

UCH-FC  
Biotecnología  
D 229  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

**Papel de las rutas catabólicas de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134  
en el catabolismo de exudados de raíces y en la colonización de  
*Arabidopsis thaliana***

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Paola Andrea Dasencich Yubano**

Diciembre-2012  
Santiago-Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Bernardo González Ojeda  
Patrocinante: Dr. Francisco Chávez



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Paola Andrea Dasencich Yubano**,

### **“Papel de las rutas catabólicas de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 en el catabolismo de exudados de raíces y en la colonización de *Arabidopsis thaliana*”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

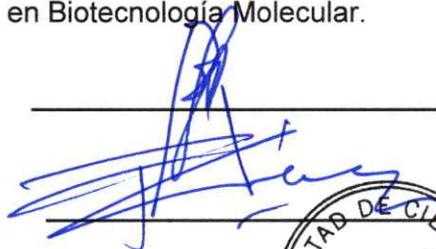
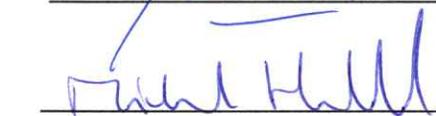
*Dr. Bernardo González Ojeda*  
**Director Seminario de Título**

*Dr. Francisco Chávez Espinosa*  
**Profesor patrocinante**

**Comisión de Evaluación:**

*Dra. Margarita Carú*  
**Presidente Comisión**

*Dr. Michael Handford*  
**Evaluador**


Santiago de Chile, Diciembre de 2012



Nació en la “República Independiente de Magallanes”, donde sus primeros años los vivió en Isla Grande de Tierra del Fuego. Posteriormente se trasladó a Punta Arenas donde realizó sus estudios primarios y secundarios en The British School, entre los años 1990 y 2002. Ingresó al programa académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, el cual completó durante los años 2003 y 2004. Durante el año 2005 fue transferida a la Facultad de Ciencias de dicha casa de estudios, a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, de la cual egresó el año 2010. A partir del año 2008, ya sentía amplio interés en la microbiología, biotecnología ambiental, así como también por la físicoquímica. Realizó su unidad de investigación “Caracterización de consorcios microbianos de bacterias reductoras de sulfato (BRS)”, en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la tutoría del Dr. Davor Cotorás Tadic. Luego se trasladó al laboratorio de Bioingeniería perteneciente a la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Adolfo Ibañez, donde realizó su seminario de título “Papel de las rutas catabólicas de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 en el catabolismo de exudados de raíces y en la colonización de *Arabidopsis thaliana*” bajo la dirección del Dr. Bernardo González. Dicho trabajo ha permitido su participación en congresos tanto nacionales como internacionales y ser uno de los co-autores de una publicación.

En el ámbito personal, se define como magallánica fundamentalista, amante de la música y el cine independiente.



"A vial of hope and a vial of pain,  
In the light they both look the same"

*Arcade Fire, 2007*

## AGRADECIMIENTOS

A mi "Alma mater", la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile por el conocimiento entregado y por las personas que me permitió conocer. A mis compañeras y amigas: Camila Mardones y Rafaela Arancibia, por todo su cariño y apoyo. A "Friedemann Brock", Jocelyn, Chicha, Cami, Gabriela, Vale, Nacho, Jorge, Andy, Leo, Cesar, Felipe, Mauro, Marios, Bryan, Natty, Nicole, Daniel, Ismael, Pamela. En especial para Agustín y Miguel.

Al Dr. Bernardo González por haberme acogido en su laboratorio permitiendo el desarrollo de este seminario de título, gracias por la paciencia, el apoyo y la dedicación. A todo el "BG Lab", con especial cariño para Thomas mi "tutor", Ana, Belén, Tania, Consuelo y mi "partner" Raúl. Gracias por haberme acogido en el laboratorio, por esas tarde alegremente hipercalóricas y llenas de canciones.

A mis amigos y compañeros de toda la vida: Felipe, Kevin, Julito, Ricardo, Rodrigo, Rosario, Caro, Carla, Claudia, Andreas, Bárbara y Jose L, por hacer de la estadía en la "capital" mucho más agradable, por la amistad y el cariño entregado durante tantos años.

A Gonzalo, mi compañero de la vida, gracias por el amor incondicional, los consejos y sobre todo por la paciencia. Gracias a tu familia por recibirme con los brazos abiertos y por todo el cariño entregado.

Lo último y más importante: a mi familia, gracias por el amor y apoyo incondicional en todos estos años. Por la motivación y fe que muchas veces hizo falta. Infinitamente agradecida de todo lo que me han entregado.

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado gracias a los proyectos FONDECYT N° 1110850 y Núcleo Milenio en Genómica Funcional de Plantas (NM-GFP) P06/009-F.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ANTECEDENTES GENERALES .....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Reactivos. ....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Material biológico. ....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos. ....	15
1.2.2 Semillas de <i>A. thaliana</i> .....	15
1.3.1 Medios líquidos.....	15
1.3.2 Medios sólidos .....	16
<b>2.1. Cultivo de microorganismos.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Mantención de microorganismos .....	18
2.1.2 Cultivos en medios líquidos .....	18
2.1.3 Curvas de crecimiento en fuentes de carbono conocidas .....	18
2.1.4 Crecimiento de cepas de <i>C. pinatubonensis</i> en exudados.....	19
<b>2.2. Métodos analíticos .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Espectrofotometría ultravioleta/visible.....	19
<b>2.3. Purificación de DNA .....</b>	<b>20</b>
2.3.1 Purificación de DNA genómico.....	20
2.3.2 Purificación de plásmidos .....	20
2.3.3 Purificación de fragmentos de DNA de productos de PCR.....	21
<b>2.4. Amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 21</b>	
2.4.1 Mezcla de reacción.....	21
2.4.2 Partidores .....	22
2.4.3 Programas de PCR.....	22
<b>2.5. Clonamiento de DNA .....</b>	<b>23</b>
2.5.1 Construcción de vectores.....	23
2.5.2 Preparación de células electrocompetentes y transformación por electroporación. ....	24
<b>2.6. Inactivación de genes en <i>C. pinatubonensis</i> JMP134.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7. Secuenciación y análisis de secuencias.....</b>	<b>28</b>
2.7.1 Secuenciación .....	28
2.7.2 Análisis de las secuencias de DNA.....	28
2.8. Cultivo de <i>A. thaliana</i> . ....	28
2.8.1 Tratamiento de semillas .....	28
2.8.2 Obtención de exudados .....	29
2.8.3 Colonización de <i>A. thaliana</i> .....	29
2.8.4 Colonización del rizoplaneo. ....	30
<b>2.9 Determinación de parámetros de crecimiento en <i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>31</b>
2.9.1. Determinación de largo de raíz y peso fresco .....	31
2.9.2. Determinación de contenido de clorofila .....	31
<b>2.10. Análisis estadísticos .....</b>	<b>32</b>

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
1.- Inactivación de los genes <i>pcaH</i> de la ruta del $\beta$ -cetoadipato y <i>hybB</i> de la ruta del gentisato, para evaluar la capacidad de <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 para crecer en exudados provenientes de <i>A. thaliana</i> .....	34
2.-Evaluar la capacidad de las mutantes y de una variante genómica de la cepa JMP134 para colonizar la rizósfera de <i>A. thaliana</i> "......	44
3.- Efectos de la colonización de JMP134 y sus cepas mutantes en el crecimiento de <i>A. thaliana</i> .....	46
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>PROYECCIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>58</b>
<b>PARTICIPACIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>CONGRESOS</b> .....	<b>62</b>
<b>PUBLICACIONES</b> .....	<b>62</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema muestra la variedad de compuestos aromáticos que pueden ingresar al metabolismo central en el orden de las <i>Burkholderiales</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Rutas catabólicas del $\beta$ -cetoadipato y el gentisato en <i>C. pinatubonensis</i> JMP134. ....	10
<b>Figura 3.</b> Propuesta .....	12
<b>Figura 4.</b> Estrategia de inactivación de genes cromosomales en <i>C. pinatubonensis</i> . .	27
<b>Figura 5.</b> Esquema del diseño experimental de los experimentos realizados con <i>A. thaliana</i> y <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y sus cepas derivadas. ....	33
<b>Figura 6.</b> Comprobación mediante amplificación por PCR de la obtención de la cepa mutante hybB. ....	37
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de las cepas mutantes en fructosa 10 mM.....	39
<b>Figura 8.</b> Crecimiento en 2-HB y 4-HB. (a) Crecimiento cepas JMP134 y JMP134 $\Delta$ hybB en 2-HB. (b) Crecimiento cepas JMP134 y JMP134 $\Delta$ pcaH en 4-HB. ....	40
<b>Figura 9.</b> Curvas de rendimiento (producción de biomasa) de <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y sus mutantes catabólicas en diferentes diluciones de exudados de <i>A. thaliana</i> , a las 24 h (a) o 48 h (b) de cultivo. ....	43
<b>Figura 10.</b> Colonización rizosférica <i>A. thaliana</i> por <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y cepas derivadas. ....	45
<b>Figura 11.</b> Efecto en el peso fresco, longitud de las raíces y contenido de clorofila en plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y sus derivadas. ....	48
<b>Figura 12.</b> Resumen de los resultados de este trabajo sobre la interacción entre <i>A. thaliana</i> y <i>C. pinatubonensis</i> JMP134. ....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en esta memoria.....	17
<b>Tabla 2.</b> Partidores utilizados en este Seminario de Título.....	25

## ABREVIATURAS

2,4-D	2,4-diclorofenoxiacetato
2-HB	2-hidroxibenzoato
3-HB	3-hidroxibenzoato
4-HB	4-hidroxibenzoato
Bz	benzoato
DNA	ácido desoxirribonucleico
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
MS	Murashige & Skoog
Nal	ácido nalidíxico
OD <sub>600nm</sub>	densidad óptica medida a 600 nm
pb	pares de bases
PCA	protocatecuato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RCC	represión catabólica por carbono
rpm	revoluciones por minuto
Sm	Estreptomicina
Tris	tris(hidroximetil)amino-metano
UV/Vis	ultravioleta/visible
UFC/ml	unidades formadoras de colonia / mililitro
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosidasa

## RESUMEN

Las plantas pueden ser densamente colonizadas por bacterias de suelo. Algunas bacterias son capaces de utilizar como fuente de carbono y energía compuestos aromáticos presentes en los exudados de plantas. Dentro de éstas, se destaca *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, la cual cuenta con 11 de las 12 rutas de degradación de compuestos aromáticos descritas hasta ahora en Proteobacterias, por ello, siendo capaz de degradar diversos compuestos fenólicos tales como cinamato, salicilato o benzoato. Estos compuestos son canalizados desde rutas periféricas a las rutas principales de degradación, en este caso a la ruta del  $\beta$ -cetoadipato. Algo similar ocurre con la ruta del gentisato, la cual permite a la bacteria utilizar tanto 2-hidroxibenzoato (salicilato) como 3-hidroxibenzoato como fuente de carbono y energía. En ambos casos, los productos finales de las rutas de degradación son capaces de ingresar al ciclo de Krebs, por lo que se ha propuesto que dichas rutas catabólicas podrían ser relevantes en la colonización de plantas.

Este Seminario de Título se centra en estudiar el papel de las funciones catabólicas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos en la interacción planta-bacteria, utilizando *Arabidopsis thaliana* – *C. pinatubonensis* JMP134 como sistema modelo. Se estudió la colonización rizosférica, el crecimiento de la bacteria en exudados de raíz, como única fuente de carbono y energía; así como los posibles efectos en el crecimiento de *A. thaliana*. Estos parámetros se analizaron en cepas mutantes de las rutas catabólicas del  $\beta$ -cetoadipato y gentisato, y en la variante genómica JMP222, carente de un megaplásmido y el plásmido catabólico pJP4.

Se observó que la cepa JMP134-BCA presentó una menor capacidad de colonización, así como un menor crecimiento en los exudados de raíz de *A. thaliana*,

en comparación con la cepa silvestre. En cuanto a efectos en la planta, se observaron diferencias significativas para las cepas JMP134, JMP134 $\Delta$ hybB, JMP134-BCA y JMP222 en los diferentes parámetros medidos, en comparación a aquellas plantas que no estuvieron en contacto con inóculo bacteriano. Estos resultados indican que funciones del catabolismo de compuestos aromáticos son importantes para la colonización eficiente de *A. thaliana*, incluyendo el uso de componentes de sus exudados de raíz y que esto puede afectar ciertos estados fisiológicos de la planta.

## ABSTRACT

Soil bacteria densely colonize the rhizosphere of terrestrial plants. As some bacteria can efficiently use aromatic compounds as carbon sources, aromatic compounds contained in root exudates may influence rhizospheric colonization. Among bacteria, it is noticeably *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (pJP4), which has 11 of the 12 main degradation pathways described in proteobacteria, thus degrading a wide variety of phenolic compounds, such as cinnamic, salicylic, or protocatechuic acids. These compounds are channeled from peripheral pathways to the main pathways, in this case the  $\beta$ -keto adipate pathway. A similar situation happens with the gentisate pathway, which allows use of 2-hydroxybenzoate (salicylate) and 3-hydroxybenzoate as carbon and energy sources. In both cases, the final products reach the Krebs's cycle, which has led to the proposal that these catabolic abilities play a significant role in plant colonization and survival in rhizosphere.

This work is focussed in the study of the role of bacterial aromatic catabolism functions in plant – bacteria interactions, using *Arabidopsis thaliana* - *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 as model system. Root colonization; bacterial growth on root exudates, and possible effects on growth of *A. thaliana*, were studied. These parameters were assayed for  $\beta$ -keto adipate and gentisate pathway mutant strain derivatives of *C. pinatubonensis* JMP134, and the megaplasmid free derivative JMP222. A triple  $\beta$ -keto adipate catabolism mutant JMP134-BCA strain showed a reduced root colonization ability compared with the wild type. Accordingly, lower proliferation was observed for these mutant strains when growing on *A. thaliana* root exudates. JMP134, JMP134 $\Delta$ hybB, JMP134-BCA and JMP222 strains showed also

different effects on some *A. thaliana* growth parameters with respect to the wild type strain. These results indicate that catabolic functions of the  $\beta$ -ketoadipate and gentisate pathways play a role in efficient colonization of *A. thaliana*, including use of plant root exudates components, and cause some physiological effects in plants.

# INTRODUCCION

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

En 1904, Lorenz Hiltner planteó por primera vez el concepto de rizósfera, haciendo referencia al compartimiento o área de suelo que se encuentra directamente influenciado por la presencia de las raíces de una planta. Propuso que estas interacciones no ocurrían exclusivamente entre el suelo y las raíces de las plantas, si no que los exudados de las raíces de las diferentes plantas sustentaban el desarrollo de diferentes comunidades bacterianas, así como la interacción entre distintas especies de planta y la interacción entre diferentes especies de microorganismos. Todo esto a través de moléculas señalizadoras que forman parte de rutas complejas (Hiltner, 1904; Hartmann y cols, 2008).

La rizósfera puede ser descrita como el área radial y longitudinal que rodea a las raíces de las plantas, en la cual son absorbidos los nutrientes y el agua por parte de la planta, y además ocurre la secreción de exudados y el consiguiente crecimiento microbiano (Uren, 2000). Es decir, ocurren una serie de procesos biológicos y ecológicos complejos. En los cuales, los microorganismos en particular, son capaces de utilizar los compuestos provenientes de los exudados de las raíces de las plantas como sustratos de crecimiento, aumentando considerablemente la biomasa microbiana y actividad alrededor de las raíces, lo que se conoce como efecto rizosférico. Esto se debe a que los microorganismos del suelo generalmente deben competir por nutrientes y fuentes de carbono y energía, cuya disponibilidad en el suelo se encuentra limitada, debido a la escasez y amplia distribución de éstos. Por ende la actividad microbiana en el suelo es altamente influenciada por los exudados de las raíces (Bais y cols, 2006).

Este alto grado de influencia por parte de las raíces de las plantas sobre la población de organismos que las rodean, se debe a la rizodeposición de metabolitos que contienen carbono desde las raíces al suelo. Se estima que alrededor del 40 % del carbono que es fijado a través del proceso de fotosíntesis, es secretado en la rizósfera, como metabolitos primarios o secundarios, durante las primeras etapas del desarrollo de la planta (Bertin y cols, 2003; Bais y cols, 2006).

