

INFORME APIPES

PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN EN EL ÁREA MICROBIOLOGÍA

Caracterización del mutante del
rizobio *Cupriavidus* sp. cepa
UYMMa02A involucrada en las
primeras etapas de la interacción
con plantas hospederas.



Pasante: Virginia Armand Ugón.
Tutora: Dra. Virginia Ferreira.

Octubre 2022 – Febrero 2023.

INDICE

1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Leguminosas - <i>Mimosa</i>	3
1.2. Rizobios - <i>Cupriavidus</i> sp.	4
1.3. Fijación biológica de nitrógeno	4
1.4. Antecedentes	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
2.1. Hipótesis	10
2.2. Objetivos	10
2.2.1. Objetivo general	10
2.2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Preparación del material vegetal	11
3.2. Caracterización fenotípica de la mutante obtenida en el establecimiento de la simbiosis	11
3.2.1. Cuantificación de la capacidad de colonización y adhesión radicular	11
3.2.2. Evaluación de velocidad de nodulación, número de nódulos por planta y promoción de crecimiento.	12
3.3. Caracterización fenotípica de la cepa mutante <i>in vitro</i>	12
3.3.1. Evaluación de la capacidad y velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	13
4.1. Caracterización fenotípica de la mutante obtenida en el establecimiento de la simbiosis	13
4.1.1. Cuantificación de la capacidad de colonización y adhesión radicular	13
4.1.2. Evaluación de velocidad de nodulación, número de nódulos por planta y promoción de crecimiento.	15
4.2. Caracterización fenotípica de la cepa mutante <i>in vitro</i>	17
4.2.1. Evaluación de la capacidad y velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo	17
5. CONCLUSIONES	18
6. APÉNDICES	19
6.1. Medios de cultivos sólidos	19
6.2. Medios de cultivos líquidos	20
7. BIBLIOGRAFÍA	22

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Leguminosas - *Mimosa*.

Las leguminosas pertenecientes a la familia Fabaceae, comprenden árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales; pudiéndose encontrar 727 géneros reconocidos a nivel mundial, ordenados sistemáticamente en tres subfamilias, *Papilionoideae*, *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae*. La familia Fabaceae, se caracteriza por tener frutos tipo legumbre y hojas compuestas y estipuladas.

Es la segunda familia más importante a nivel económico y agronómico, después de las Gramíneas. En número de especies le superan únicamente las Orquidáceas y Asteráceas. Las leguminosas han sido reconocidas en cuatro biomas a nivel mundial: bioma de bosques tropicales secos y matorrales, semiáridos, intolerantes al fuego, ricos en suculentas y pobres en gramíneas; bioma de bosques tropicales estacionalmente secos, bosques abiertos y sabanas, tolerantes al fuego, pobres en suculentas y ricos en gramíneas; bioma de bosques tropicales húmedos y biomas templado, incluyendo los hemisferios norte y sur [1].

En Uruguay se encuentran una gran variedad de leguminosas, distribuidas a nivel nacional principalmente en praderas y montes. Cabe destacar que representan un grupo vegetal imprescindible a nivel nutricional del rumiante en pastoreo, ya que adecuan una dieta naturalmente pobre en proteínas, fósforo y minerales esenciales para su desarrollo. Las leguminosas presentan la ventaja adaptativa de ser autosuficientes en nitrógeno, tienen la capacidad de fijar el nitrógeno del aire en sus raíces, gracias a sus relaciones simbióticas con rizobios. De esta manera, ayudan a la fertilidad del suelo y el rendimiento de los cultivos, siendo de suma importancia en nuestro país [2].

El género *Mimosa* dentro de la subfamilia *Mimosoideae*, comprende unas 800 especies aproximadamente. Cuenta con especies herbáceas, arbustos, subarbustos, árboles y trepadoras leñosas. Son nativas de las regiones tropicales y subtropicales de los dos hemisferios y zonas templadas. En Uruguay particularmente, se está estudiando dicho género, ya que éste tiene la capacidad de generar simbiosis con proteobacterias, específicamente con β -proteobacterias (beta-rizobios), de los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia* [3].

1.2. Rizobios - *Cupriavidus*.

La fijación biológica de nitrógeno es uno de los procesos más importantes para mantener la vida en el planeta, pues proporciona alrededor del 70% de todo el nitrógeno requerido en los ecosistemas naturales y agro ecosistemas, manteniendo así la armonía con el medio ambiente. La asociación rizobio-leguminosa es considerada un proceso de alta eficiencia en fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) y puede ser capaz de abastecer hasta 90 % de las necesidades de nitrógeno en dichas plantas [3].

Los rizobios, son bacterias fijadoras de nitrógeno, que se encuentran a nivel del suelo y forman nódulos en las raíces y algunas veces en los tallos, de algunas especies de leguminosas. Dentro de los nódulos, el nitrógeno atmosférico, que es muy estable y relativamente inerte, se reduce a iones amonio fácilmente asimilables por la mayoría de las especies vegetales. Dichas bacterias, son bacilos gram-negativos, que miden $0.5-0.9 \times 1.2-3.0\mu\text{m}$, aerobios, flagelados (1 a 6 flagelos peritricos o subpolares). Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitraslúcidas u opacas y mucilaginosas, que miden de 2 a 4 mm de diámetro. Además, se clasifican en dos grandes grupos, α -proteobacteria y β -proteobacteria, éste último formado por los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus*.

El género *Cupriavidus*, como se mencionó anteriormente es una bacteria fijadora de nitrógeno, que además tiene su crecimiento potenciado con la presencia del cobre. Las bacterias de este género son bacilos gram-negativos, con flagelos peritricos, quimioheterotróficas o quimiolitotróficas. El metabolismo es oxidativo, utilizan varios aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno. Presentan actividad oxidasa y catalasa, así como la resistencia a varios metales pesados incluyendo cobre, zinc, cadmio, mercurio, cobalto, plata, entre otros [4].

1.3. Fijación biológica de nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, se encuentra distribuido en el suelo, en la biomasa y principalmente en la atmósfera, representando alrededor del 78% de los gases que la componen. Las complejas relaciones de intercambio entre estos tres reservorios de nitrógeno se conocen como ciclo del nitrógeno. El nitrógeno existente en la litosfera tiene una participación muy escasa en el ciclo del nitrógeno de la biosfera, ya que este nitrógeno mineral se encuentra atrapado en rocas ígneas y es por esto que la mayor parte del nitrógeno necesario para el crecimiento de las plantas proviene de la atmósfera. En las plantas es el cuarto elemento más abundante después del C, H y O, siendo un macronutriente esencial que forma parte de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, alcaloides, entre otros. Éstas pueden obtener el nitrógeno por absorción del suelo o estableciendo

asociaciones simbióticas con diversos organismos fijadores de nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+).

