en bacteroides, debido a que la planta encapsula a los simbioses en una membrana, donde provee la condiciones óptimas para la fijación de nitrógeno (Becker, 2017; Li et al., 2013). Como se puede observar en los cortes de los nódulos inducidos por SOG26 y HAMB1 540 en las raíces de *S. herbacea*, se pueden apreciar un patrón de agrupamiento, que se caracteriza por tener un color rosado intenso. Esto puede indicar que las bacterias están fijando nitrógeno, debido a la síntesis de Leghemoglobina.

Plantas del género *Sesbania* se encuentran ampliamente distribuidas en África y América. Se han reportado diferencias relacionadas con la geografía entre los simbioses que pueden hospedar estas plantas, con *Azorhizobium* y *Sinorhizobium* siendo más comunes en plantas del continente africano y *Rhizobium* y *Neorhizobium* en el continente americano (Wang et al., 1998). *Sesbania herbacea* es una especie de leguminosa acuática nativa de la Sierra de Huautla en México. De los nódulos de esta especie se han aislado dos especies de bacterias pertenecientes al género *Neorhizobium*, *N. huautlense* S02 y *N. galegae* HAMB1 540, ambas presentes en suelos inundados en los que la planta es nativa (Wang et al., 1998; Wang & Martinez-Romero, 2000). Trabajos realizados por Wang et al. 1998, señalan que la limitada diversidad de cepas

aisladas de los nódulos de *S. herbacea* es determinada por su hábito de crecimiento (crece en suelos inundados) (Wang et al., 1998; Wang & Martínez-Romero, 2000).

Por otro lado, en zonas inundables de Venezuela también se han reportado especies del género *Sesbania*. Estudios de sus simbioses han reportado la presencia de *Mesorhizobium plusifarium* y *Neorhizobium huatlense* (Vinuesa et al., 2005). Teniendo en cuenta que las accesiones a partir de las cuales se aisló SOG26 provienen de Venezuela, es posible que SOG26 coexista con *N. huatlense*, y posea mecanismos similares que faciliten la colonización de las raíces de *Sesbania*. Alternativamente podría proponerse que SOG26 es una variante de *N. galegae* o de *N. huatlense*.

2.6.4 Identificación de SOG26

El genoma de la cepa SOG26 ha sido completamente secuenciado como parte del trabajo que se adelanta en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi. Su comparación con el genoma publicado para *N. galegae* HAMB1540, utilizando la herramienta Blast Genome del GenBank, ha revelado una similaridad de 95%, la cual está por debajo del umbral (97%) para considerarlo una variante de esta especie.

Actualmente no se cuenta con la secuencia de genoma completo para *N. huatlense*. Sin embargo, la comparación de las secuencias de genes “housekeeping” (16S rRNA, *rpoB*, *glnA*, *atpD*, *recA*) arroja índices de similaridad en el rango 85-95%, también por debajo del umbral para considerarlo una variante de esta especie.

Por lo tanto, SOG26 representaría una nueva especie de *Neorhizobium*, capaz de colonizar los tejidos de arroz y de inducir nódulos en al menos una especie de leguminosas, *Sesbania herbácea*.

2.7 CONCLUSIONES

1. SOG26 representa una nueva especie de *Neorhizobium*, capaz de colonizar los tejidos de arroz y de inducir nódulos en al menos una especie de leguminosas, *Sesbania herbácea*.
2. Se identificó el hábito endófito de SOG26 en tejidos de raíces de plantas de arroz, de las cuáles fue originalmente aislada *O. glumaepatula* – accesiones OG114, OG131 y OG192; *O. sativa* – accesión Nipponbare. Sin embargo, en estas plantas no se encontraron diferencias significativas en la promoción del crecimiento, número de hojas y de tallos a los 112 dpi, comparado con los controles negativos. No obstante, se observaron diferencias en la densidad de la colonización respecto a los genotipos, siendo Nipponbare, la accesión con mayor densidad de bacterias en sus tejidos.
3. Se determinó la localización tisular de SOG26 en cortes transversales de raíces de arroz y leguminosas a los 9 dpi y 11 dpi, respectivamente. En todas las especies se observó la localización preferencial de la bacteria en tejidos del córtex, exodermis y epidermis. Para las plantas de arroz, se observó la presencia de SOG26 en los tejidos vasculares.
4. Se identificó la capacidad de SOG26 de colonizar tejidos de plantas leguminosas, sin embargo, esta colonización no afectó significativamente el crecimiento de las plantas a los 35 dpi.
5. Se logró optimizar un protocolo de inducción de la formación de nódulos en plantas leguminosas generalistas, identificando a *S. herbacea* como la primera leguminosa en la que SOG26 induce la formación de nódulos. Se puede especular que plantas pertenecientes al género de *Sesbania* representan leguminosas generalistas para bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género de *Neorhizobium*.
6. Se diseñó un montaje de vidrio que cumplió con la mayoría de requerimientos para el mantenimiento, visualización y manipulación de las plantas.