Generalmente, los componentes de los exudados se dividen en dos tipos de compuestos, en base a su peso molecular. Por un lado, los compuestos de bajo peso molecular que incluyen iones, agua, oxígeno libre, azúcares simples (tales como arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa, manosa y oligosacáridos), aminoácidos (arginina, asparagina, aspártico, cisteína, cistina, glutamina), ácidos orgánicos (ácidos acético, ascórbico, benzoico, ferúlico y málico), compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios que aportan diversidad a los exudados. Algunos de estos compuestos, en especial los fenólicos, influyen en el crecimiento y desarrollo de plantas y microorganismos circundantes. Por su parte, los compuestos de alto peso molecular, tales como: mucílago (polisacárido), flavonoides, enzimas y otras proteínas, ácidos grasos, taninos, carbohidratos, esteroides, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos, y algunas vitaminas (Uren, 2000; Bertin y cols, 2003), son menos diversos, pero constituyen un porcentaje importante de los exudados de raíces en base a su masa (Bais y cols, 2006). La presencia de estos compuestos en menor o mayor medida en los exudados va a depender directamente de la especie, el tipo de cultivo, estados de desarrollo y sustratos de crecimiento de la planta, así como de factores de stress (Uren, 2000). Al exudar estos compuestos, la planta sería capaz de determinar la población de microorganismos que se encuentra en su rizosfera y por ende

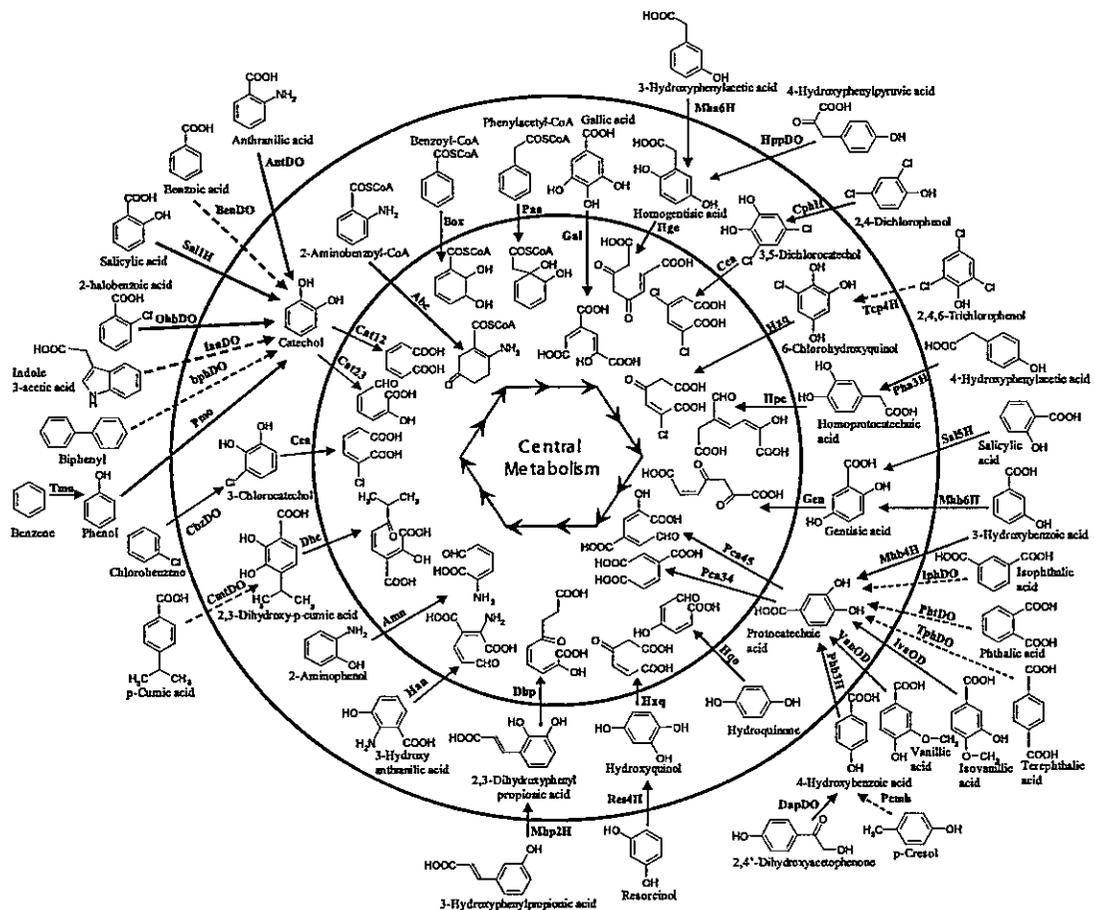
obtendría las condiciones más favorables para la planta (Bais y cols, 2004; Broeckling y cols, 2008; Houlden y cols, 2008).

A partir del reconocimiento de los microorganismos por parte de la planta, se pueden establecer básicamente tres tipos de interacción: simbiótica, patogénica y asociativa (Pülher y cols., 2004). La primera se caracteriza por la formación de nódulos en las raíces de las plantas, los cuales son colonizados por microsimbiontes. Como resultado, éstos son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y entregarlo como sustrato a la planta. La interacción más común de este tipo es la de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, ambos pertenecientes al orden *Rhizobiales*, con plantas leguminosas, siendo un conocido ejemplo la interacción entre *Bradyrhizobium japonicum* y el poroto de soya (*Glycine max*) (Sköt y Egsgaard, 1984; Poole y cols, 1994).

En cuanto a las interacciones con microorganismos patógenos, éstas suelen ser más diversas. Las especies de bacterias patógenas han desarrollado métodos específicos de ataque a las células vegetales y son capaces de utilizar las sustancias producidas por la planta para su crecimiento. Se han descrito fitopatógenos en géneros como: *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Xylella*, entre muchos otros (Govan y cols, 1996; Coenye y Vandamme, 2003; Pülher y cols, 2004; Mahenthiralingam y cols, 2008). Estas bacterias cuentan con genes putativos relacionados con el control de las interacciones patógeno-planta. La expresión de estos genes estaría relacionada con mecanismos de adherencia, producción de fitotoxinas, resistencia a stress oxidativo, degradación de la pared celular vegetal y de hormonas producidas por la planta, así como la producción e inyección de efectores que interfieren con el mecanismo de defensa de la planta, funciones que abarcarían alrededor de un 6% del genoma de este tipo de bacterias (Pülher y cols, 2004).

Dentro de las bacterias asociativas, se destacan las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), las cuales se caracterizan por su habilidad para colonizar las raíces de las plantas sin causar enfermedad y a la vez otorgando un beneficio a la planta. Estos beneficios podrían ser la producción de estimuladores de crecimiento o un efecto protector al suprimir posibles patógenos. Dentro de estas bacterias se pueden destacar *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 y SBW25, las cuales son capaces de promover el crecimiento de las plantas. Otro ejemplo es el de *Burkholderia phytofirmans* PsJN, la que es capaz de colonizar y promover el crecimiento en las raíces de *Allium cepa* (cebolla) (Sessitsch y cols., 2005) y así como generar efectos protectores en *Vitis vinifera* (uva del vino), en cultivos sometidos a bajas temperaturas (Fernández y cols., 2012), mediante la modulación del metabolismo de carbohidratos.

Salvo algunas cepas del género *Bacillus* (ver como ejemplo, Francis y cols, 2010), la gran mayoría de las PGPR son Gram-negativas, y una fracción significativa pertenece al orden *Burkholderiales*, tales como *B. phytofirmans* PsJN. *Burkholderiales* es el segundo orden de proteobacterias más representado después de *Enterobacteriales* en la base de datos de genomas. Análisis genómicos han demostrado que este orden tiene amplios potenciales catabólicos (Pérez-Pantoja y cols, 2012), codificando la mayoría de las rutas centrales de ruptura del anillo aromático así como rutas catabólicas periféricas, a través de las cuales se permite la entrada de más de 100 compuestos aromáticos a las rutas de degradación centrales (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema muestra la variedad de compuestos aromáticos que pueden ingresar al metabolismo central en el orden de las *Burkholderiales*. Se observan las rutas periféricas, los intermediarios generados y las distintas rupturas del anillo aromático antes de ingresar al metabolismo central (Pérez-Pantoja y cols, 2012).

Así, estas rutas periféricas son capaces de transformar una amplia gama de compuestos aromáticos en un grupo más reducido de intermediarios que ingresan a la ruta de ruptura del anillo aromático y posteriormente al ciclo de Krebs (Pérez-Pantoja y cols, 2012). Generalmente estas reacciones periféricas consisten en la activación del anillo aromático mediante oxigenasas y/o ligasas CoA, generando intermediarios di o trihidroxilados y/o intermediarios CoA, desaromatizados (Pérez-Pantoja y cols, 2010a). En total, el grupo de oxigenasas implicadas en la activación y ruptura del anillo aromático es amplio y filogenéticamente diverso, incluyendo varias familias diferentes que han sido recientemente recopilados y analizados en estudios filogenéticos (Pérez-Pantoja y cols, 2010b). En relación a la cantidad de oxigenasas presentes en el genoma y el tamaño de éste en *Burkholderiales*, se ha establecido que la cantidad de genes que codifican para oxigenasas aumenta con el tamaño del genoma, pero que el contenido relativo de enzimas permanece fijo, lo cual sugiere que el catabolismo de compuestos aromáticos tiene mayor relevancia en el metabolismo en *Burkholderiales*, a medida que sus genomas aumentan (Pérez-Pantoja y cols., 2012).

Lo anterior se hace más interesante, cuando se tiene en cuenta que *Burkholderiales* no solo comprende a la familia de las *Burkholderiaceae*, sino también a *Oxalobacteraceae*, *Alcaligenaceae* y *Comamonadaceae*, las cuales incluyen aerobios estrictos y anaerobios facultativos, así como quimiorganótrofos tanto estrictos como facultativos, organismos fijadores de nitrógeno, inclusive microorganismos patógenos en animales, humanos y plantas (Garrity y cols, 2005). Por lo tanto, constituye un linaje diverso en términos fenotípicos, metabólicos y ecológicos (Pérez-Pantoja y cols, 2012). Dentro de la familia *Burkholderiaceae* se han descrito miembros capaces de asociarse a plantas, pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Cupriavidus*. En *Burkholderia* hay tanto especies patógenas como promotoras de crecimiento vegetal,

tales como *B. gladioli* que produce lesiones tanto en hojas como en el tallo de diversas plantas (Maeda y cols, 2006), así como la ya mencionada *B. phytofirmans* y *B. phymatum*, la cual se caracteriza por ser biofertilizante y tener la capacidad de fijar nitrógeno como anaerobio estricto en *Phaseolus vulgaris* (frijol). Cepas del género *Ralstonia* producen diversos tipos de efectos en sus hospederos, entre los que se puede destacar a *R. solanacearum* que produce enfermedades en cultivos de importancia como *Solanum lycopersicum* (tomate) (Tans-Kersten y cols, 2001) y *Solanum tuberosum* (papa) (van Elsas y cols, 2000). En *Cupriavidus*, se conoce a *C. taiwanensis* capaz de fijar nitrógeno como simbiote en *Mimosa pudica* (Amadou y cols., 2008).

Al género *Cupriavidus* también pertenece *C. pinatubonensis* (Ex *C. necator*) JMP134 (pJP4), bacteria aislada de suelos australianos debido a su capacidad de crecer en el herbicida 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Esta bacteria se caracteriza por tener una gran versatilidad metabólica, que le permite utilizar más de cincuenta compuestos aromáticos como fuente única de carbono y energía (Pérez-Pantoja y cols, 2008). Se ha determinado que codifica 11 de las 12 vías principales del catabolismo de compuesto aromáticos, descritas hasta ahora en proteobacterias (Pérez-Pantoja y cols, 2008), lo que la hace un buen modelo de estudio para la degradación de este tipo de compuestos.

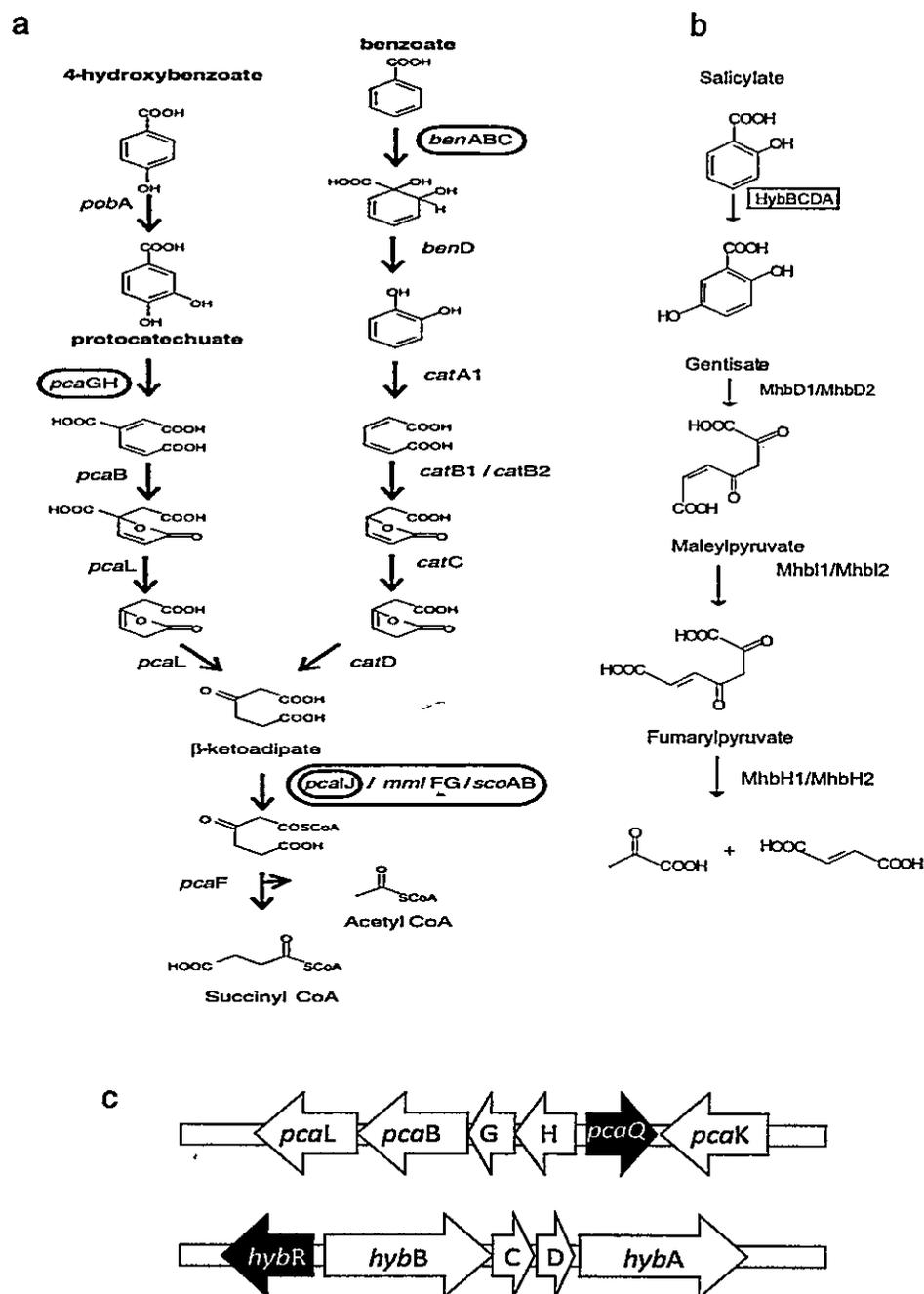
*C. pinatubonensis* JMP134 posee un genoma multipartito, el cual consta de 4 replicones: un primer cromosoma ampliamente conservado dentro del género, cuya mayoría de genes estarían relacionados con la codificación de funciones claves tales como replicación, transcripción y traducción de DNA (Lykidis y cols, 2010). El segundo cromosoma o crómido, como se los denomina hoy en día (Fricke y cols, 2009; Harrison y cols, 2010), contendría genes que codificarían para funciones relacionadas con

metabolismo energético, metabolismo secundario y metabolismo de aminoácidos (Pérez-Pantoja y cols, 2008; Lykidis y cols, 2010). Además, posee un megaplasmidio (pJPL), la mayoría de cuyos genes aun no tiene funciones descritas, salvo los genes relacionados con la degradación del 3-nitrofenol (Pérez-Pantoja y cols, 2008). Finalmente, tiene un plasmidio catabólico pJP4, en el cual se encuentran los genes *ffd*, necesarios para la degradación de 2,4-D y 3-CB (Pérez-Pantoja y cols, 2008). Cabe destacar que existen variantes genómicas de esta cepa, cepas JMP222 y JMP289, la primera no posee el megaplasmidio ni el plasmidio catabólico pJP4, mientras que la segunda no posee el pJP4 (Schenzle y cols, 1997).