Hoy en día se utilizan fertilizantes nitrogenados en los cultivos, la principal vía de producción de éstos es la reacción de Haber-Bosch, mediante la cual el N_2 es reducido a NH_3 por el H_2 a temperaturas y presiones muy elevadas. La contaminación difusa derivada de la actividad agrícola es uno de los mayores problemas ambientales. Existe una gran preocupación, sobre todo, por el aumento de la concentración de nitratos en las aguas superficiales y subterráneas y, por otro lado, la contaminación atmosférica debida a los gases nitrogenados (N_2O , NO_2 , NH_3), que potencia el efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida. Estos problemas ambientales y sanitarios, originados por el aporte excesivo de fertilizantes nitrogenados en los cultivos, hacen que la FBN sea una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química. Además, la fijación biológica desempeña un papel muy importante en la economía del nitrógeno en la práctica agrícola, ya que la cantidad de nitrógeno disponible en la mayor parte de los suelos cultivados es escasa, y en la actualidad no puede ser suplementada a escala mundial mediante la producción de fertilizantes.

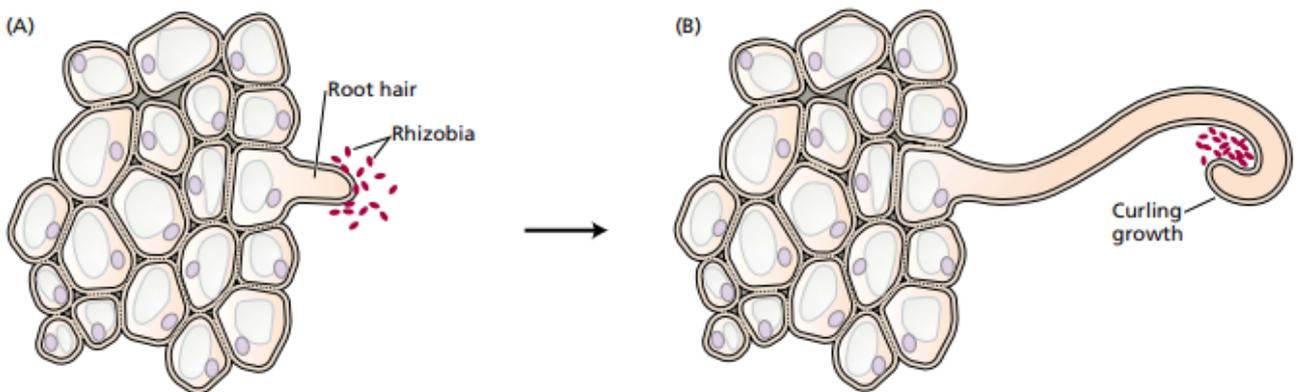
Entre los seres vivos, los únicos capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno son los organismos procariotas. Dentro de estos organismos fijadores de nitrógeno o diazótrofos, se encuentran las proteobacterias, es la división bacteriana más abundante, en la cual se encuentran los rizobios (bacterias de la familia Rhizobiaceae) que son capaces de generar simbiosis con algunas leguminosas.

La interacción o simbiosis entre las leguminosas y los rizobios es un proceso complejo que implica un intercambio de señales moleculares y reconocimiento por parte de ambos simbioses (Figura 1.1.). Las raíces de las leguminosas liberan flavonoides e isoflavonoides, compuestos fenólicos que inducen la expresión de los genes responsables de la nodulación (genes *nod*) en el microsimbionte. El tipo de flavonoides liberado por cada especie de leguminosa es específico para activar los genes de nodulación de una especie determinada de rizobio. Como resultado, estos genes o factores nod inducen una serie de respuestas en la planta, que incluyen: la deformación de los pelos radicales, éstos se empiezan a enrollar, y esto provoca la adhesión de las bacterias a la superficie del mismo; la división de las células corticales y la formación del nódulo. En este órgano, se van a depositar las bacterias y se va a llevar a cabo la FBN, con la participación de los genes *nif*; cabe destacar, que los genes *nod* y *nif* se encuentran en los plásmidos de los rizobios.

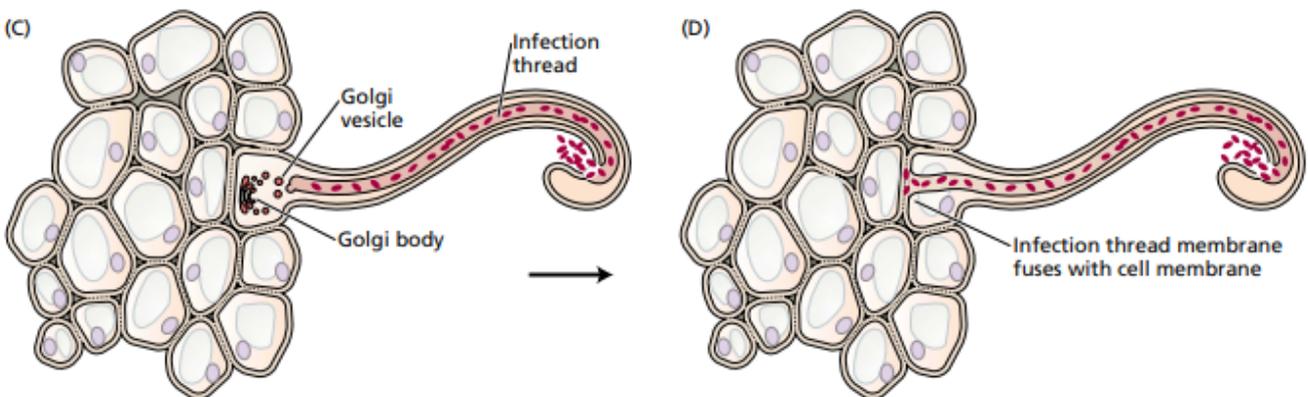
Para generar el nódulo, las bacterias penetran a través de la pared celular del pelo radical mediante la secreción de celulasas, quedando envueltas en una estructura tubular, conocida como cordón o hilo de infección, que progresa hacia la base del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz

de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal. Cuando el cordón de infección alcanza el tejido vegetal con actividad meristemática, comienza la diferenciación nodular propiamente dicha.