2.8 RECOMENDACIONES

1. Establecer la localización tisular de *Neorhizobium sp.* SOG26 en otros tejidos de arroz como tallos, hojas y semillas.
2. Utilizar un número mayor de réplicas en ensayos de colonización de arroz, para que se pueda evidenciar el efecto de SOG26 sobre el crecimiento de plantas y además, adicional a las medidas de altura, número de hojas y número de tallos, recomendamos evaluar la actividad fotosintética, conductancia estomática, arquitectura radical y contenido total de nitrógeno en plantas de arroz inoculadas con SOG26.
3. Realizar un ensayo de colonización utilizando: *Neorhizobium sp.* SOG26, *Neorhizobium galegae* sv. *orientalis* HAMBI 540 y *Neorhizobium huautlense*, empleando el marcaje con proteína autofluorescentes, para determinar la especificidad de la asociación, tanto en plantas de arroz como en plantas leguminosas generalistas.
4. Evaluar la capacidad de *Neorhizobium sp.* SOG26 de inducir nódulos en las plantas leguminosas especialistas *Galega orientalis* y *Galega officinallis*.
5. Implementar metodologías de inoculación directa en suelo.
6. Implementar análisis del contenido inicial y final de nitrógeno en el suelo como parte del diseño experimental.
7. Aislar y confirmar la identidad de las bacterias que se encuentran alojadas en los nódulos.
8. Emplear metodologías moleculares, como complemento, para determinar las proteínas y/o genes que están implicados en la comunicación celular entre *Neorhizobium sp.* SOG26 y las células de las raíces de plantas de arroz, como por ejemplo, las metodologías del doble híbrido (Y2H) o Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).
9. Evaluar la capacidad de SOG26 de colonizar y promover el crecimiento vegetal en plantas de interés agrícola como caña de azúcar, tomate, papa o ají.

3 BIBLIOGRAFÍA

- Ailloud, F., Lowe, T. M., Robène, I., Cruveiller, S., Allen, C., & Prior, P. (2016). *In planta* comparative transcriptomics of host-adapted strains of *Ralstonia solanacearum*. *PeerJ*, 4, e1549. <https://doi.org/10.7717/peerj.1549>
- Becker, A. (2017). Classic Spotlight : Bacteroids — Views of an Enigmatic Bacterial State in Root Nodule Symbiosis through the Centuries. *American Society For Microbiology*, 199(3), 16–17.
- Beermann, J., Piccoli, M.-T., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiological Reviews*, 96(4), 1297 LP-1325. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2015>
- Brewin, N. J. (1974). Development of the legume root nodule. *Cell Biology*, 22(2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s00246-010-9642-8>
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., & Zeyer, J. (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 240–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.240>
- Cheng, H. P., & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5183–5191.
- Chi, F., Shen, S., Cheng, H., Jing, Y., Yanni, Y. G., & Dazzo, F. B. (2005). Ascending Migration of Endophytic Rhizobia , from Roots to Leaves , inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology Ascending Migration of Endophytic Rhizobia , from Roots to Leaves , inside Rice Plants and Assessment of Benefits t, 71(11), 7271–7278. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7271>
- Chin-a-woeng, T. F. C., Priester, W. De, Bij, A. J. Van Der, & Lugtenberg, B. J. J. (1997). Description of the Colonization of a Gnotobiotic Tomato Rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strain WCS365 , Using Scanning Electron Microscopy, 10(1), 79–86.
- Cohn, J., Bradley Day, R., & Stacey, G. (1998). Legume nodule organogenesis. *Trends in Plant Science*, 3(3), 105–110. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01185-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01185-0)
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria

- in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Crespi, M., & Gálvez, S. (2000). Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 155–166. <https://doi.org/10.1007/s003440000023>
- Dakora, F. D., & Phillips, D. a. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245(1), 35–47. <https://doi.org/10.1023/A:1020809400075>
- Ferguson, B. J., & Mathesius, U. (2014). Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 770–790. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0472-7>
- Ferguson, B., Meng-Han, L., & M., G. P. (2013). Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signaling & Behavior*, 8(3), e23426. <https://doi.org/10.4161/psb.23426>
- Freeman, S. (2009). *Biología* (Tercera). Madrid, España: Pearson Educación S.A.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, a, Broughton, W. J., Rosenthal, a, & Perret, X. (1997). Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/387394a0>
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in Pseudomonas. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., ... Young, J. P. W. (1991). Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(4), 582–587. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-582>
- Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 154–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01092.x>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of

- bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- HIRSCH, A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122(2), 211–237. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb04227.x>
- Hung, P. Q., Kumar, S. M., Govindsamy, V., & Annapurna, K. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biology and Fertility of Soils*, 44(1), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0189-7>
- Ji, K. X., Chi, F., Yang, M. F., Shen, S. H., Jing, Y. X., Dazzo, F. B., & Cheng, H. P. (2010). Movement of rhizobia inside tobacco and lifestyle alternation from endophytes to free-living rhizobia on leaves. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 238–244. <https://doi.org/10.4014/jmb.0906.06042>
- Kandel, S. L., Herschberger, N., Kim, S. H., & Doty, S. L. (2015). Diazotrophic endophytes of poplar and willow for growth promotion of rice plants in nitrogen-limited conditions. *Crop Science*, 55(4), 1765–1772. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.08.0570>
- Larrainzar, E., O’Gara, F., & Morrissey, J. P. (2005). Applications of Autofluorescent Proteins for in Situ Studies in Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 257–277. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121350>
- Li, Y., Tian, C. F., Chen, W. F., Wang, L., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2013). High-Resolution Transcriptomic Analyses of Sinorhizobium sp. NGR234 Bacteroids in Determinate Nodules of *Vigna unguiculata* and Indeterminate Nodules of *Leucaena leucocephala*. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070531>
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1–2), 43–60.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 200–214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>
- Martine, A. R.; Mike, S. M. (2015). The Nitrogen Cycle. In B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for sustainable agriculture* (pp. 205–214). Switzerland: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009a). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, *17*(10), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009b). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, *17*(10), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>
- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., ... Lindström, K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *37*(3), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
- Österman, J., Marsh, J., Laine, P. K., Zeng, Z., Alatalo, E., Sullivan, J. T., ... Lindström, K. (2014). Genome sequencing of two Neorhizobium galegae strains reveals a noeT gene responsible for the unusual acetylation of the nodulation factors. *BMC Genomics*, *15*, 500. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-500>
- Österman, J., Mousavi, S. A., Koskinen, P., Paulin, L., & Lindström, K. (2015). Genomic features separating ten strains of Neorhizobium galegae with different symbiotic phenotypes. *BMC Genomics*, *16*, 348. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1576-3>
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *64*(1), 180–201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>
- Perrine-Walker, F. M., Prayitno, J., Rolfe, B. G., Weinman, J. J., & Hocart, C. H. (2007). Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, *58*(12), 3343–3350. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm181>
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., ... Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, *425*(6958), 585–592. <https://doi.org/10.1038/nature02039>
- Reddy, P. M., Aggarwal, R. K., Ramos, M. C., Ladha, J. K., Brar, D. S., & Kouchi, H. (1999). Widespread occurrence of the homologues of the early nodulin (ENOD) genes in Oryza species and related grasses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *258*(1), 148–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0458>
- Redondo-Nieto, M.; Bonilla, I.; Bolaños, L. (2008). Fijación Biológica de Nitrógeno.

Retrieved May 8, 2016, from
https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm

- Reis, V. M., Baldani, J. I., Lúcia, V., & Baldani, D. (2000). Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 3(19), 227–247.
- Ren, D. W., Chen, W. F., Sui, X. H., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2011). *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(3), 580–586. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023143-0>
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., ... Promé, J. C. (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell*, 67(6), 1131–1143. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90290-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90290-F)
- Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., & Ruíz-Saíenz, J. E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>
- Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Sampath, K., & Ephrussi, A. (2016). CncRNAs: RNAs with both coding and non-coding roles in development. *Development*, 143(8), 1234–1241. <https://doi.org/10.1242/dev.133298>
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), 743–767. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>
- Sasaki, K., Ikeda, S., Ohkubo, T., Kisara, C., Sato, T., & Minamisawa, K. (2013). Effects of Plant Genotype and Nitrogen Level on Bacterial Communities in Rice Shoots and Roots. *Microbes and Environments*, 28(3), 391–395. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12212>
- Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2013a). The Biosphere: biogeochemical Cycling on Land. In *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change* (Tercera, pp. 135–172). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385874->

0.00005-4

- Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2013b). The Global Cycles of Nitrogen and Phosphorus. In *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change* (Tercera, pp. 445–466). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385874-0.00005-4>
- Schulz, B. J. E., Boyle, C. J. C., & Sieber, T. N. (2006). What are endophytes? *Microbial Root Endophytes*, 9(November), 387. <https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9>
- Shamseldin, A., Applications, T., & Arab, B. El. (2013). The Role of Different Genes Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation - Review. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 8(4), 84–94. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjbb.2013.8.4.82103>
- Shin, S. Y., & Shin, C. (2016). Regulatory non-coding RNAs in plants: potential gene resources for the improvement of agricultural traits. *Plant Biotechnology Reports*, 10(2), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s11816-016-0389-4>
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 257–288.
- Sturz, A. V., & Nowak, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15(2), 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00094-9](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00094-9)
- Taiz, Lincoln; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (Quinta). Sunderland, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. Gran Bretaña: International biological programme.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J., & Martínez-Romero, E. (2005). 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 702–716. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.007>
- Wang, E. T., & Martínez-Romero, E. (2000). *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microbial Ecology*, 40(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s002480000010> [pii]
- Wang, E. T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X., & Martínez-Romero, E. (1998). *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of

Sesbania herbacea that has a close phylogenetic relationship with Rhizobium galegae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1 998), 687–699. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-687>

Zhu, H., Riely, B. K., Burns, N. J., & Ané, J. M. (2006). Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics*, 172(4), 2491–2499. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.051185>