Dentro de las vías de degradación de compuestos aromáticos en *C. pinatubonensis* JMP134 se destacan la vía de degradación de  $\beta$ -cetoadipato, la que se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias del suelo, debido a que juega un rol central en la degradación de compuestos aromáticos presentes en la naturaleza (Harwood y Parales, 1996). Varias vías periféricas generan intermediarios que son capaces de ingresar a la vía del  $\beta$ -cetoadipato, ya que su conversión a succinil-CoA y acetil-CoA permite oxidar el compuesto mediante el ciclo de Krebs (Figura 2a). Es en este paso, como en varios otros tanto en *C. pinatubonensis* como en un buen número de otras cepas de *Burkholderiales*, que se observa redundancia génica funcional (Pérez-Pantoja y cols, 2008; 2009; 2010b; 2012); en este caso en los genes *pcaIJ*, *mmIFG* y *scoAB* los cuales codifican para una  $\beta$ -succinil-CoA transferasa (Figura 2a).

Entre los intermediarios que permiten el ingreso de diversos compuestos aromáticos a la vía del  $\beta$ -cetoadipato se destaca el protocatecuato (PCA), el cual ha sido descrito como un intermediario clave en esta ruta ya que es un intermediario en la degradación de compuestos aromáticos, precursores del biopolímero vegetal lignina, tales como cafeato, clorogenato, cumarato, entre otros; siendo también intermediario de la degradación de 4-hidroxibenzoato (4-HB, Figura 2a) (Pérez-Pantoja y cols, 2008). La degradación de PCA es realizada por la enzima protocatecuato-3,4-dioxigenasa, cuyas subunidades son codificadas por los genes *pcaHG*, los cuales se encuentran ampliamente conservados en los genomas de *Cupriavidus*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (Pérez-Pantoja y cols, 2012).

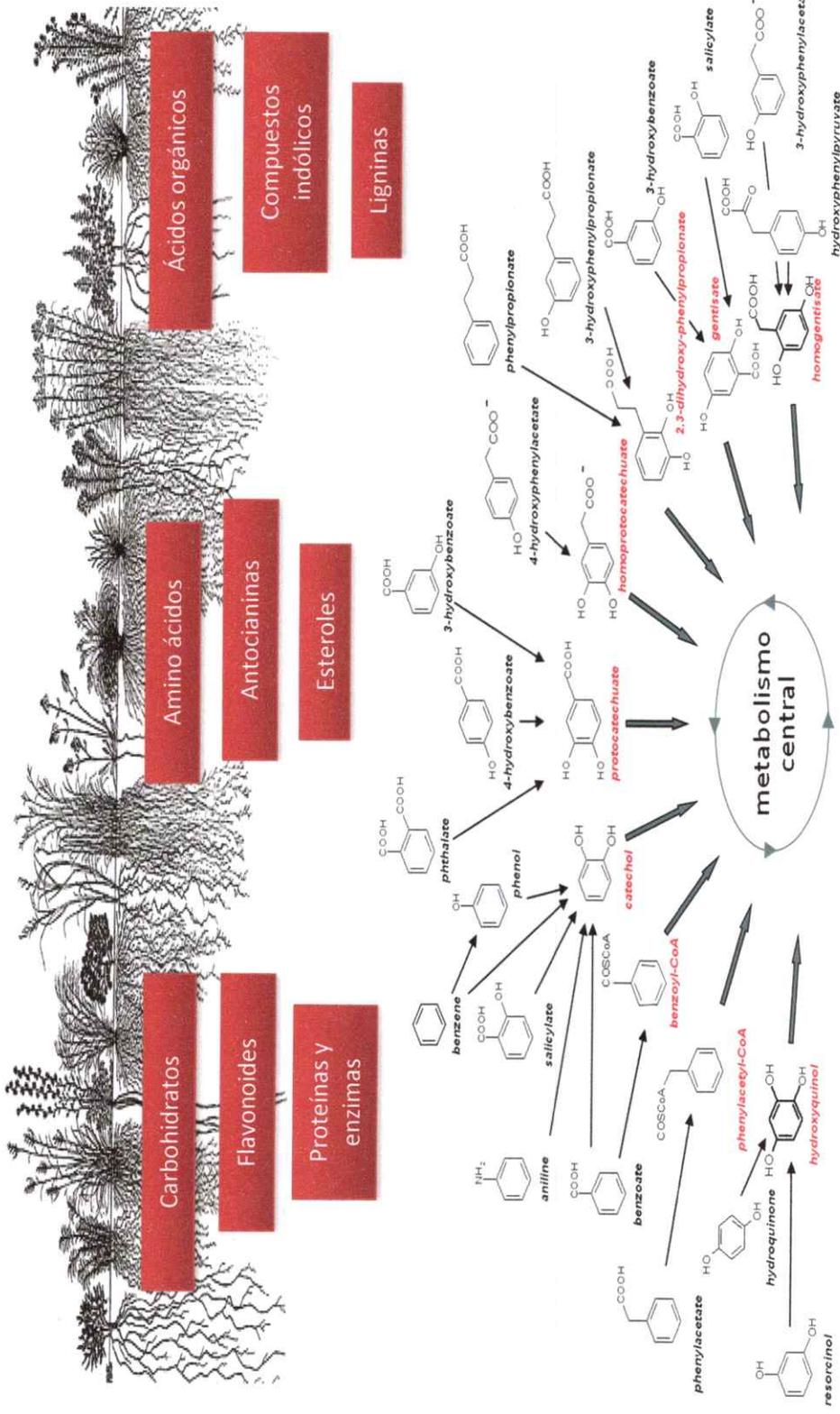
Otra ruta del catabolismo de compuestos aromáticos en *C. pinatubonensis* JMP134 es la del gentisato (2,5-dihidroxibenzoato, Figura 2b). Este metabolito se genera a partir de la degradación de salicilato (2-hidroxibenzoato, 2-HB) o 3-hidroxibenzoato. Se ha reportado ácido salicílico en exudados de *A. thaliana* (Walker y cols, 2003). La utilización de 2-HB como sustrato se ha descrito en *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y en algunas *Burkholderias*, en los que el salicilato es oxidativamente descarboxilado a catecol (Pérez-Pantoja y cols, 2008). En cambio, *C. pinatubonensis* JMP134 utiliza 2-HB a través de gentisato y la salicilato-5-hidroxilasa, una enzima multi-componente también descrita en *Ralstonia* sp U2 (Zhou y cols., 2001). En la cepa JMP134, estos genes están codificados en el cluster *hybRBCDA* (Figura 2c), siendo *hybB* el gen que codifica para la subunidad mayor (Pérez-Pantoja y cols, 2008; 2012).



**Figura 2.** Rutas catabólicas del β-cetoadipato y el gentisato en *C. pinatubonensis* JMP134. (a) Ruta de degradación de β-cetoadipato. (b) Ruta de degradación de gentisato. Se muestra el compuesto aromático con el cual se inicia la ruta catabólica. Aquellos genes que fueron mutados en este trabajo se encuentran marcados (óvalos negros: ruta β-cetoadipato; cuadro verde: ruta gentisato,). En el caso de los pasos enzimáticos que presenten redundancia génica, se indican los genes involucrados separados por una barra diagonal. (c) Contextos génicos relacionados con la degradación de 4-hidroxibenzoato, y 2-hidroxibenzoato (salicilato) en *C. pinatubonensis* JMP134. En negro se muestran los genes que codifican para proteínas regulatorias, mientras que en gris los genes que codifican para las subunidades de las proteínas que fueron inactivadas en este trabajo.

Por los antecedentes proporcionados, resulta muy probable que *C. pinatubonensis* y otras bacterias del orden *Burkholderiales* sean capaces de utilizar algunos de los componentes de los exudados de las plantas, entre ellos los compuestos aromáticos. Estas capacidades catabólicas podrían relacionarse con las habilidades de colonización de la planta, tanto a nivel rizosférico como endofítico. En el caso de la interacción de bacterias con *A. thaliana* se ha observado, en cultivos gnotobioticos, que *C. pinatubonensis* JMP134 es capaz de alcanzar niveles de crecimiento 1000 veces mayor en presencia de *A. thaliana*, que aquellas que nunca estuvieron en contacto con plantas, con valores cercanos a  $2,7 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mg de planta (UFC/mg planta) y  $1,1 \times 10^5$  UFC/mg planta respectivamente. (A. Zúñiga, datos no publicados). En cuanto a la colonización endófito se ha observado que puede alcanzar valores cercanos a  $1,1 \times 10^3$  UFC/mg planta (A. Zúñiga, datos no publicados). Valores semejantes se han encontrado para *Acacia caven* (Ledger y cols, 2012). La presencia de *C. pinatubonensis* JMP134 no produce cambios significativos en el largo de raíz primaria o la cantidad de clorofila presente en las hojas de *A. thaliana* o *A. caven*, aunque sí se observa un leve detrimento en el peso fresco de aquellas plantas que estuvieron en contacto con la cepa, en comparación con aquellas plantas no inoculadas (Ledger y cols, 2012; A. Zúñiga, datos no publicados).

El presente Seminario de Título busca explorar la relación entre las rutas catabólicas para compuestos aromáticos descritas en *C. pinatubonensis* JMP134, con la capacidad para usar parte de estos exudados como fuente de carbono, e influir así en las capacidades de colonización de plantas (Figura 3).



**Figura 3.** Propuesta: Diferentes compuestos que se han descrito como metabolitos que son parte de exudados, podrían ser utilizados como fuente única de carbono y energía por parte de *C. pinatubonensis* JMP134 y sus cepas mutantes, y tener alguna relación con la capacidad para colonizar plantas

## HIPÓTESIS

“La capacidad de *C. pinatubonensis* JMP134 para catabolizar compuestos aromáticos, como los presentes en exudados de plantas a través de las rutas de degradación del  $\beta$ -cetoadipato y gentisato, es importante para la colonización de plantas como *A. thaliana*.”

## OBJETIVO GENERAL

“Estudiar la participación de las rutas del catabolismo del 2-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato y sus derivados en la capacidad de *C. pinatubonensis* JMP134 para colonizar *A. thaliana* y utilizar sus exudados para crecer”.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- “Estudiar la inactivación de los genes *pcaH* de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato y *hybB* de la ruta del gentisato, en la capacidad de *C. pinatubonensis* JMP134 para crecer en exudados provenientes de *A. thaliana*”.
- 2.- “Evaluar la capacidad de estas mutantes y una variante genómica de la cepa JMP134 para colonizar la rizósfera de *A. thaliana*”.
- 3.- “Determinar posibles efectos en el crecimiento de *A. thaliana* por la colonización de JMP134 y sus cepas mutantes”.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1 Reactivos.

- Axygen Biosciences, Axygen Inc. (Union City, CA, USA). Se obtuvo Agarosa ultrapura.
- Invitrogen, Life Technologies Corporation. (Carlsbad, CA, USA) DNA polimerasa *Taq*, dideoxynucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), kit de clonamiento TOPO TA Cloning pCR 2.1 TOPO. SYBR Green Real-Time PCR master mixes. Estándares de peso molecular, 100 bp ladder (0.1– 1,5Kb) y 1 Kb Ladder (0,25-10 Kb).
- Merck (Darmstadt, Alemania): ácido benzoico, ácido nalidíxico, ácido sulfúrico, agar-agar, agar ultra puro, citrato de amonio ferrico, cloruro cobaltoso hexahidratado, cloruro cúprico tetrahidratado, cloruro níqueloso hexahidratado, cloruro de sodio, etanol, extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, D(-)fructosa, glicerol, hidróxido de sodio, isopropanol, metanol, molibdato de sodio dihidratado, nitrato de calcio, sacarosa, sulfato de amonio, sulfato de calcio, sulfato ferroso heptahidratado, sulfato de kanamicina, sulfato de magnesio heptahidratado, sulfato de manganeso monohidratado, sulfato de sodio anhidro, sulfato de zinc heptahidratado, peptona y triptona.
- *PhytoTechnology* Laboratories (Overland Park, KS, USA): Medio para crecimiento de plantas Murashige-Skoog (MS).
- Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido 2,4 diclorofenoxiacético, betaína, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosidasa (X-gal), 2-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).
- Winkler (Lampa, RM, Chile): Buffer TAE 50x, buffer de carga 6x.

## 1.2 Material biológico.

### 1.2.1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las bacterias y los plásmidos utilizados en esta memoria se indican en la Tabla 1.

### 1.2.2 Semillas de *A. thaliana*.

Las semillas utilizadas correspondieron a *A. thaliana* silvestre (WT), ecotipo Columbia (Col-0). Las cuales fueron facilitadas por el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

## 1.3 Medios de cultivo.

### 1.3.1 Medios líquidos.

Medio Luria-Bertani (LB): La composición fue 10 g de peptona, 5 g extracto de levadura y 5 g NaCl por cada litro de medio. El medio de cultivo fue esterilizado por autoclave y almacenado a temperatura ambiente. Cuando fue necesario se agregaron los antibióticos: 100 mg/ml de kanamicina (Km), 50 mg /ml de ácido nalidíxico (Nal), 1 mg /ml de estreptomina (Sm), concentraciones stock, luego de ser esterilizados con filtros de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Billerica, MA, USA).

Medio salino mínimo (Dorn): El medio salino mínimo contiene sales de amonio y fosfato, junto a minerales en concentraciones trazas (Dorn y cols, 1974). La solución de medio Dorn se preparó por dilución en agua estéril de las siguientes soluciones, cuya composición es:

- Buffer fosfato (10x): 140 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  y 20 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Esterilizada en autoclave.
- Sales (100x): 5 g/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 100 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 g de  $\text{MgSO}_4 \times$

7H<sub>2</sub>O y 1 g de Fe(III)-citrato de amonio. Esterilizada en autoclave. El compuesto Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> se esterilizó por separado y posteriormente se mezcló con las otras sales.

- Solución de elementos trazas (1000x): 10 mM de HCl (37%), 0,5 mM de ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM de MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O, 1 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,8 mM de CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0,1mM de CuCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,1 mM de NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0,15 mM de NaMoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O. Esterilizada por filtración.

La solución final se preparó agregando 100 ml de buffer fosfato (10x), 10 ml de sales (100x), 1 ml de solución de elementos trazas (1000x) a 889 ml de agua miliQ esterilizada por autoclave.

### 1.3.2 Medios sólidos

Para la preparación de placas con medio sólido se agregó agar (15 g/L) a los medios líquidos, para luego ser almacenadas a 4°C. En el caso de la preparación de placas de medio mínimo suplementado como única fuente de carbono, se utilizó un agar de alta pureza. Tanto los antibióticos como las fuentes de carbono utilizadas en la preparación de medios sólidos fueron previamente esterilizados por filtración por filtros de nitrocelulosa Millipore de 0,2 µm de diámetro de poro, y agregados después de la esterilización del medio de cultivo.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en esta memoria.