La liberación de rizobios del cordón de infección a células individuales del córtex se consigue mediante endocitosis, por lo que los rizobios se encuentran encerrados en una membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidea o simbiosomal, que les aísla del citoplasma de la célula huésped. Los rizobios se dividen activamente en las células infectadas y, quedan rodeados, individualmente o en grupos, por la membrana simbiosomal. Dicha membrana contiene material de tres orígenes: cordón de infección, retículo endoplasmático y síntesis de novo de membrana por el aparato de Golgi. En las especies con nódulos de crecimiento determinado, tan sólo algunas células son infectadas por los cordones de infección; tanto las células como las bacterias (o, mejor dicho, bacteroides) se dividen activamente hasta conformar el nódulo funcional [5].



(A) Rizobios adhiriéndose al pelo radicular; (B) Pelos radiculares enrollándose, provocando la adhesión de los rizobios a la superficie del mismo.



(C) Rizobios penetrando la pared celular del pelo radicular, quedando envueltas en una estructura tubular (hilo de infección); (D) Fusión de la membrana del hilo de infección con la membrana celular.

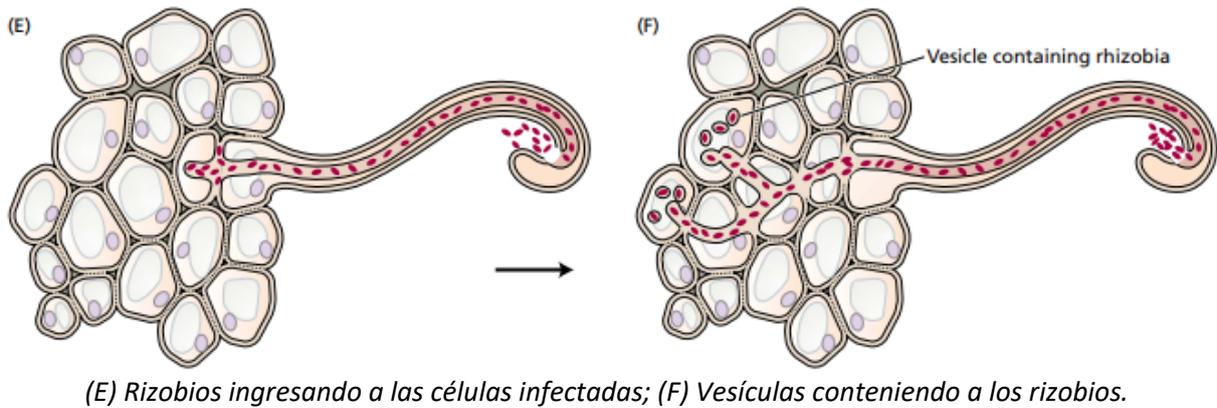


Figura 1.1. Interacción entre las leguminosas y los rizobios [6].

Antes de que se pueda llevar a cabo la FBN, es necesario el soporte nutricional (la planta le proporciona a la bacteria azúcares, proteínas, etc.) y crear un ambiente micro-aeróbico en el interior de los nódulos. De esta manera, se permite la supervivencia de los bacteroides con capacidad para fijar el nitrógeno, ya que dichos bacteroides contienen una enzima llamada nitrogenasa que se inactiva con el oxígeno. Por ello, los nódulos producen una proteína similar a la hemoglobina, llamada leghemoglobina, que ayuda a proveer de oxígeno para la respiración celular [5].

Dicho complejo enzimático nitrogenasa (Figura 1.2.), es el encargado de reducir el N_2 , según la siguiente reacción: $N_2 + 16MgATP + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16Pi$.

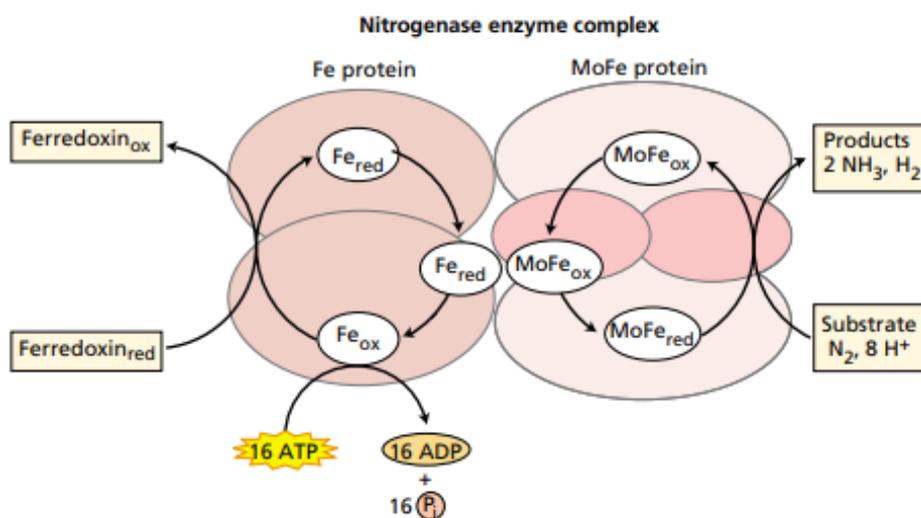


Figura 1.2. Complejo enzimático nitrogenasa.

El complejo enzimático nitrogenasa se puede separar en dos componentes, la ferro proteína (Fe-proteína) y la ferromolibdeno proteína (MoFe-proteína), dichas proteínas son las encargadas de catalizar la reducción de una molécula de di nitrógeno y convertirlos en dos moléculas de amonio. La reacción catalizada por la nitrogenasa requiere un donador de electrones, ATP, Mg^{2+} y una concentración sumamente baja de O_2 , ya que ambas proteínas son extraordinariamente sensibles al O_2 y se inactivan de forma irreversible cuando se exponen al aire. El principal dador de electrones es la ferredoxina, la cual reduce a la Fe-proteína, luego ésta, es capaz de reducir la MoFe-proteína y finalmente ésta última reducir el N_2 . Este proceso genera un gasto energético importante, la transferencia de cada electrón consume 2ATP y se requieren 6 electrones para reducir N_2 en $2NH_3$ y 2 electrones para reducir $2H^+$ a H_2 ; por lo tanto, se necesitan 16 moles de ATP para reducir un mol de N_2 . Además de fijar nitrógeno, la nitrogenasa produce hidrógeno, que puede ser reciclado parcial o totalmente en los nódulos. La producción de H_2 por la nitrogenasa supone una limitación importante para la fijación de N_2 , porque una parte del flujo de los electrones que atraviesa la nitrogenasa es utilizada para la reducción de H^+ en vez de para la reducción de N_2 [5] [6].