Cepas/plasmidos	Fenotipo/genotipo relevante	Fuente de origen
<b>Cepas bacterianas</b>		
<u>Cepas de <i>C. pinatubonensis</i></u>		
JMP134	Cepa silvestre, 2,4-D <sup>+</sup> , Fru <sup>+</sup> , 2-HB <sup>+</sup> , 4-HB <sup>+</sup>	DSMZ
JMP134Δ <i>hybB</i>	Mutante <i>hybB</i> , 2-HB <sup>-</sup> , 2,4-D <sup>+</sup> , Fru <sup>+</sup> , 4-HB <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134Δ <i>pcaH</i>	Mutante <i>pcaH</i> , 4-HB <sup>-</sup> , 2,4-D <sup>+</sup> , Fru <sup>+</sup> , 2-HB <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134BCA	Triple mutante en los genes <i>pcaI</i> , <i>mmIFG</i> , <i>scoAB</i> , Bz <sup>-</sup> , 4-HB <sup>-</sup> , 2,4-D <sup>-</sup> , Fru <sup>+</sup> , 2-HB <sup>+</sup>	Ledger y cols., 2012
JMP222	Derivada de JMP134, no posee megaplasmidio ni plasmidio catabólico pJP4, 2,4-D <sup>-</sup> , Fru <sup>+</sup> , Sm <sup>r</sup>	cepario laboratorio
<u>Cepas de <i>E.coli</i></u>		
DH5α	Nal <sup>r</sup>	Bullocks y cols., 1987
DH5α ( <i>phybB</i> )	Nal <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
DH5α ( <i>ppcaH</i> )	Nal <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
<b>Plásmidos:</b>		
pCR2.1 TOPO-TA	Vector suicida en <i>C. pinatubonensis</i> JMP134, Km <sup>R</sup>	Invitrogen (CA, USA)
pCR2.1 <i>hybB</i>	pCR2.1 TOPO-TA con fragmento interno de <i>hybB</i> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
pCR2.1 <i>pcaH</i>	pCR2.1 TOPO-TA con fragmento interno de <i>pcaH</i> , Km <sup>r</sup>	esta memoria

2,4-D<sup>+</sup>, Fru<sup>+</sup>, 2-HB<sup>+</sup>, 4-HB<sup>+</sup>: Capacidad de crecimiento en 2,4-D, fructosa, 2-HB o 4-HB, respectivamente. DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Km<sup>r</sup>, Nal<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>: resistencia a kanamicina, ácido nalidíxico, rifampicina o estreptomina, respectivamente.

## 2.1. Cultivo de microorganismos.

### 2.1.1 Mantención de microorganismos

Las cepas de *C. pinatubonensis* JMP134 se mantuvieron en placas con agar de alta pureza (15 g/L) en medio salino mínimo, suplementado con un compuesto aromático como única fuente de carbono y energía, a 30°C, más los antibióticos correspondientes cuando fue necesario. Las cepas de *E. coli* utilizadas se mantuvieron en placas con agar (15 g/L) en medio LB a 37°C, más los correspondientes antibióticos. Adicionalmente, se mantuvo un cepario de respaldo con cepas criopreservadas a -80°C en medio mínimo con glicerol al 20%.

### 2.1.2 Cultivos en medios líquidos

Para los cultivos líquidos de cepas de *E. coli* y *C. pinatubonensis*, se utilizaron tubos con 2 ml de medio LB o medio salino mínimo suplementado con fructosa 10 mM, con el respectivo antibiótico, cuando fue necesario, y se incubaron en un agitador orbital Lab Line modelo 3528 por 24 h hasta un máximo de 2 días, a 180 rpm y 37°C o 30°C, respectivamente.

### 2.1.3 Curvas de crecimiento en fuentes de carbono conocidas

Para realizar las curvas de crecimiento de *C. pinatubonensis* se utilizaron microplacas de 96 pocillos de 320 µl c/u conteniendo 200 µl de medio salino suplementado con (10 mM) fructosa (10 mM), 2-HB o 4-HB, inoculados a una OD<sub>600nm</sub> inicial entre 0,03 y 0,1 aproximadamente, a partir de un cultivo en fase estacionaria crecido en fructosa 10 mM por 24 h. Se realizaron mediciones a 600 nm cada 1 h, determinándose la densidad óptica en un espectrofotómetro UV/Vis.

#### 2.1.4 Crecimiento de cepas de *C. pinatubonensis* en exudados.

Diferentes volúmenes de exudado descritos en la sección 2.8.2: 25, 50, 75 y 100  $\mu$ l fueron inoculados en medio mínimo salino Dorn, hasta completar un volumen final de 500  $\mu$ l en tubos Eppendorf (AxyGen, Union City, CA, USA) de 1,75 ml de volumen final. Cada tubo con una diferente dilución de exudado constó de 5 réplicas, para las diferentes cepas utilizadas. Como control se utilizó tubos con las 4 diluciones descritas anteriormente sin inóculo bacteriano. Los tubos fueron inoculados con un volumen equivalente al 1 % del volumen final, los cuales corresponden a cultivos de 24 h en fructosa 10 mM. Posteriormente, 200  $\mu$ l de cada tubo fueron depositados en una microplaca estéril de 96 pocillos de poliestireno virgen grado cristal TPP Zellkulturtestplatte 96F (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza). Cada tratamiento y dilución constó de al menos una réplica técnica.

Las microplacas fueron leídas por un espectrofotómetro, lector de ELISA, Eon Microplate Spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT, USA), cuyo programa de incubación consistía en agitación orbital constante a 230 rpm y lectura de densidad óptica a 600 nm, cada 1 h durante 48 h.

## 2.2. Métodos analíticos

### 2.2.1 Espectrofotometría ultravioleta/visible

Las determinaciones espectrofotométricas destinadas al análisis de los inóculos iniciales de *C. pinatubonensis* para colonización rizosférica, se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis con arreglo de diodos (G.E. Genequant 1300). Para determinaciones de densidad óptica (turbidez) a 600 nm se utilizó una cubeta de cuarzo de 0,5 ml con 1 cm de paso óptico. Las muestras se leyeron directamente,

utilizando como blanco el medio de cultivo libre de células. Para las curvas de crecimiento de las cepas, tanto en fuentes de carbono conocidas como en exudados, se utilizaron microplacas estériles de 96 pocillos de poliestireno virgen grado cristal TPP Zellkulturtestplatte 96F, las cuales fueron leídas por el lector de placa ELISA Eon Microplate Spectrophotometer. Para mediciones de la concentración de RNA extraído y cDNA se utilizó la microplaca Take3, que cuenta con micropocillos de 2 ml de volumen con 0,5 mm de paso óptico, las muestras se leyeron directamente, usando como línea base el solvente (agua) utilizado para resuspender el RNA extraído de las células y posterior síntesis de cDNA.

### 2.3. Purificación de DNA

#### 2.3.1 Purificación de DNA genómico

Para la purificación de DNA total a partir de cepas de *C. pinatubonensis* JMP134, se utilizó el kit "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega, Madison, WI, USA). Este kit se basa en lisis celular a alta temperatura (80°C) y en una precipitación del DNA en presencia de isopropanol. El DNA obtenido por este método es de alta pureza y puede ser empleado directamente en técnicas moleculares como amplificación por PCR. Se siguieron las instrucciones del proveedor para la extracción del DNA genómico.

#### 2.3.2 Purificación de plásmidos

Para la extracción y purificación de plásmidos recombinantes se utilizó el kit "AxyPrep plasmid Miniprep" (Axygen, Biosciences, CA, USA). Éste se basa en el método de lisis alcalina de células bacterianas en combinación con la unión selectiva del DNA plasmidial a una columna de sílica cuando existe una elevada

concentración de sales. El protocolo consta de las siguientes etapas: lisis celular, adsorción del DNA a una columna, lavado y elución del DNA. Se siguieron las instrucciones del proveedor para la extracción plasmidial.

### 2.3.3 Purificación de fragmentos de DNA de productos de PCR.

Para purificar fragmentos de DNA se utilizó el kit "AxyPrep PCR Clean-up" (Axygen, Biosciences, CA, USA). Este método emplea una solución de unión en combinación con una columna de sílica para purificar fragmentos de DNA lineal, mayores que 75 pb. Este kit se usó tanto para purificar productos de PCR a partir de la mezcla de reacción, como para purificarlos desde geles de agarosa.

## 2.4. Amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 2.4.1 Mezcla de reacción

La mezcla de reacción para la amplificación de DNA PCR, fue preparada utilizando Taq polimerasa (Invitrogen), buffer para Taq polimerasa (10X), partidores (100 pmoles/ml), mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (adenina, citosina, guanina y timina) 10 mM c/u y  $MgCl_2$  (50 mM). En general, la mezcla de reacción contenía 2 pmoles/ml de cada partidor, 0,25 mM de desoxirribonucleótidos y 1,5 mM de  $MgCl_2$ , disueltos en agua libre de nucleasa. Además, se agregó el buffer para Taq polimerasa de manera que la concentración final fuera 1X. Finalmente, se tomaron 24  $\mu$ l de la mezcla adecuada, se agregó 1  $\mu$ l de la preparación de DNA como molde y 0,5 U de DNA polimerasa. En ocasiones se utilizó betaina 5 M para mejorar la definición del producto PCR, la concentración a la cual se encontraba en el mix correspondía a 0.5 M y se agregó en un volumen equivalente al buffer para Taq polimerasa (10x), el

cual era descontando del volumen original de agua libre de nucleasa contenida en el mix.

El DNA molde utilizado fue DNA genómico, plasmidial o proveniente de lisados de colonias. En este último caso, el lisado fue preparado utilizando 50 ml de cultivo líquido, que fue centrifugado a 12000 rpm por 2 min en una centrifuga Boeco Germany U-320R (Boeckel &Co, Hamburgo, Alemania) y luego resuspendido en 50 ml de agua destilada estéril. Luego, las células fueron sometidas a 95°C durante 10 min. Finalmente, se centrifugó por 1 min a 12000 rpm, quedando en el sobrenadante el DNA a utilizar.

#### 2.4.2 Partidores

Los partidores utilizados, sus secuencias y otras características se muestran en la Tabla 2. Los partidores fueron diseñados utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; Rozen y Skaletsky, 2000), buscando, en general, obtener parejas de partidores de 20 bases de largo, con 50% de contenido GC, que no formen estructuras de horquilla y que no exista apareamiento entre ellos.

#### 2.4.3 Programas de PCR

Para la realización del PCR se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). El programa de PCR generalmente utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de denaturación de 5 min a 95°C, 30 ciclos de amplificación (30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 min a 72°C), y un ciclo de extensión de 7 min a 72°C para luego bajar la temperatura a 4°C. Los ciclos de amplificación específicos para cada programa y DNA se detallan a continuación:

- Programa 1: Se utilizó para la obtención específica de un fragmento de los genes *hybB* y *pcaH*. Constó de 32 ciclos de amplificación 30 s a 95°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C.

- Programa 2: Se utilizó para la amplificación de los insertos en el vector pC.R 2.1 TOPO-TA. Constó de 32 ciclos de: 30 s a 95°C, 40 s a 60°C y 1,5 min a 72°C.

- Programa 3: Se utilizó para la obtención de un fragmento de la secuencia del gen de 16S rRNA de *C. pinatubonensis*. Constó de 25 ciclos de: 45 s a 94°C, 45 s a 56°C y 2 min a 72°C.

- Programa 4: Se utilizó para realizar la amplificación de secuencias repetidas PCR-BOX en las cepas de *C. pinatubonensis*. Constó de 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 53°C y 8 min a 72°C, más una extensión final de 16 min a 72°C.

## 2.5. Clonamiento de DNA

### 2.5.1 Construcción de vectores.

Las secuencias de los segmentos (400 pb aprox) de los genes *hybB* y *pcaH* fueron clonados en los vectores pCR 2.1 TOPO-TA, utilizando el método de clonamiento TOPO TA Cloning Kit, cuya estrategia consiste en un paso de clonamiento en el cual el producto PCR generado por la Taq polimerasa, es directamente insertado en el vector. No requiere utilización de enzimas ligasa, procedimientos post PCR o partidores que contengan secuencias específicas. Los plasmidios obtenidos, *phybB* y *ppcaH*, fueron dializados durante 45 min a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de diametro.

### 2.5.2 Preparación de células electrocompetentes y transformación por electroporación.

Un volumen determinado de medio LB (100 ml) fue inoculado al 1% con un cultivo fresco de la cepa correspondiente. Una vez alcanzada una turbidez de 0,4-0,5 o 0,5-0,6 a 600 nm para cepas de *E. coli* y *C. pinatubonensis*, respectivamente, las células se enfriaron por 15 min en hielo, para luego centrifugarlas a 8000 rpm en una centrifuga Boeco Germany U-320R, por 5 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 20 ml de agua estéril fría. La centrifugación fue repetida dos veces. La suspensión celular final fue guardada a -20°C en alícuotas de 50 µl de glicerol al 20%, para su uso posterior. La electroporación se realizó en un sistema BioRad (Gene Pulser, 1652077 y Gene Pulser II plus), utilizando cubetas de electroporación de 0,1 cm de paso MicroPulser Cuvette (Hercules, CA, USA), con las siguientes condiciones: 200Ω, 25µF y 2,5kV. Al momento de la electroporación, las células fueron descongeladas en hielo, incubadas con el DNA (50 ng aprox) por 15 min y transferidas a las cubetas de electroporación (previamente enfriadas). Después de la electroporación, las células fueron traspasadas a un tubo con 600 ml de medio LB, incubadas a 30°C en el caso de *C. pinatubonensis* y 37°C en el caso de *E. coli* con agitación constante durante 1 h.

Finalmente, se sembraron alícuotas de 100, 200 y 300 µl en placas con el medio selectivo, las que fueron incubadas durante 24 h a 30°C, en el caso de *C. pinatubonensis*. Para *E. coli* DH5α, se emplearon placas de agar LB en cuya superficie se dispersó 40 µl de una solución 20 g/L de X-gal y 4 µl de una solución 200 g/L de IPTG, que luego se secaron en estufa durante 1 h a 37 °C, previo a ser sembradas.

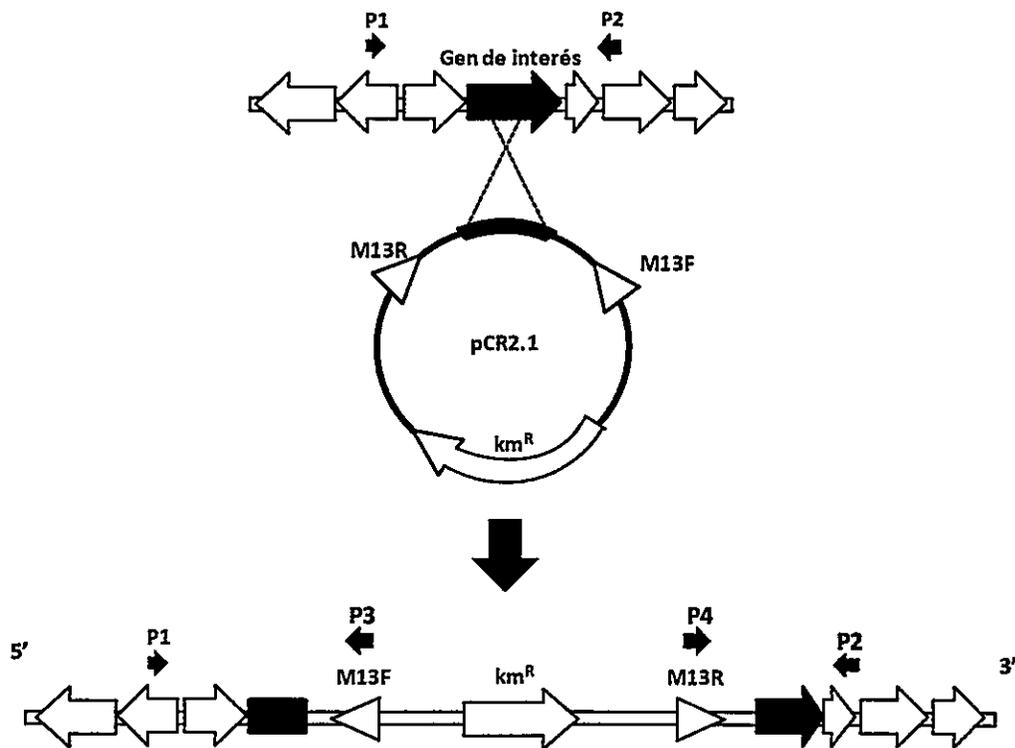
**Tabla 2.** Partidores utilizados en este Seminario de Título

	Secuencia (5'→3') Forward	Partidores	Secuencia (5'→3') Reverse
<b>Inactivación de genes</b>			
muthybBFW	AGCCGCTCGAGGA CTATCTC	muthybBRV	CACACGAAGTCGAA CGAGTC
mutpcaHFW	GTAAAGATCGGG TCGAACG	mutpcaHRV	CGACAACGACCTGA CGATT
<b>Confirmación inactivación</b>			
M13Fw	GTAAAACGACGGC CAG	M13Rv	CAGGAAACAGCTAT GAC
hybBExtFW	TGCTGCTTCGCAC AAATAAC	HybBExtRV	GGACGAGATAGAGG CAGTCG
pcaHExtFW	TCATTCCACCCCC TTACAAC	PcaHExtRV	CAGGCCGATATGCA GGTAAG
<b>16S</b>			
8F <sup>a</sup>	AGAGTTTGATCCT GGCTCAG	1392R <sup>a</sup>	AGGGGCGGTGTGTA C
<b>PCR-BOX</b>			
BOX_A1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G		

(a) Amann y cols, 1995.

## 2.6. Inactivación de genes en *C. pinatubonensis* JMP134

Un fragmento interno de cada gen a mutar (aprox. 400 pb), fue amplificado mediante PCR, utilizando DNA genómico obtenido de *C. pinatubonensis* JMP134 como templado. Los partidores utilizados para este propósito se indican en la Tabla 2. Los productos de PCR obtenidos fueron clonados individualmente en el vector pCR2.1-TOPO (Tabla 1) en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Cada plásmido resultante, incapaz de replicar en *C. pinatubonensis* JMP134, después de ser verificado el correcto clonamiento, fue purificado y electroporado en células de la cepa JMP134 para obtener la interrupción del gen blanco, a través de un evento de recombinación cromosomal, resultando en la inserción cromosomal del vector y la generación de dos copias incompletas del gen (Figura 4). Las cepas resultantes fueron seleccionadas en agar LB conteniendo kanamicina. La correcta interrupción fue corroborada por PCR con parejas de partidores ubicadas en la parte interna del vector pCR2.1-TOPO y río abajo o río arriba de la región de interés.



**Figura 4.** Estrategia de inactivación de genes cromosomales en *C. pinatubonensis*. Representación esquemática de la recombinación entre el fragmento interno del gen de interés clonado en el vector pCR2.1 y el gen a mutar en el genoma. La confirmación de la integración de pCR2.1 en el genoma se realizó mediante PCR con partidores M13F o M13R, los cuales tienen sitio de unión dentro del vector, junto a partidores externos al gen de interés (Fw ext- RV ext).

## 2.7. Secuenciación y análisis de secuencias

### 2.7.1 Secuenciación

Para la secuenciación de los productos de PCR que fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO TA, se utilizaron los partidores comerciales M13F y M13R (Macrogen, Macrogen Corporation, Corea).

### 2.7.2 Análisis de las secuencias de DNA

La búsqueda de regiones de similitud en el genoma de *C. pinatubonensis* JMP134 se realizó mediante el algoritmo de BLAST disponible en la página del Joint Genome Institute accesible en las paginas <http://genome.jgipsf.org/raleu/raleu.home.html> y <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>. Para comparación y análisis de secuencias se utilizó el software Vector NTI8.0.

## 2.8. Cultivo de *A. thaliana*.

### 2.8.1 Tratamiento de semillas

Antes de ser sembradas, las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas superficialmente y estratificadas. El proceso de esterilización de semillas consistió en resuspender aproximadamente 100 mg de semillas en etanol 95 % (Merck, Darmstadt, Alemania) mediante vortex (Labnet, Labnet Inc, Edison, NJ, USA) durante un minuto. Posteriormente, las semillas fueron resuspendidas en cloro comercial al 5 % v/v y agitadas durante 7 min a través de vortex. Cumplido el tiempo, las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril por un minuto en agitación; este proceso fue repetido 3 veces. Finalmente, las semillas fueron guardadas en agua destilada estéril a 4°C, en oscuridad, por 48 h para permitir el proceso de estratificación.

### 2.8.2 Obtención de exudados

Aproximadamente 50 semillas estratificadas fueron sembradas sobre 20 ml de agar Murashige & Skoog (MS), el cual consiste en 50% p/v de medio MS (*PhytoTechnology Laboratories, Overland Park ,KS, EE.UU*) en agar de alta pureza al 0,8% p/v, suplementado con sacarosa al 1% en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Entre 4 a 5 placas fueron incubadas durante 21 días en una cámara de cultivo de plantas bajo un sistema de foto-periodo que consistió en 12 h de luz / 12 h de oscuridad, a una temperatura promedio de 22°C. Como control se utilizaron placas de agar MS sin ser sembradas, las cuales fueron expuestas a las mismas condiciones de aquellas que contienen plantas.

Una vez finalizado el periodo de incubación se procedió a moler el agar y retirar las plantas, con pinzas metálicas. Posteriormente, el agar recuperado fue disuelto en agua destilada estéril en un volumen equivalente a 10 ml por cada placa, en matraces de 500 ml. Los matraces fueron sometidos a agitación orbital por 3 h a 180 rpm y 30 °C para permitir una mejor difusión del agar. Una vez concluido el periodo de agitación los volúmenes fueron transferidos a tubos Falcon estériles de 50 ml cada uno y centrifugados (Boeco Germany U-320R), a 8000 rpm durante 15 min. Finalmente los sobrenadantes fueron filtrados a través de filtros Millipore de nitrocelulosa (Ballerica, MA, EE.UU.) de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y almacenados en tubos Falcon de 50 ml a -20°C. El mismo procedimiento fue utilizado para las placas que contenían solamente agar MS y que fueron utilizadas como controles (Figura 5).

### 2.8.3 Colonización de *A. thaliana*.

Una vez estratificadas las semillas se siguió el mismo procedimiento de sembrado descrito en la sección 2.8.2. Transcurrido un período de 7 días las plántulas

de *A. thaliana* fueron traspasadas a placas de MS 50% p/v en agar de alta pureza al 0,8 % p/v, las cuales no fueron suplementadas con sacarosa al 1%.

Las cepas de *C. pinatubonensis* fueron inoculadas en una solución de medio mínimo salino Dorn, suplementado con fructosa 10 mM como única fuente de carbono y energía. De acuerdo a la Tabla 1 se adicionó el antibiótico correspondiente en las cepas requeridas. Una vez alcanzada una  $O.D_{600nm} = 0,6$  las cepas fueron inoculadas en agar MS, por lo que cada placa contó con una concentración final de  $1 \times 10^4$  UFC/ml.

Se traspaso un número de 3 plantas por placa, siendo un total de 5 placas por cada tratamiento. Los controles utilizados correspondieron a placas de MS 50% p/v en agar de alta pureza al 0,8 % p/v, las que contaban sólo de inóculo bacteriano.

#### 2.8.4 Colonización del rizoplaneo.

Una vez transcurridas las tres semanas de incubación, se extrajeron las plantas a partir de las placas de agar inoculadas con las cepas de *C. pinatubonensis*. Se lavó cada planta con 1 ml de  $MgSO_4$  10 mM y se sometió a agitación con vortex durante 1 min. El buffer fue utilizado con el fin de evitar posible muerte celular por parte de las bacterias durante la agitación. Este volumen fue utilizado para realizar diluciones seriadas, las cuales fueron sembradas en placas de medio mínimo Dorn, agar ultra puro 1,5% p/v, suplementado con fructosa 10 mM como única fuente de carbono y energía. Además, se adicionó el correspondiente antibiótico para aquellas cepas que poseen resistencia a un marcador de selección en particular. Las UFC/mg planta fueron determinadas luego de 24 h de incubación a 30°C.

## 2.9 Determinación de parámetros de crecimiento en *A. thaliana*

Semillas estratificadas de *A. thaliana* fueron sembradas en medio MS 50% p/v, agar de alta pureza al 0,8 % p/v, en placas de Petri de 9 cm de diámetro durante 7 días. Aproximadamente 30 plántulas por cada tratamiento fueron traspasadas a placas (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) de agar MS de similar composición a las anteriores, las cuales contaban con inóculos de las diferentes cepas de *C. pinatubonensis* a una concentración final de  $1 \times 10^4$  UFC/ml. Como control se utilizaron plántulas sembradas en agar MS sin inóculo bacteriano. Las placas fueron incubadas en posición vertical con un grado de inclinación de 65° grados con respecto al eje horizontal, durante 21 días en una cámara de plantas bajo el mismo sistema de fotoperíodo y temperatura descrito en la sección 2.8.2.

### 2.9.1. Determinación de largo de raíz y peso fresco

Se determinó la longitud de la raíz primaria de cada planta y para poder determinar el peso fresco, cada planta fue pesada en una balanza analítica Shimadzu AUX 220.

### 2.9.2. Determinación de contenido de clorofila

Se pesaron entre 5 y 10 mg de tejido de hoja, las cuales fueron sumergidas en 800  $\mu$ l de N,N-9-dimetilformamida e incubadas durante 24 h a 4°C en oscuridad. La concentración de clorofila se estimó a partir de la medición de clorofilas a y b, a dos longitudes de onda: 647 y 664 nm, en un espectrofotómetro UV/Vis con arreglo de diodos (G.E. Genequant 1300, Little Chalfont, UK). Con estos resultados se pudo calcular la cantidad de clorofila por miligramo de tejido de hoja (Porrás y cols, 1989). En total, hojas de 6 plantas por tratamiento fueron analizadas, y como control se

determinó la concentración de clorofila a y b en aquellas plantas que no estuvieron en contacto con un inoculo bacteriano.

#### 2.10. Análisis estadísticos

Los datos de colonización rizosférica y parámetros de crecimiento en *A. thaliana* fueron analizados a través de las pruebas estadísticas de Leven y Kolgorovov-Srivnov, para ver homogenidad de varianzas y normalidad, respectivamente. Una vez cumplidos estos supuestos se realizó una prueba de ANOVA de una via. A aquellos análisis de varianza que tuvieron diferencias significativas por efecto de los tratamientos se les aplicó test de Tukey HSD (Honestly Significant Difference;  $p < 0,05$ ); esta prueba se aplicó para realizar comparaciones entre tratamientos

Diseño experimental

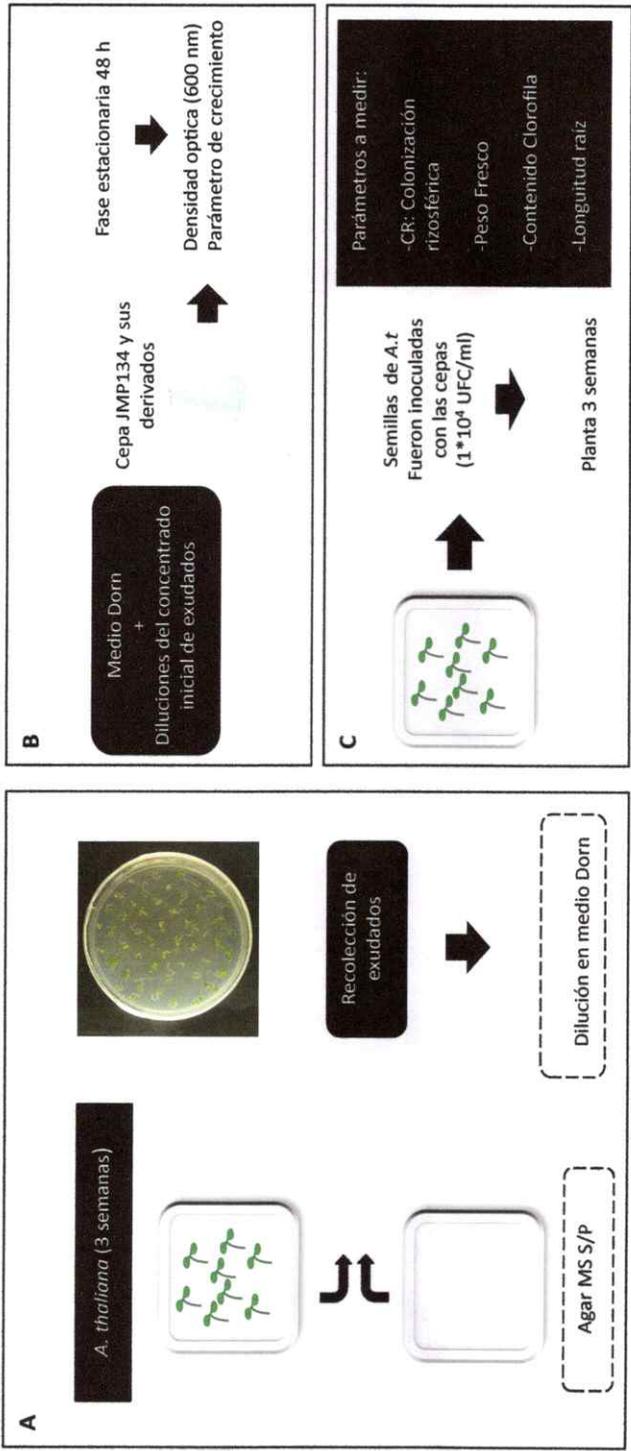


Figura 5. Esquema del diseño experimental de los experimentos realizados con *A. thaliana* y *C. pinatubonensis* JMP134 y sus cepas derivadas.

## RESULTADOS

1.- Inactivación de los genes *pcaH* de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato y *hybB* de la ruta del gentisato, para evaluar la capacidad de *C. pinatubonensis* JMP134 para crecer en exudados provenientes de *A. thaliana*.

Como se señaló, la cepa *C. pinatubonensis* JMP134 posee amplias capacidades catabólicas, por lo cual es capaz de utilizar una amplia variedad de compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía. Dentro de ellos, el 2-HB y 4-HB, los cuales son catabolizados a través de las rutas del gentisato y  $\beta$ -cetoadipato, respectivamente, las que canalizan un buen número de compuestos aromáticos que están presentes en los exudados de las plantas.

Los genes *hybB* y *pcaH* de la cepa *C. pinatubonensis* JMP134 fueron inactivados insercionalmente mediante un evento de recombinación homologa (Louie y cols, 2002; Ledger y cols, 2006). Esta estrategia consiste en que un fragmento interno del gen de interés (400 pb aprox.) es clonado en un vector suicida, el cual contiene un gen que codifica una resistencia a un determinado antibiótico, en este caso Km. Esta construcción plasmidial es introducida en la cepa receptora final, donde mediante un evento de recombinación simple se inserta en el genoma interrumpiendo el gen blanco, generando 2 copias truncadas de éste (Figura 6a).

De acuerdo a lo descrito anteriormente, se utilizó como vector suicida el plasmidio pCR. 2.1 TOPO-TA, conteniendo el fragmento interno del gen de interés, el cual es incapaz de replicar en *C. pinatubonensis* JMP134. El plasmidio recombinante se introdujo a *C. pinatubonensis* JMP134 por electroporación para la obtención de mutantes.