La capacidad para formar nódulos se ha observado en 3.400 especies de leguminosas que se encuentran en el 57% de los géneros de esta familia. Analizando las tres subfamilias de leguminosas por separado, podemos decir que la nodulación en el caso de *Papilionoideae*, ocurre en el 99 % de las especies y en un 93 % de los géneros. En la subfamilia *Mimosoideae*, la nodulación ocurre en el 97 % de las especies y en 88 % de los géneros. Por último, bastante menos habitual es la formación de nódulos en la subfamilia *Caesalpinioideae*, ya que ocurre sólo en el 21 % de las especies y en el 5 % de los géneros. Estos datos fueron tomados años atrás, por lo tanto, podrían variar en base a nuevas observaciones [7].

1.4. Antecedentes.

La gran mayoría de las bacterias aisladas a partir de nódulos obtenidos de *Mimosa* spp. en Uruguay, pertenecen al género *Cupriavidus*. La presencia de beta-rizobios asociados a mimosas nativas fue reportada por primera vez por el grupo de investigación del Dr. Platero [8]. La presente pasantía de investigación en el Área Microbiología, se sitúa dentro de una investigación desarrollada y llevada a cabo por el Dr. Raúl Platero en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para estudiar la diversidad de beta-rizobios encontrados en Uruguay, el grupo de investigación del Dr. Platero ha secuenciado y estudiado los genomas de 10 cepas de *Cupriavidus* y *Paraburkholderia* [9,10]. Paralelamente, se han desarrollado vectores adecuados para el estudio de beta-rizobios, utilizados

para la construcción de mutantes dirigidas hacia genes de interés y para el estudio de la expresión génica mediante el empleo de genes reporteros [11,12]. Actualmente, el grupo emplea como modelos las cepas de *Cupriavidus necator* UYPR2512 [13] y la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A [6] empleando aproximaciones de transcriptómica, proteómica y metabolómica. Se ha determinado un importante número de genes y proteínas expresados diferencialmente por la cepa UYMMa02A cuando la misma es expuesta a la presencia de flavonoides inductores de la nodulación o cuando es cultivada en presencia de su planta hospedera, *Mimosa pudica*. De acuerdo a los resultados obtenidos se podría afirmar que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A adapta su metabolismo de nutrientes y transporte frente a las distintas condiciones ensayadas, modula diferentes proteínas relacionadas al estrés y la interacción, como consecuencia de la presencia de su hospedero; y además sería capaz de nodular plantas de *M. pudica* mediante un mecanismo independiente de la proteína NodD. Complementariamente se realizó la construcción de un mutante del gen *NodD*, obteniendo la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD, una cepa que contiene una delección en el gen que codifica para el regulador transcripcional *NodD* [14]. El presente trabajo se basa en la caracterización fenotípica tanto *in vivo* como *in vitro* de la cepa mutante antes mencionada.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Hipótesis.

El establecimiento de simbiosis entre *Cupriavidus* y sus plantas hospederas tiene particularidades, cuyo estudio nos ayudará a entender mejor los mecanismos implicados en las interacciones benéficas planta-microorganismo.

2.2. Objetivos.

2.2.1. Objetivo General.

Estudiar en profundidad la función del gen *NodD*, determinando su interrelación e importancia en el establecimiento de la asociación simbiótica con la planta hospedera.

2.2.2. Objetivos Específicos.

- 1- Caracterizar fenotípicamente la cepa mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD *in vivo* en el establecimiento de la simbiosis, evaluando la capacidad de nodulación, colonización radicular, competitividad y promoción de crecimiento.
- 2- Caracterizar fenotípicamente la cepa mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD *in vitro* evaluando la capacidad y velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Preparación del material vegetal.

En una primera etapa se realizó la escarificación de las semillas de *Mimosa pudica*, para acortar el tiempo de germinación, quitándole la capa externa. Luego se realizó un lavado con etanol 70% durante 2 minutos y un lavado con ácido sulfúrico concentrado (95-98%) durante 10 minutos. Al finalizar los 10 minutos, se realizaron seis lavados, de 1 minuto cada uno, con agua destilada. Para su posterior desinfección de la superficie, se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito al 4% durante 5 minutos, seguido de seis lavados, de 1 minuto cada uno, con agua destilada. Al finalizar, se colocaron las semillas en placas Petri con agar-H₂O (agar 0.8%) y se incubaron a 30°C por 24hs para su germinación.

3.2. Caracterización fenotípica de la mutante obtenida en el establecimiento de la simbiosis.

3.2.1. Cuantificación de la capacidad de colonización y adhesión radicular.

La capacidad de la cepa mutante de colonizar las raíces de *Mimosa pudica* fue comparada con la capacidad de la cepa salvaje.

Los ensayos se realizaron en condiciones controladas utilizando tubos con medio de cultivo para plantas Jensen semisólidos sin agregado de fuentes de carbono ni nitrógeno. En cada tubo se colocó una semilla y se dejó crecer la planta por un lapso de 8 días, luego cada planta se inoculó con 10⁴ ufc/raíz; con la cepa salvaje *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y con la cepa mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD, se inocularon 6 plantas por cada tiempo (8hs, 24hs y 72hs). Las plantas se mantuvieron con un fotoperiodo de 16hs luz/8hs oscuridad a 24°C en cámara de crecimiento de plantas. Luego de 8 hs, 24 hs y 72 hs de la inoculación se determinó la concentración bacteriana adherida a las raíces mediante recuento en placa. Para esto, las plantas fueron retiradas con cuidado del medio de cultivo, se lavaron las raíces para retirar las células no adheridas con agua destilada estéril y se colocaron en tubos con solución salina estéril. Los mismos se agitaron durante 10 minutos con vortex para despegar las células adheridas. Luego se realizó el recuento en placa mediante la siembra de diluciones seriadas en placas con medio sólido nutriente YMA (Yeast Manitol Agar).

3.2.2. Evaluación de velocidad de nodulación, número de nódulos por planta y promoción de crecimiento.

La cepa mutante construida fue evaluada en su capacidad de formar nódulos efectivos sobre la leguminosa hospedera *Mimosa púdica*, comparada con la capacidad de la cepa salvaje.

Los ensayos se realizaron en condiciones controladas utilizando tubos con medio de cultivo para plantas Jensen semisólidos sin agregado de fuentes de carbono ni nitrógeno. En cada tubo se colocó una semilla y se dejó crecer la planta por un lapso de 2 días, luego cada planta se inoculó con 10^7 ufc/raíz; con la cepa salvaje *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, se inocularon 20 plantas y con la cepa mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD, se inocularon 20 plantas. Las plantas se mantuvieron con un fotoperiodo de 16hs luz/8hs oscuridad a 24°C en cámara de crecimiento de plantas. La aparición de nódulos se analizó y se registró cada día. Los ensayos se mantuvieron durante 45 días, se contó el número de nódulos y para analizar la promoción de crecimiento se midió la altura de cada planta al finalizar el ensayo.

3.3. Caracterización fenotípica de la cepa mutante *in vitro*.

3.3.1. Evaluación de la capacidad y velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

La capacidad y velocidad de crecimiento de la cepa mutante fue comparada con la capacidad de la cepa salvaje.

Los ensayos se realizaron en condiciones controladas utilizando como medios de cultivo LB (Luria-Bertani), YMA (Yeast Manitol Agar) y en medio mínimo M9 citrato. Todas las cepas se cultivaron durante dos días en placas de medio LB, a partir de las colonias obtenidas se realizaron suspensiones en buffer fosfato salino (PBS) y la OD₆₀₀ se ajustó a 0,1. Luego de preparadas las suspensiones se colocaron 190 μ l del medio correspondiente en cada pocillo de placas de microtitulación de poliestireno y se agregaron 10 μ l de la suspensión bacteriana. Las placas fueron incubadas a 30°C con agitación y el crecimiento fue estimado mediante medidas periódicas de la OD₆₀₀ hasta llegar a la fase estacionaria en cada medio de cultivo evaluado. Las medidas fueron tomadas en espectrofotómetro (Thermo Scientific, Varioskan) cada 1 h. Se incluyeron blancos con el medio de cultivo sin inocular.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1. Caracterización fenotípica de la mutante obtenida en el establecimiento de la simbiosis.

4.1.1. Cuantificación de la capacidad de colonización y adhesión radicular.

Luego de las 8 hs, 24 hs, 72 hs se determinó la concentración bacteriana adherida a las raíces mediante recuento en placa en microgota, inoculando 20 μ l de las diluciones realizadas (Figura 4.1). En la Figura 4.2. se puede observar el estado de las plantas a las 8hs. Los resultados de los recuentos se muestran en la Tabla 4.1.

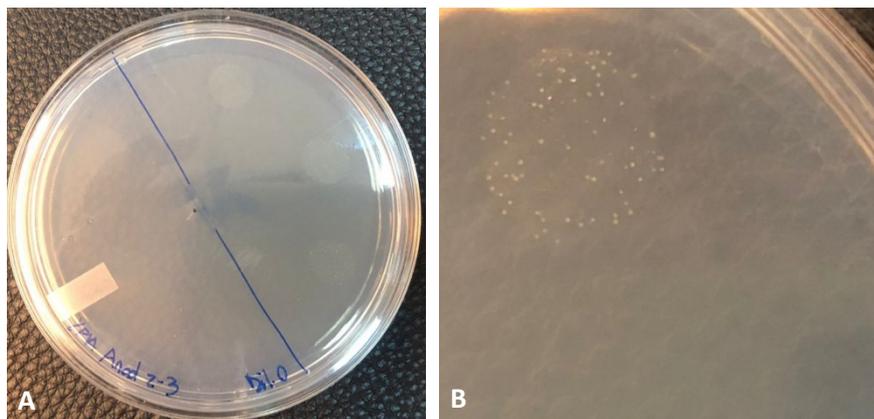


Figura 4.1. Las imágenes muestran como se ve un recuento en placa mediante microgota. La imagen B, es una ampliación de la imagen A.

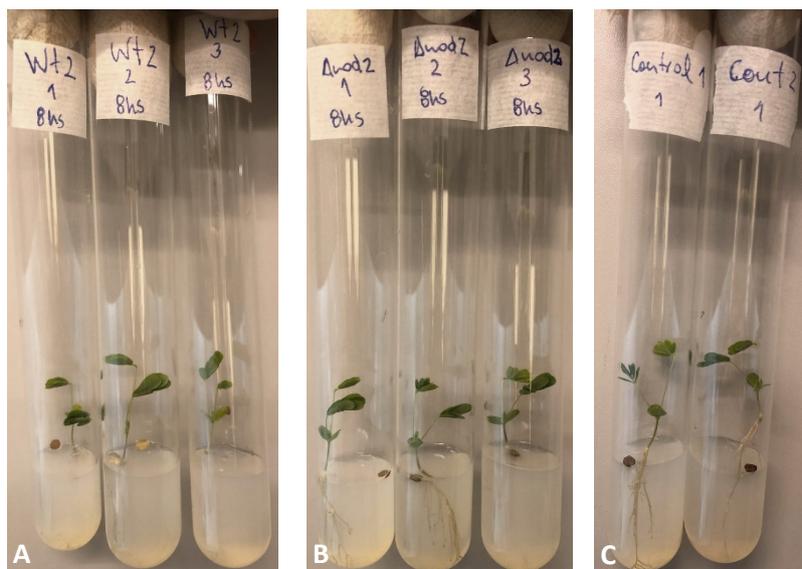


Figura 4.2. La imagen A, corresponde a las plantas inoculadas con la cepa salvaje, la imagen B a las plantas inoculadas con la mutante y la imagen C, a las plantas control sin inocular; correspondientes a las 8hs luego de la inoculación. El estado fisiológico de las plantas mostradas en las imágenes también fue representativo de las plantas correspondientes a las 24hs y 72hs.

Tabla 4.1. Recuento en placa a las 8hs, 24hs y 72hs.