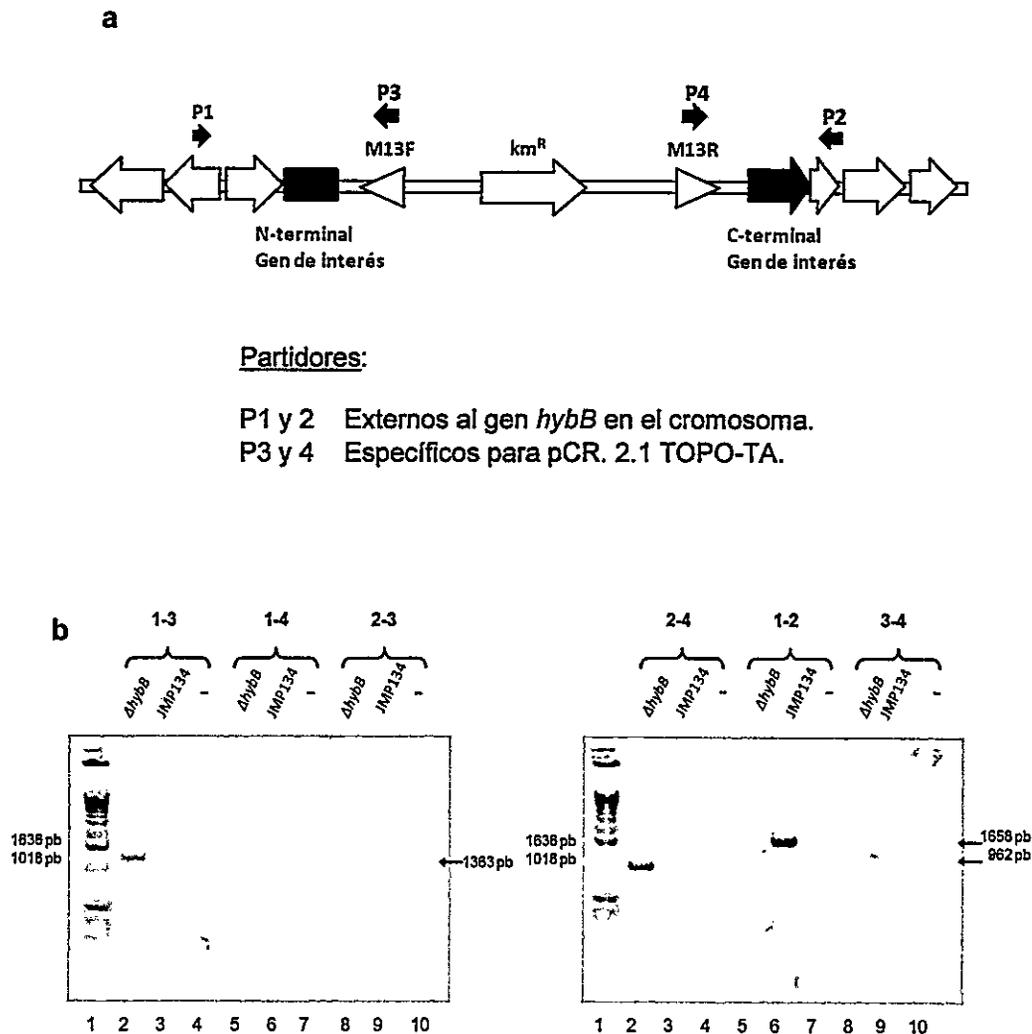
La obtención de los mutantes *hybB* y *pcaH* tuvo una frecuencia del orden de  $10^{-10}$  recombinantes/células totales. El genotipo de las cepas mutantes obtenidas fue verificado por la amplificación de los genes interrumpidos mediante PCR a partir de DNA cromosomal de las colonias seleccionadas. La introducción del plasmidio suicida genera 2 copias truncadas del gen determinado, por lo tanto, la amplificación del gen con partidores externos a éste no debiera ocurrir, debido al aumento de tamaño. Sin embargo, al combinar los partidores externos al gen en el cromosoma con partidores específicos para el vector suicida, es posible obtener una amplificación que permite deducir la orientación del vector inserto. Esto se realizó con los partidores externos: *hybBExtFW* y *HybBExtRV* (Tabla 2) en el caso del gen *hybB*, *pcaHExtFW* y *pcaHExtRv* (Tabla 2) para el gen *pcaH*, mientras que los partidores específicos para pCR. 2.1 TOPO-TA correspondieron a M13 Fw y M13 Rv (Figura 4).

Como se observa en la Figura 6b, de los 3 amplificados obtenidos los dos primeros corresponden a un tamaño de 1363 pb y 962 pb, respectivamente. Estos productos se obtuvieron en la cepa mutante en el gen *hybB* y no así en la cepa silvestre de *C. pinatubonensis* JMP134, al utilizar tanto un partidador externo del gen en el cromosoma y uno específico para el plasmidio suicida (combinaciones 1-3 y 2-4, respectivamente). En cuanto al último amplificado, de 1658 pb, corresponde al tamaño del gen completo en el cromosoma, el cual solo se obtuvo en la cepa silvestre de *C. pinatubonensis* y no así en la cepa mutante *hybB*. Este último fragmento se amplificó utilizando partidores externos al gen en el cromosoma (combinación 1-2).

El mismo procedimiento se realizó para comprobar la inserción homóloga para el recombinante en el gen *pcaH* con los partidores externos del gen en el cromosoma y los partidores específicos de pCR. 2.1 TOPO-TA (datos no mostrados). Además, se

determinaron los patrones de PCR-BOX, para chequear que las mutantes obtenidas corresponden a cepas derivadas de *C. pinatubonensis* JMP134 y no de alguna otra variante génica de esta cepa. Este método se basa en la amplificación con un único partidor, correspondiente a una secuencia repetitiva en el genoma de Proteobacterias, lo que permite obtener un patrón de productos amplificados específico para cada bacteria al utilizar su genoma como templado. En base a este método, se compararon los patrones de productos de PCR amplificados de las cepas mutantes obtenidas con los de la cepa silvestre (Martin & cols, 1992), resultando el patrón esperado (datos no mostrados).

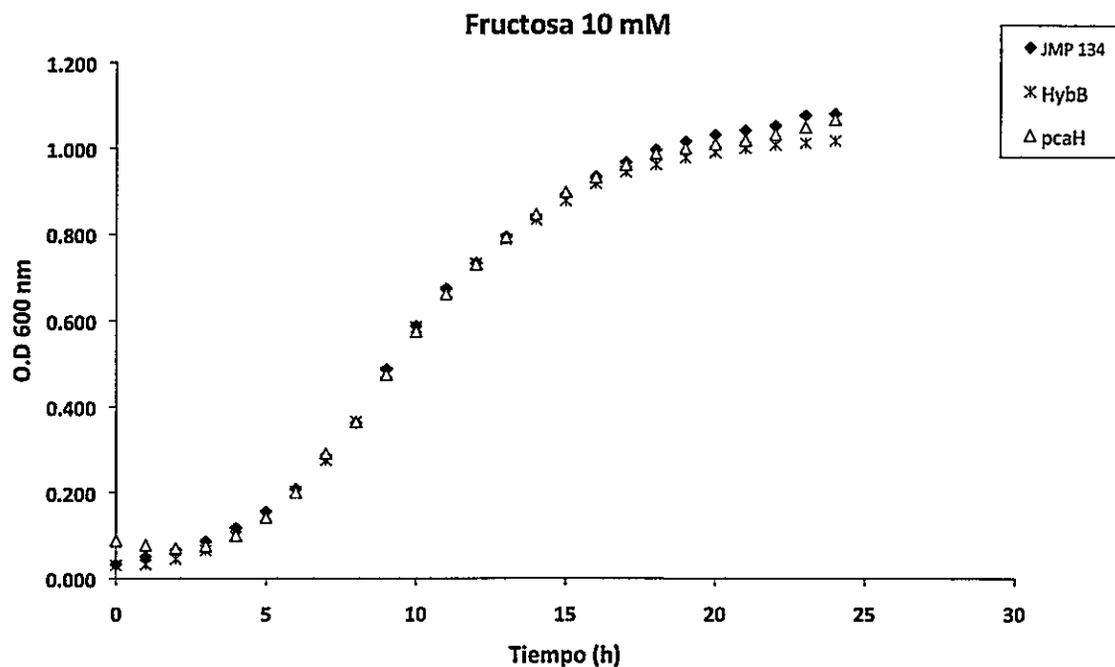
También se chequeo el fenotipo de cada cepa mutante, mediante la capacidad de éstas de crecer en compuestos tales como 2,4-D, 3HB y fructosa, las cuales son utilizadas por la cepa silvestre de JMP134 como fuente de carbono y energía. En el presente trabajó solo se muestra el grafico correspondiente al crecimiento de dichas mutantes en fructosa.



**Figura 6.** Comprobación mediante amplificación por PCR de la obtención de la cepa mutante *hybB*. **a.** Esquema de las posiciones donde alinean los partidores utilizados para el análisis de la cepa *C. pinatubonensis* JMP134  $\Delta$ *hybB*, mediante PCR. **b. Izquierda:** Resultados de amplificación con los partidores 1-3, 1-4, 2-3. Carril 1: estándar de DNA 1 kb. Carriles: 2, 5 y 8, cepa JMP134  $\Delta$ *hybB*. Carriles: 3, 6 y 9, cepa silvestre. Carriles: 4, 7 y 10, controles sin DNA. **Derecha:** Resultados de amplificación con los partidores 2-4, 1-2, 3-4. Carril 1: estándar de DNA 1 kb. Carriles: 2, 5 y 8, cepa JMP134  $\Delta$ *hybB*. Carriles: 3, 6 y 9, cepa silvestre. Carriles: 4, 7 y 10, controles sin DNA. Se señalan mediante flechas las bandas obtenidas para la cepa mutante y la cepa silvestre. Al costado de la figura se muestra el tamaño esperado en pb. Combinación de partidores: 1-3: *hybB*ExtFW-M13Fw, 1-4: *hybB*ExtFW-M13Rv, 2-3: *hybB*ExtRv-M13Fw, 2-4: *hybB*ExtRv-M13Rv, 1-2: *hybB*ExtFw-*hybB*ExtRv y 3-4: M13Fw- M13Rv

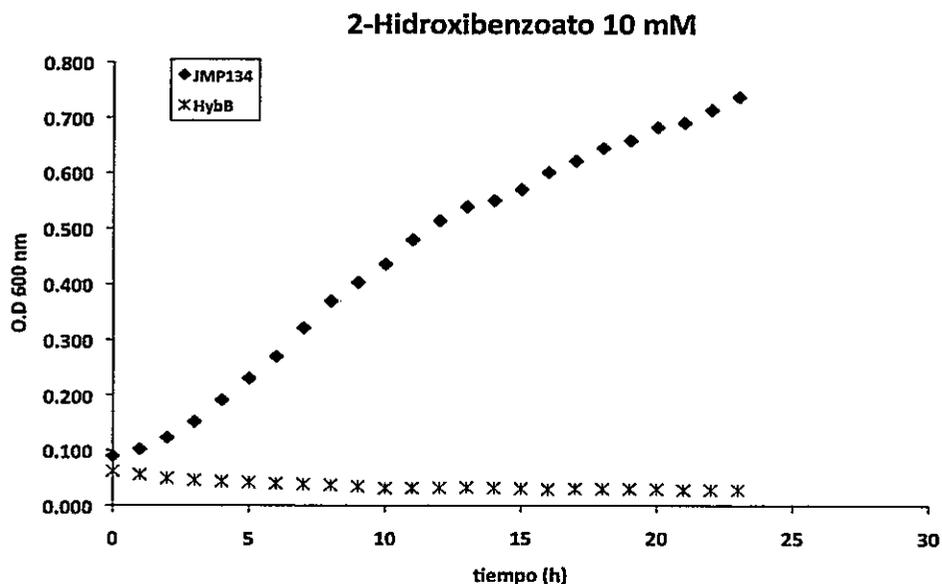
Para evitar una posible reversión de la inactivación de los genes respectivos, cada cultivo de las cepas mutantes fue suplementado con Km. Debido al tipo de mutación, las cepas obtenidas deberían ser capaces de crecer en presencia de dicho antibiótico. Como se observa en la Figura 7, tanto la cepa mutante JMP134 $\Delta$ *hybB* como la JMP134 $\Delta$ *pcaH* fueron capaces de utilizar fructosa 10 mM como fuente única de carbono y energía. Ambas cepas mutantes se comportaron de manera similar a la cepa silvestre, ya que todas las cepas lograron llegar a la fase estacionaria de crecimiento, una vez transcurridas las 24 h de cultivo.

El gen *hybB* codifica para la subunidad mayor de una oxigenasa que forma parte de la enzima multicomponente salicilato-5-hidroxilasa, la cual cataliza el primer paso en la degradación de 2-HB, transformándolo a gentisato, por lo tanto, la cepa mutante JMP134 $\Delta$ *hybB* es incapaz de utilizar la ruta del gentisato para su crecimiento. En el caso del gen *pcaH*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la enzima protocatecuato-3,4-dioxigenasa, en la cepa mutante JMP134 $\Delta$ *pcaH* se inhibe la utilización de protocatecuato, el primer intermediario de la degradación de 4-HB. Con el objetivo de verificar estos comportamientos esperados, se creció a las cepas JMP134 $\Delta$ *hybB* y JMP134 $\Delta$ *pcaH* en 2-HB y 4-HB, respectivamente (Figura 8). Los resultados muestran una inhibición del crecimiento de dichas cepas en estas fuentes de carbono, en comparación con la cepa silvestre JMP134.

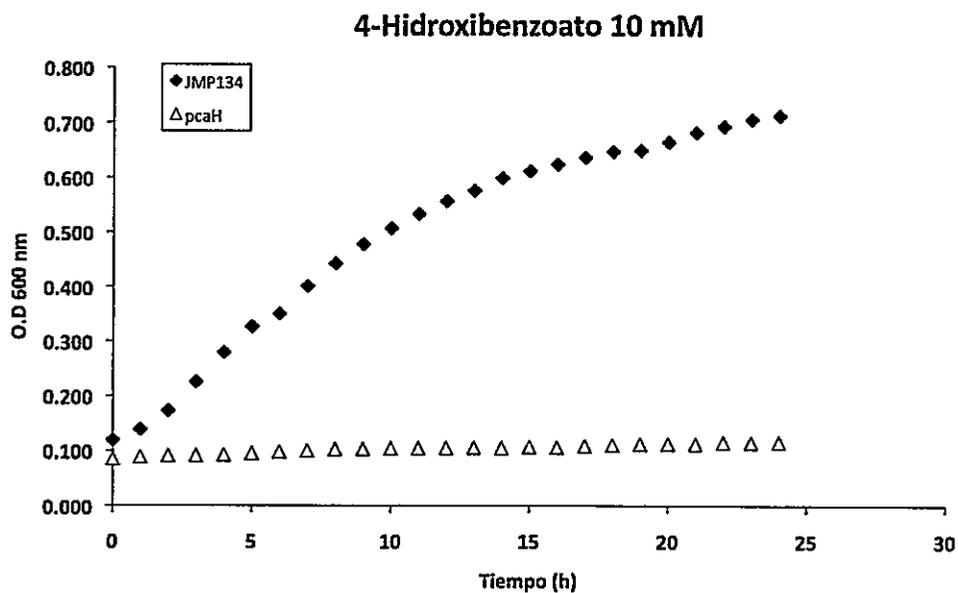


**Figura 7.** Crecimiento de las cepas mutantes JMP134 $\Delta$ *hybB* y JMP134 $\Delta$ *pcaH* en fructosa 10 mM. Los gráficos además muestran el comportamiento de la cepa silvestre JMP134 bajo las mismas condiciones de medio mínimo y fuente de carbono a 30°C, con agitación continua durante 24 hrs. Las curvas son representativas de tres experimentos independientes. Desviación estándar menor al 5%.

a



b

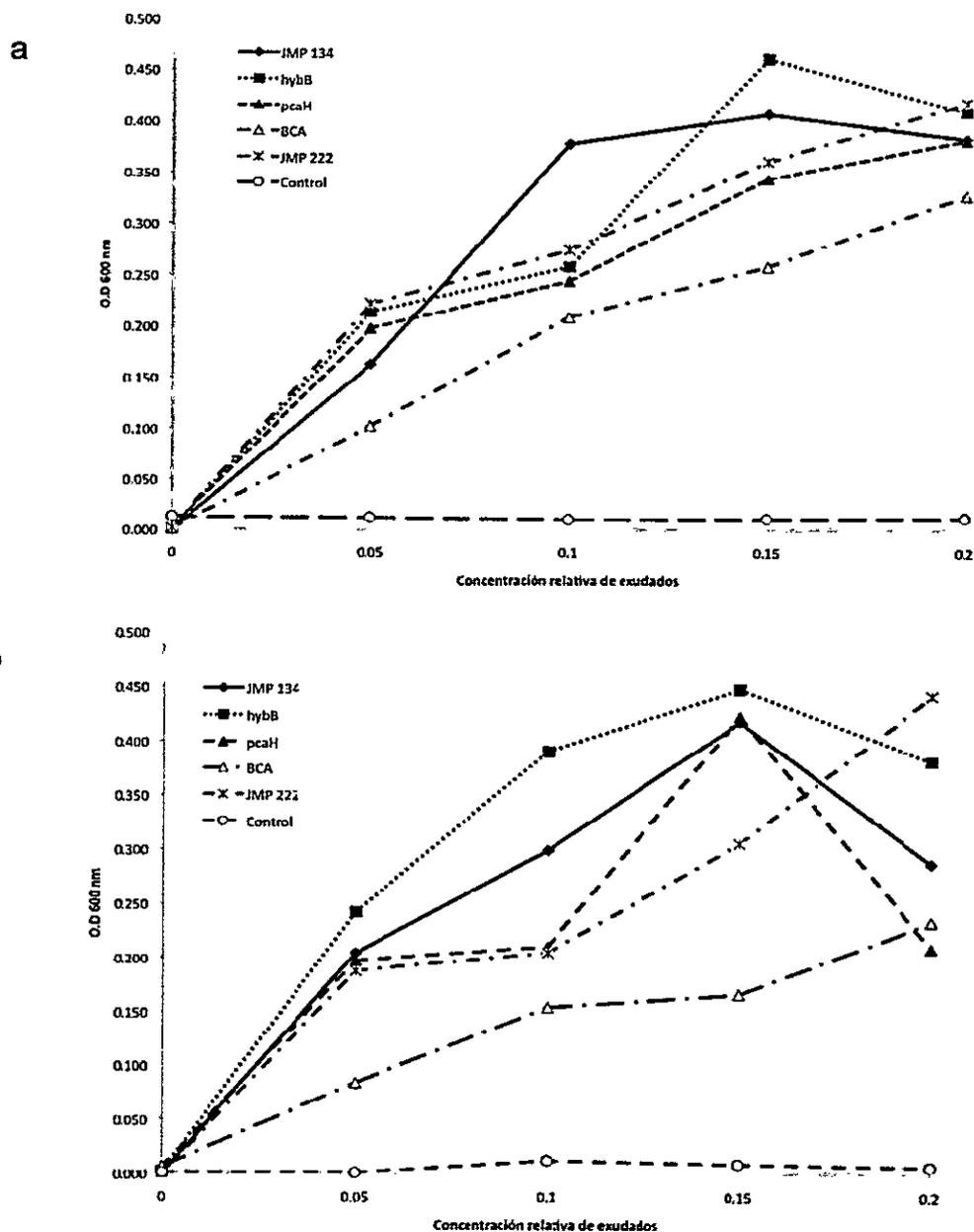


**Figura 8.** Crecimiento en 2-HB y 4-HB. (a) Crecimiento cepas JMP134 y JMP134ΔhybB en 2-HB. (b) Crecimiento cepas JMP134 y JMP134ΔpcaH en 4-HB. Las condiciones de los cultivos fue de 30°C con agitación continua durante 24 hrs. Las curvas son representativas de tres experimentos independientes. Desviación estándar menor al 5%.