	Wt	Δ nodD
8hs	7,6E+01	1,4E+02
24hs	1,1E+03	1,4E+03
72hs	1,8E+08	1,3E+08

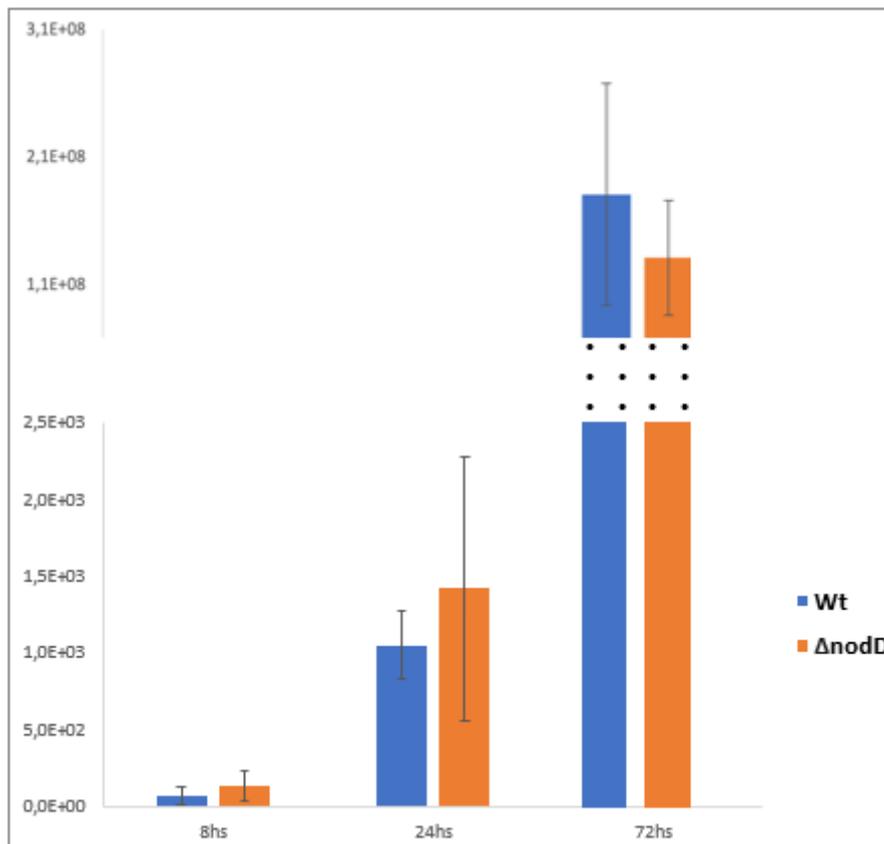


Figura 4.3. Gráfico correspondiente a los recuentos en placa de la cepa salvaje (Wt) y la mutante (Δ nodD) a las 8hs, 24hs y 72hs.

Se realizó un test estadístico para determinar si los resultados de los recuentos en placa de la cepa salvaje (Wt) y la mutante (Δ nodD) en cada tiempo tenían diferencias significativas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba T de Student con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico determinó que no había diferencias significativas entre los recuentos de las dos cepas en ninguno de los tiempos.

4.1.2. Evaluación de velocidad de nodulación, número de nódulos por planta y promoción de crecimiento.

Para evaluar la velocidad de nodulación de cada cepa se registró la aparición de nódulos durante 41 días. Luego de finalizados los ensayos se midió el largo de las plantas para analizar la promoción de crecimiento. Observando los resultados de la nodulación, se determinó que no hay diferencias significativas entre la cepa salvaje y la cepa mutante, tanto para la cantidad de nódulos, como para su velocidad de nodulación. Cuando se evaluó la promoción de crecimiento, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las cepas.

En la Figura 4.4, se puede observar el estado de las plantas y los nódulos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2. y la Figura 4.5. Mientras que los resultados de la promoción de crecimiento se muestran en la Tabla 4.3. y Figura 4.6.



Figura 4.4. La imagen A corresponde a una planta sin inocular, la imagen B corresponde a una planta inoculada con la cepa salvaje y la imagen C corresponde a una planta inoculada con la mutante. En la imagen D y E se muestran los nódulos, la imagen D corresponde a una planta inoculada con la cepa salvaje y la imagen E corresponde a una planta inoculada con la mutante.

Tabla 4.2. Evaluación del número de nódulos por planta.

	22DPI		25DPI		29DPI		32DPI		36DPI		41DPI	
	WT	Δ nodD										
Promedio del número de nódulos por planta	1,16	0,90	2,21	1,65	2,74	2,45	3,84	3,20	4,37	4,10	7,00	7,20

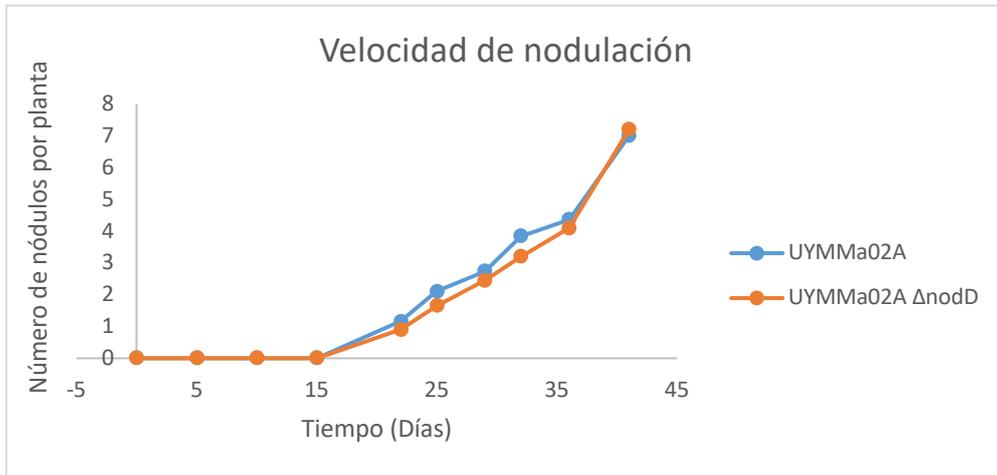


Figura 4.5. Gráfico correspondiente a la velocidad de nodulación de la cepa salvaje UYMMa02A y la mutante UYMMa02A Δ nodD.

Se realizó un test estadístico para determinar si la velocidad de nodulación de la cepa salvaje y la mutante tenían diferencias significativas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba T de Student con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$) comparando el área bajo la curva para las dos cepas. El análisis estadístico determinó que no había diferencias significativas entre las áreas bajo la curva de las dos cepas.

Tabla 4.3. Evaluación de la promoción de crecimiento.

Promedio del largo de las plantas (cm)		
Wt	Δ nodD	Control
8,52	8,47	6,11

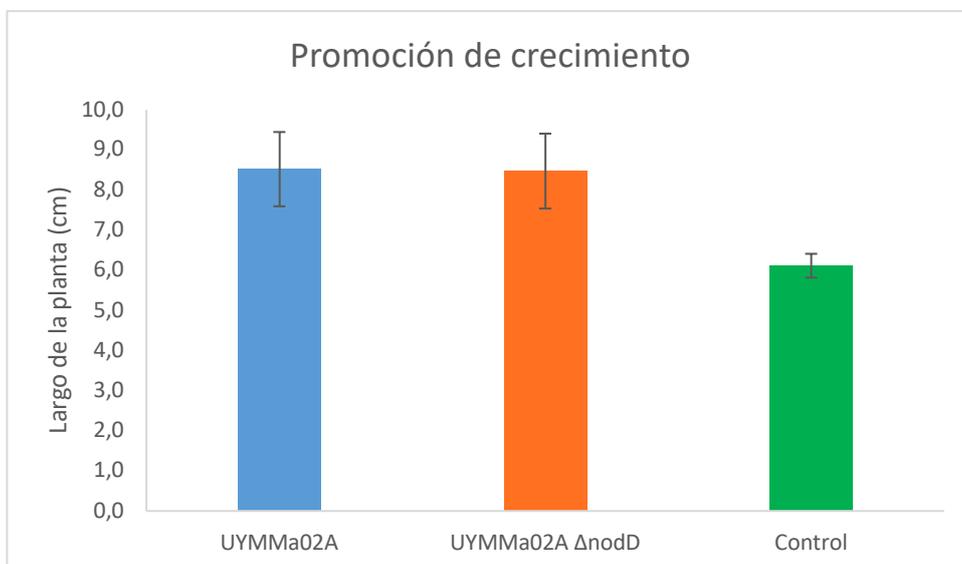


Figura 4.6. Gráfico correspondiente a la promoción de crecimiento de la cepa salvaje UYMMa02A, la cepa mutante UYMMa02A Δ nodD y planta control sin inocular.

Se realizó un test estadístico para determinar si los resultados de la promoción de crecimiento de la cepa salvaje y la mutante tenían diferencias significativas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba T de Student con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico determinó que no había diferencias significativas en la promoción de crecimiento de las dos cepas. Por otro lado, si hubo diferencias significativas entre la cepa salvaje y el control sin inocular, y entre la cepa mutante y el control sin inocular.

4.2. Caracterización fenotípica de la cepa mutante *in vitro*.

4.2.1. Evaluación de la capacidad y velocidad de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

Para determinar la capacidad y velocidad de crecimiento de la cepa salvaje y la mutante se estimó el crecimiento mediante medidas periódicas de la OD₆₀₀ hasta llegar a la fase estacionaria en cada medio de cultivo evaluado (LB, YMA y M9 citrato). Las curvas de crecimiento se muestran en la Figura 4.7.

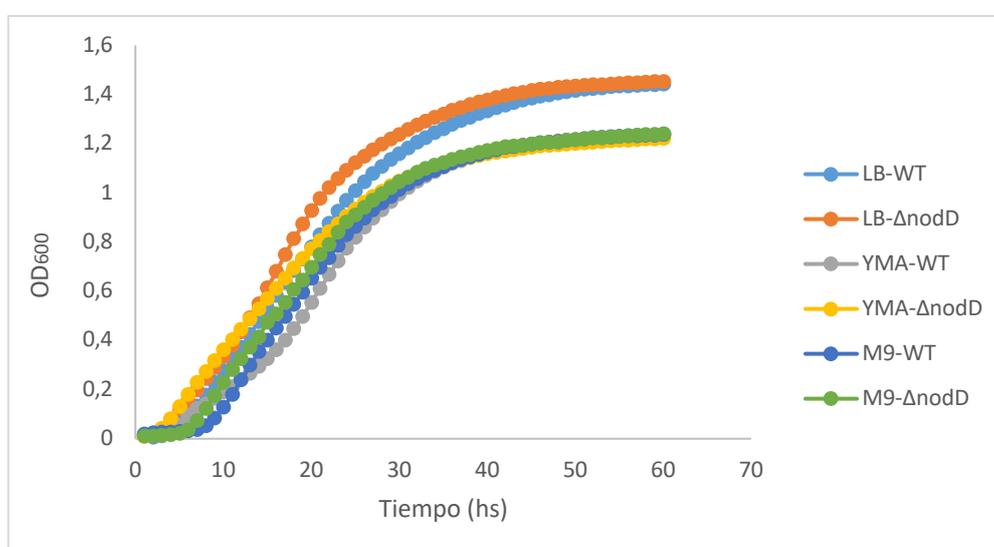


Figura 4.7. Gráfico correspondiente a la curva de crecimiento en diferentes medios de cultivo (LB, YMA y M9 citrato) de la cepa salvaje (Wt) y la mutante (Δ nodD).

Se realizó un test estadístico para determinar si el crecimiento de la cepa salvaje (Wt) y la mutante (Δ nodD) tenían diferencias significativas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba T de Student con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$) comparando el área bajo la curva para las dos cepas en cada medio de cultivo. El análisis estadístico determinó que no había diferencias significativas entre las áreas bajo la curva de las dos cepas en ninguno de los medios de cultivo evaluados.

5. CONCLUSIONES.

Habiendo finalizado el trabajo de pasantía de investigación en el área microbiología, se logró realizar en el tiempo propuesto, todos los ensayos que se tenían como objetivo en dicha pasantía de trabajo.

En este trabajo se determinó que la mutante nula para el gen *nodD* no tiene diferencias significativas con la cepa salvaje en el establecimiento de la simbiosis, tanto en la colonización radicular, como en la capacidad de nodulación y en la promoción de crecimiento. Además, no se encontraron diferencias significativas a nivel de la capacidad y velocidad de crecimiento en los medios de cultivo evaluados en esta pasantía.