Para poder establecer el papel del catabolismo de compuestos aromáticos en la utilización de exudados de plantas como fuente de carbono y energía, se comparó el crecimiento de la cepa JMP134 con las cepas mutantes *hybB* y *pcaH*. Debido a la redundancia génica que presentan ciertas funciones catabólicas en la vía del  $\beta$ -cetoadipato, también se comparó una triple mutante en una succinil CoA transferasa, JMP134-BCA, obtenida mediante la inactivación de los genes *pcaIJ*, *mmIFG* y *scoAB* (Ledger y cols, 2012). Esta cepa es completamente incapaz de crecer en 4-HB, entre otros compuestos (Ledger y cols, 2012). En esta parte del estudio también se comparó el crecimiento en la cepa JMP222, una derivada de JMP134 que no posee el megaplasmidio ni el plasmidio catabólico pJP4 (Don y cols, 1985).

La determinación de la utilización de exudados provenientes de las raíces de *A. thaliana* como única fuente de carbono, se efectuó en medio mínimo Dorn suplementado con diferentes proporciones de exudados recolectados como se señala en Métodos, sección 2.1.4. y 2.8.2, *in vitro*. Transcurridas 24 h, se observó que *C. pinatubonensis* JMP134 fue capaz de crecer en cada una de las proporciones de exudados probadas (Figura 9). Las mutantes simples JMP134 $\Delta$ *hybB*, JMP134 $\Delta$ *pcaH*, así como la cepa derivada JMP222, presentaron un crecimiento similar al de la cepa silvestre. La utilización de componentes de los exudados se comprueba por la tendencia lineal en la producción de biomasa a concentraciones crecientes de exudados (Figura 9). En contraste, al inactivar los genes que codifican para las tres versiones de la succinil-CoA transferasa, se pudo observar una reducción significativa en la biomasa producida, en todas las concentraciones de exudados, respecto a la cepa silvestre (Figura 9). La diferencia entre la biomasa producida en las diferentes concentraciones por la triple mutante en comparación con la cepa silvestre se ve

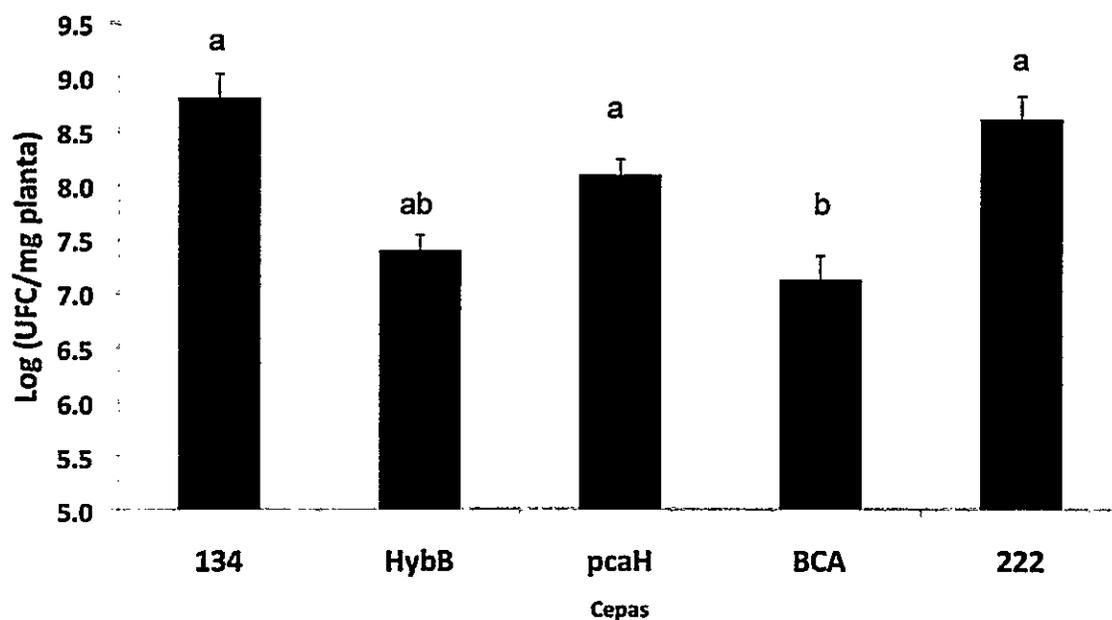
aumentada a las 48 h. Salvo la triple mutante y la variante genómica JMP222, todas las otras cepas mostraron un decrecimiento significativo de la biomasa a la mayor concentración de exudados (Figura 9), indicando un efecto diferencial de componentes inhibitorios, originalmente presentes en los exudados o producidos durante el crecimiento.



**Figura 9.** Curvas de rendimiento (producción de biomasa) de *C. pinatubonensis* JMP134 y sus mutantes catabólicas en diferentes diluciones de exudados de *A. thaliana*, a las 24 h (a) o 48 h (b) de cultivo. Medio mínimo salino fue suplementado con diferentes proporciones (0.05 a 0.2) de exudado proveniente de raíces de *A. thaliana*, los cuales fueron inoculados con las cepas: JMP134 (rombos negros), las mutantes simples: *hybB* (cuadrados negros) y *pcaH* (triángulos negros), la cepa triple mutante JMP134-BCA (triángulos blancos) y la cepa JMP222 (asteriscos), la cual no posee el plasmidio catabólico (pJP4) ni el megaplasmioma. Como control, la cepa JMP134 fue crecida con diferentes proporciones de medio mínimo suplementado con MS, que no tuvo contacto con plantas. La O.D.<sub>600nm</sub> fue registrada en fase estacionaria (24 o 48 h). Las curvas que se muestran son representativas de tres experimentos independientes. La desviación estándar fue menor al 5%.

2.-Evaluar la capacidad de las mutantes y de una variante genómica de la cepa JMP134 para colonizar la rizósfera de *A. thaliana*”.

Una interacción significativa entre *C. pinatubonensis* y *A. thaliana* requiere que la población bacteriana esté en contacto con la superficie de las raíces. Por ello se determinó si existían diferencias en la capacidad de colonización de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre en presencia de las raíces de las plantas, en un sistema de cultivo gnotobiotico. Luego de 3 semanas de incubación se midió las UFC/mg planta siendo los valores de  $8,8 \pm 0,2$  log UFC/mg planta para la cepa silvestre y  $8,6 \pm 0,2$  log UFC/mg planta para la variante JMP222. En el caso de las mutantes simples *pcaH* y *hybB*, los valores fueron  $8,1 \pm 0,2$  log UFC/mg planta y  $7,4 \pm 0,2$  log UFC/mg planta, respectivamente. En cuanto a la triple mutante JMP134-BCA, este valor fue de  $7,1 \pm 0,2$  log UFC/mg planta (Figura 10). Solo esta última cepa presentó una disminución significativa en la colonización rizosférica (ANOVA de una vía,  $F_{4,112}=7.19$  ; test de Tukey HSD  $p=0.000012$ ), respecto a la cepa silvestre.



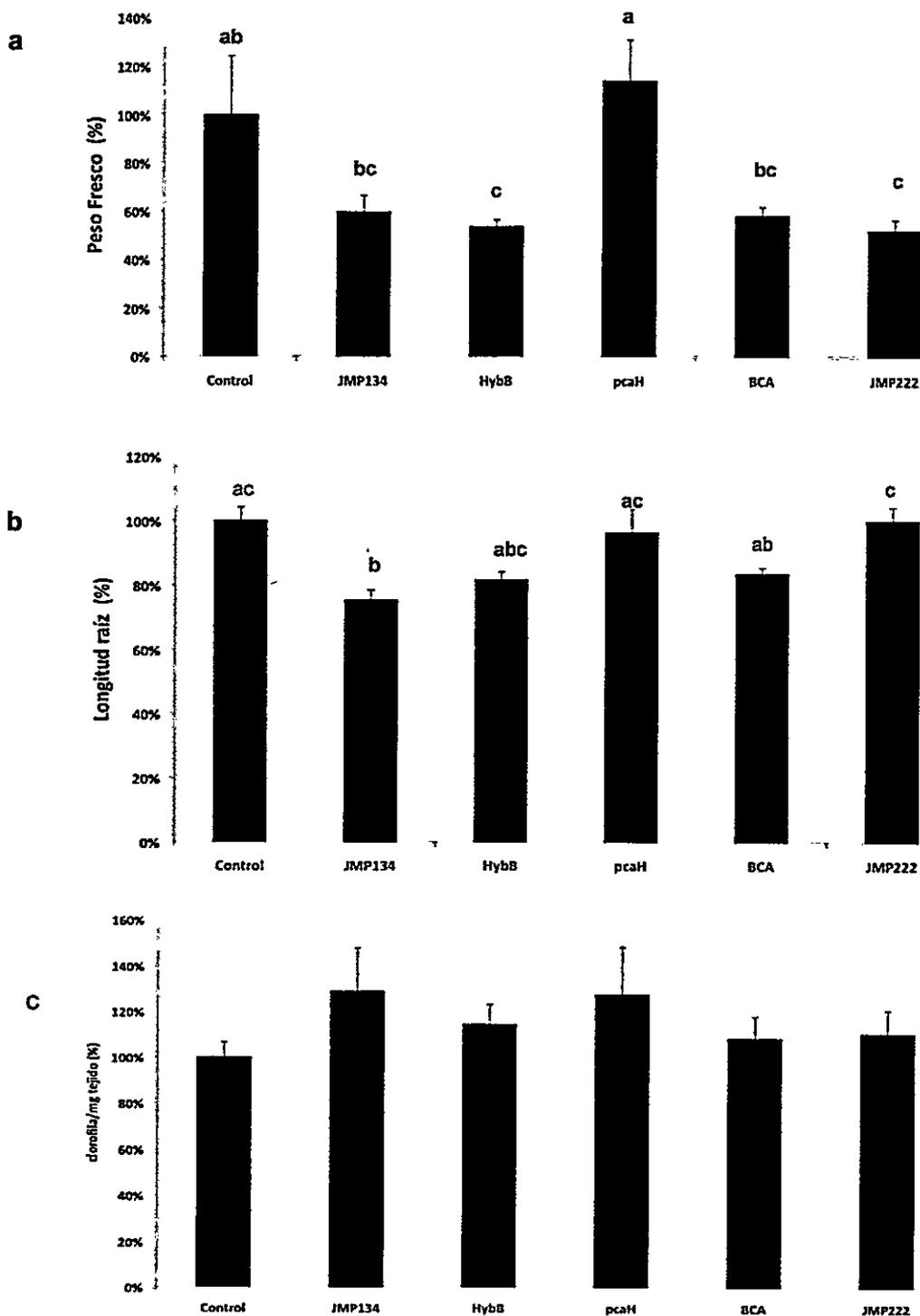
**Figura 10.** Colonización rizosférica *A. thaliana* por *C. pinatubonensis* JMP134 y cepas derivadas. Comparación de la capacidad de colonización de diferentes cepas con respecto a la cepa silvestre JMP134. Luego de 3 semanas de incubación se recuperó agar del medio gnotobiótico que estuvo en contacto directo con las plantas, a partir del cual se determinó las unidades formadoras de colonia (UFC/ml). Las letras a y b, señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA de una vía, test de Tukey HSD  $p < 0.05$ ).

### 3.- Efectos de la colonización de JMP134 y sus cepas mutantes en el crecimiento de *A. thaliana*

*C. pinatubonensis* JMP134 es capaz de colonizar tanto la rizósfera como la endorizósfera de *A. thaliana* (Ledger y cols,2012). Por ello, al menos en un cultivo gnotobiotico, la presencia de la cepa desde el periodo de germinación hasta un estadio adulto, puede generar cambios en el crecimiento y desarrollo. Estos cambios se pueden reflejar en parámetros tales como peso fresco, largo de raíz y cantidad de clorofila contenida en el tejido de las hojas de la planta.

Por eso, el último objetivo de este Seminario de Tesis fue estudiar el posible cambio en algunos parámetros de crecimiento de *A. thaliana* luego de 4 semanas de cultivo. Un total de 96 plantas por tratamiento fueron analizadas (3 réplicas con 32 plantas por cada tratamiento). Como se observa en la Figura 11a, la inoculación con la cepa JMP134 no afectó significativamente el peso fresco de las plantas de *A. thaliana* con respecto a las plantas no inoculadas (valor control: 55.1 mg en promedio) , aunque la tendencia observada pareciera sugerir una disminución de dicho parámetro en presencia de la bacteria. En cuanto a las derivadas de la cepa silvestre, se observó una disminución significativa del peso fresco en presencia de las cepas *hybB* y JMP222, con respecto a las plantas no inoculadas. En el caso de la cepa JMP134-BCA, ésta no presentó diferencias tanto con el tratamiento control, como con la cepa silvestre. En tanto la cepa mutante *pcaH* no produjo una disminución sobre el peso fresco de las plantas de *A. thaliana*, en comparación al tratamiento control, por el contrario, se observó una diferencia significativa (Figura 11a), respecto a las plantas que estuvieron en contacto con la cepa JMP134 y las derivadas *hybB*, JMP134-BCA y JMP222 (ANOVA de una vía,  $F_{6,307} = 6.78$ ; test de Tukey HSD  $p=0.00001$ ).

La longitud de la raíz primaria de *A. thaliana* fue otro parámetro que se midió para evaluar el efecto de la presencia de *C. pinatubonensis* JMP134 y sus cepas mutantes. En este caso, la cepa silvestre produjo una disminución significativa en el largo de la raíz primaria, respecto al control (10,9 cm en promedio) (Figura 11b). Esta cepa no solamente presentó una disminución significativa con respecto al control, si no también respecto a las cepas derivadas *pcaH* y JMP222. La inoculación con las otras cepas mostró algunas diferencias entre ellas, pero ninguna tendencia clara (ANOVA de una vía,  $F_{6, 307} = 7,08$ ; test de Tukey HSD  $p = 0.00001$ ). Finalmente, al determinar la cantidad de clorofila contenida en el tejido de *A. thaliana*, no se observó diferencia entre las inoculaciones con las distintas cepas, respecto al control no inoculado (valor control: 1.3 cl/mg de tejido, en promedio) (Figura 11c).