6. APÉNDICES.

6.1. Medios de cultivos sólidos.

- **Medio Jensen.**

CaHPO ₄	1g
K ₂ HPO ₄ 10%	2ml
MgSO ₄ 1M	0.84ml
NaCl 10g/L	20ml
FeCl ₃ 6H ₂ O 1%	16.6ml
Solución de micronutrientes (*)	1ml
Agar	8g
Agua destilada	1000ml

Preparación: Se realizan primero las tomas en peso de CaHPO₄ y agar, y luego las tomas en volumen del resto de los componentes. Por último se agrega el correspondiente volumen en agua destilada. Se homogeniza bien y se ajusta el pH del medio entre 6.8 y 7.0. Se disuelve el polvo de agar, calentando la solución en el microondas hasta que el agar esté completamente disuelto y se reparte el medio en los tubos correspondientes (15ml por tubo). Luego se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

(*) Composición de solución de micronutrientes: solución H₃BO₃ 5% (57ml), solución MnSO₄H₂O 10% (20ml), solución ZnSO₄7H₂O 10% (2.2ml), solución CuSO₅H₂O 10% (0.8ml), solución Na₂MoO₄ 0.1% (140ml) y agua destilada 1000ml.

- **Medio LB (Luria-Bertani).**

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de sodio (NaCl)	10g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

Preparación: Se realizan las tomas en peso de triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y agar, y se agrega el correspondiente volumen en agua destilada. Se homogeniza bien y se ajusta el pH del medio a 7.5. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C y se reparte en placas Petri de a 20ml aproximadamente. Luego de solidificado el medio, las placas se secan a temperatura ambiente y se conserva a 4°C hasta su uso.

- **Medio YMA (Yeast Manitol Agar).**

Manitol	10g
K ₂ HPO ₄ 10%	5ml
MgSO ₄ 7H ₂ O 20g/L	10ml
NaCl 10g/L	10ml
Extracto de levadura	0.25g
Agar	15g
Glutamato 10%	10ml
Agua destilada	1000ml

Preparación: Se realizan primero las tomas en peso del manitol, extracto de levadura y agar, y luego las tomas en volumen del resto de los componentes, excepto el glutamato. Por último se agrega el correspondiente volumen en agua destilada. Se homogeniza bien y se ajusta el pH del medio a 6.8. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C y previo a repartir el medio en placas Petri, se le adiciona el glutamato. Luego de solidificado el medio, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

6.2. Medios de cultivos líquidos.

- **Medio LB (Luria-Bertani).**

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Agua destilada	1000ml

Preparación: Se realizan las tomas en peso y por último se agrega el correspondiente volumen en agua destilada. Se homogeniza bien y se ajusta el pH del medio a 7.5. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

- **Medio YMA (Yeast Manitol Agar).**

Manitol	10g
K ₂ HPO ₄ 10%	5ml
MgSO ₄ 7H ₂ O 20g/L	10ml
NaCl 10g/L	10ml
Extracto de levadura	0.25g
Glutamato 10%	10ml
Agua destilada	1000ml

Preparación: Se realizan primero las tomas en peso del manitol y extracto de levadura, y luego las tomas en volumen del resto de los componentes, excepto el glutamato. Por último se agrega el correspondiente volumen en agua destilada. Se homogeniza bien y se ajusta el pH del medio a 6.8. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C y luego se le adiciona el glutamato.

- **Medio M9 citrato.**

Sales M9 5x (*)	200ml
MgSO ₄ 1M	2ml
CaCl ₂ 1M	0.1ml
Citrato	20ml
Agua destilada	800ml

Preparación: Se realiza la preparación de la solución de sales M9 5X, MgSO₄, CaCl₂ y citrato por separado, y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

(*) Composición de solución de sales M9 5X: Na₂HPO₄ (34g), KH₂PO₄ (15g), NaCl (2.5g), NH₄Cl (5g) y agua destilada 1000ml.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Lewis G., Schrire B., Mackinder B. y Lock M. 2005. Legumes of the world. The Royal Botanic Gardens, Kew. Reino Unido.
2. Primavera Izaguirre y Rosario Beyhaut. 1998. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Edición: Hemisferio Sur. Uruguay.
3. Bignell, David E; Huising, E. Jeroen; Moreira, Fátima M.S. 2012. Manual de biología de suelos tropicales. México.
4. José de J. López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso, Diego R. González-Eguiarte, Ramón Rodríguez-Macias, Eduardo López-Alcocer y Víctor Olalde-Portugal. 2017. Morphological and biochemical characterization of rhizobium strains collected from wild and domesticated common bean. Artículo científico Rev. Fitotec. Mex. Vol. 40 (1): 73 – 81. México.
5. Joaquín Azcón-Bieto, Manuel Talón. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal, 2da ed.. Madrid, España.
6. Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger Hardcover. 2002. Plant Physiology, 3ra ed.. Estados Unidos.
7. Sprent JI. 2001. Nodulation in legumes. London, Royal Botanic Gardens, Kew. Reino Unido.
8. Platero, R., James, E. K., Rios, C., Iriarte, A., Sandes, L., Zabaleta, M., Battistoni, F., Fabiano, E. (2016). Novel Cupriavidus strains isolated from root nodules of native Uruguayan Mimosa species. Applied and environmental microbiology, 82(11), 3150-3164.
9. Iriarte, A., Platero, R., Romero, V., Fabiano, E., Sotelo-Silveira, J. R. (2016). Draft genome sequence of Cupriavidus UYMMa02A, a novel beta-rhizobium species. Genome announcements, 4(6).
10. Langleib M., Beracochea M., Zabaleta M., Battistoni F., Sotelo-Silveira J., Fabiano E., Iriarte, A., Platero P. Draft genome sequence of Paraburkholderia sp. UYCP14C, a rhizobium strain isolated from root nodules of Calliandra parvifolia (MRA00173-19R2). Microbiology Resource Announcements, 8(16), e00173-19.
11. Taulé, H. Luizzi, M. Beracochea, C. Mareque, R. Platero, F. Battistoni, Ann. Microbiol. (2019). The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte Kosakonia sp. UYSO10 are necessary for growth promotion of sugarcane. Annals of Microbiology, 69, 741–750.
12. Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de Las Heras, A., Páez-Espino, D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nickel, P., Platero., R., de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. Nucleic acids research, 41(D1), D666-D675.
13. Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. Plant and Soil, 356(1), 35-49.

14. Sandes Bufano, Laura. 2020. Bases moleculares de la interacción *Cupriavidus – Mimosa*: una aproximación proteómica. Tesis, Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. Facultad de ciencias. Uruguay.