**Figura 11.** Efecto en el peso fresco, longitud de las raíces y contenido de clorofila en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *C. pinatubonensis* JMP134 y sus derivadas. (a) Peso fresco (b) Longitud de raíz. (c) Contenido de clorofila. Control: plantas de *A.thaliana* no inoculadas. Letras a, b y c, señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA de una vía, test de Tukey HSD  $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Poco se sabe hasta el día de hoy respecto a la interacción entre plantas con bacterias que aparentemente son capaces de colonizar la rizósfera o tejidos de la planta sin generar algún tipo de beneficio directo, como la promoción de crecimiento, o de producir enfermedades en la planta (fitopatógenos), bajo condiciones habituales de crecimiento. Esta aparente interacción de “comensalismo” por parte de estas bacterias, estaría dada por las condiciones ambientales en las cuales se encuentran. Es decir, frente a posibles factores de stress, la planta podría verse beneficiada por la presencia de dichos microorganismos. Cabe suponer que estas interacciones se iniciarían con el reconocimiento de ciertas moléculas liberadas por la planta, las cuales pueden ser desde quimioattractantes hasta fuentes de carbono para las bacterias (Lugtenberg y cols, 2009). A pesar que los exudados de las plantas contienen una proporción considerable de compuestos aromáticos, los que podrían ser asimilados por bacterias rizosféricas, muy poco se ha explorado respecto al posible papel de dichos compuestos aromáticos en establecer una interacción de la planta con microorganismos que son capaces de catabolizar dichos compuestos.

Por ello, en este Seminario de Título se emprendió el estudio de este tipo de fenómeno usando un sistema gnotobiótico compuesto de *A. thaliana* (una planta modelo) y la bacteria *C. pinatubonensis* (un modelo bacteriano de degradación de compuestos aromáticos). Los resultados de este trabajo señalan que la bacteria silvestre y las cepas derivadas ensayadas son capaces de colonizar rizosféricamente la planta, usar los exudados de la raíz y generar, en algunos casos, algún efecto en parámetros de crecimiento de la planta, revelando así que la neutralidad no necesariamente es tal (Figura 12).

Varias bacterias, como *C. pinatubonensis* JMP134, tienen alrededor del 5% del total de sus genes relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos. (Pérez-Pantoja y cols, 2011). Entre esos compuestos, un número significativo ha sido descrito como parte de la composición de exudados (Bertin y cols, 2003; Walker y cols, 2003; Bais y cols, 2004). Lo anterior lleva a sugerir que estas bacterias serían capaces de usar al menos parte de los componentes de los exudados como fuente de carbono y energía (lo que resultó corroborado por los resultados de este trabajo, Figura 9) y que, por ello, los exudados podrían inducir la expresión de genes del catabolismo de compuestos aromáticos. Resultados preliminares de PCR en tiempo real, obtenidos recientemente en el laboratorio donde se efectuó este trabajo, han mostrado que transcurridos 30 min de exposición a diferentes proporciones de exudados, se pudo apreciar un aumento significativo en los niveles de expresión de *pcaH* y una posible dependencia respecto a la cantidad de exudado usado (datos no mostrados). Lo anterior se sustenta con el aumento reportado de niveles de expresión del gen *pcaH* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, en presencia de exudados provenientes de *Beta vulgaris* (remolacha) (Mark y cols, 2005). Sin embargo, los niveles transcripcionales pueden resultar más complejos de analizar ya que un gen de la misma ruta en *C. pinatubonensis*, *pcaIJ*, no mostró cambios de expresión, lo que puede deberse a expresión constitutiva o a redundancia génica funcional (Pérez-Pantoja y cols, 2009; 2012; Ledger y cols, 2012), dada la complejidad de componentes de los exudados de plantas.

Por ello, que el gen *hybB*, el cual codifica para la subunidad mayor de una enzima multi componente denominada salicilato-5-hidroxilasa, no haya mostrado cambios en su expresión, medidos por PCR en tiempo real (datos no mostrados), no descarta la posibilidad que se exprese y sea funcional durante la interacción entre *C.*

*pinatubonensis* y *A. thaliana*, debido a que *A. thaliana* en presencia de la cepa mutante JMP134 $\Delta$ *hybB* presenta una disminución en el peso fresco (Figura 11a). El interés en este gen recae en que se ha descrito la presencia de metilsalicilato y ácido salicílico en exudados provenientes de las raíces de *A. thaliana* (Walker y cols, 2003). El análisis transcripcional global usando técnicas de secuenciación masiva puede arrojar interesantes resultados y forma parte del trabajo actual del laboratorio donde se efectuó este Seminario de Título.

En relación con la utilización misma de los exudados como única fuente de carbono y energía, solo la triple mutante JMP-BCA, mutante en un paso clave de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato, presentó una disminución considerable en la producción de biomasa, lo que no solo se observó en este trabajo con *A. thaliana*, si no también en *A. caven* (Ledger y cols, 2012). El marcado efecto de esta triple mutante podría deberse a que la succinilCoA transferasa no solo está involucrada en la degradación de compuestos aromáticos tales como p-cumarato, 4-HB, benzoato y otros (Pérez-Pantoja y cols, 2008), si no que también, dado que este podría ser un paso enzimático relevante para la canalización de succinato y otros ácidos orgánicos, en la metabolización de este tipo de ácidos que podrían estar presentes en los exudados provenientes de las raíces de *A. thaliana* (Figura 12). Es relevante destacar que *C. pinatubonensis* posee muy limitadas capacidades para degradar azúcares, ya que solo es capaz de degradar fructosa y glucanato (Lykidis y cols, 2010), lo que disminuye fuertemente las capacidades de esta bacteria para competir con otras bacterias, en la utilización de componentes del tipo carbohidrato presentes en los exudados. También es posible proponer que la triple mutante resulta menos eficiente en generar biomasa

al crecer en exudados, porque no puede metabolizar componentes inhibitorios presentes en los exudados, como se discute a continuación.

En especial a las 48 h de cultivo, se pudo apreciar una disminución en la generación de biomasa, en cultivos hechos a altas proporciones de exudados, con la cepa silvestre y las mutantes simples JMP134 $\Delta$ *hybB* y JMP134 $\Delta$ *pcaH*, lo que también ha sido observado con la cepa silvestre en *A. caven* (A. Zuñiga., datos no publicados). Este fenómeno podría relacionarse con la presencia en el exudado de compuestos que pueden generar toxicidad para las cepas y que se manifiesta más claramente a mayores concentraciones. Estos componentes tóxicos podrían estar presentes originalmente en el exudado o ser producidos por la propia metabolización bacteriana de componentes “pre-tóxicos” de los exudados (Figura 12). Dentro de los posibles compuestos tóxicos, se sabe que el aumento de la degradación de clorofenoles puede generar una intoxicación en la cepa debido a la acumulación de clorocatecoles, intermediarios altamente tóxicos ya que pueden producir daño oxidativo en membranas y proteínas (Ledger y cols, 2006). Otros ejemplos son: el benzoato, compuesto que se ha visto presente en exudados provenientes de plantas, cuyo catabolismo incompleto genera protoanemonina, compuesto con actividad antimicrobiana (Skyba y cols. 2002) y el PCA, compuesto que es intermediario de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato, cuya acumulación en concentraciones elevadas puede causar toxicidad a la bacteria (Perez-Pantoja y cols, 2008).

En este contexto, se observó dos comportamientos distintos a lo detectado en la cepa silvestre. En el caso de la mutante simple JMP134 $\Delta$ *hybB*, se determinó que a todas las concentraciones de exudados usadas, esta mutante generó más biomasa que la cepa silvestre (Figura 9). Esto podría explicarse porque esta mutante, al no

expresar la ruta del gentisato, dejará de metabolizar componentes "pretóxicos", y de este modo no producir intermediarios tóxicos que inhiban el crecimiento de la bacteria. Alternativamente, es posible concebir que esta cepa, al no poder metabolizar compuestos a través de la ruta del gentisato, deja disponible algunos de esos compuestos que pueden ser metabolizados por rutas más eficientes desde el punto de vista energético y de conversión en biomasa. El otro caso es el de la cepa JMP222, la que parece no verse afectada en su capacidad para crecer a concentraciones altas del exudado (Figura 9). Se puede especular que la carencia de varias rutas degradativas, impide o minimiza la capacidad para generar metabolitos tóxicos. Un ejemplo evidente viene dado por la carencia de la ruta de degradación de cloroaromáticos, conocida por la formación de compuestos tóxicos como clorofenoles y clorocatecoles (Pérez-Pantoja y cols, 2003, Ledger y cols, 2006).

El estudio de los niveles de colonización rizosférica no arrojó información sustantiva, ya que todas las variantes de la cepa JMP134 alcanzaron niveles poblacionales en el equilibrio, similares entre si (Figura 12). Entre ellas, la que mostró un menor valor fue la triple mutante, lo que podría explicarse por su menor capacidad relativa para usar componentes de los exudados. Tampoco parecen tener un efecto mayor los genes codificados en el megaplasmidio y el plasmidio (Pérez-Pantoja y cols, 2008; Lykidis y cols, 2010), ya que la cepa JMP22 no mostró diferencias en la colonización rizosférica de *A. thaliana*. Resultados obtenidos con experimentos similares hechos con la cepa JMP289, la que solo carece del plasmidio pJP4, apuntan al mismo fenómeno (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados señalan que la determinación de la capacidad rizosférica es una medida muy gruesa, como el crecimiento en los exudados, que no permite visualizar posibles efectos de los genes de rutas del catabolismo de compuestos aromáticos en la interacción planta-bacteria, al

menos en condiciones de cultivo gnotobiótico. En este contexto, experimentos de colonización rizosférica hechos en cultivos de *A. caven* creciendo en microcosmos de suelo, sí revelan diferencias en la sobrevivencia de algunos de estos mutantes, especialmente en ausencia de planta donde se ha observado un detrimento en la supervivencia de la bacterias a lo largo del tiempo (Ledger y cols, 2012).

Finalmente, el análisis del efecto de la presencia de la cepa JMP134 y sus variantes en algunos de los parámetros de crecimiento de la planta, mostró una leve tendencia detrimental, aunque no siempre estadísticamente significativa, en especial el peso fresco y la longitud del largo de la raíz principal (Figura 11). La excepción a esta tendencia fue la cepa mutante *pcaH*. Se podría especular que la incapacidad de esta cepa para metabolizar algunos precursores hidroxicinámicos de la biosíntesis de lignina, como el cumarato (Boerjan y cols, 2003; Pérez-Pantoja y cols, 2008), un componente clave de la pared celular, podría resultar beneficiosa para la planta y así compensar el leve efecto detrimental que muestran las otras variantes de la cepa, incluyendo la cepa silvestre (Figura 12).

Esta suerte de mecanismo “compensatorio” podría explicar también lo observado con la cepa JMP222, aunque esta vez solo en la longitud del largo de la raíz principal. Sin embargo, la naturaleza de la eventual causa de un mecanismo compensatorio es menos clara, dado el gran número (más de 700) de genes que esta variante no tiene, la gran mayoría de ellos de función desconocida (Pérez-Pantoja y cols, 2008; Lykidis y cols, 2010).

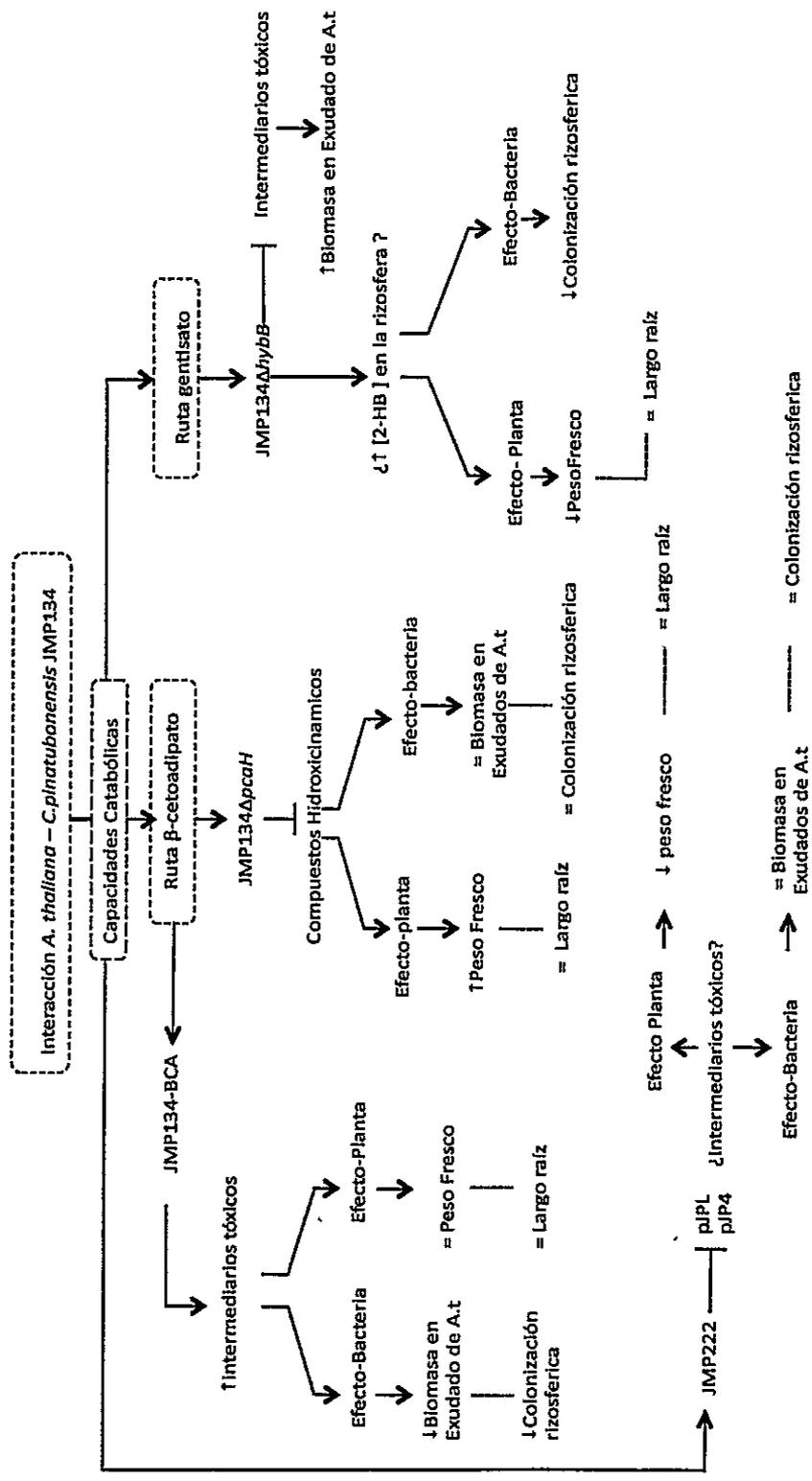


Figura 12. Resumen de los resultados de este trabajo sobre la interacción entre *A. thaliana* y *C. pinatubonensis* JMP134.

## PROYECCIONES

A partir de este trabajo se pueden plantear diferentes aristas a explorar en cuanto a la interacción planta- bacteria. El hecho de que bacterias comensales, no presumiblemente neutras, que bajo determinadas condiciones ambientales, podrían ser miembros relevantes en la comunidades rizosféricas, lo que requiere más estudios.

Por otro lado, el papel de la degradación de compuestos aromáticos en interacción microorganismo-planta puede ser más complejo que la mera utilización de estos compuestos como fuente de carbono y energía: "pretoxicos", detoxificación, desvíos metabólicos, regulación del nivel de señales moleculares de las plantas y de otras bacterias.

Por cierto, evaluar estos efectos en sistemas de mayor complejidad como serían microcosmos, planta-suelo. Así como considerar estudiar otras especies vegetales dentro de la interacción planta-bacteria. Finalmente estudiar si hay efectos en la interacción endófitica y epifítica.

## CONCLUSIONES

- La ruta de degradación de compuestos aromáticos a través del intermediario  $\beta$ -cetoadipato en *C. pinatubonensis* está implicada en el uso como fuente de carbono y energía del al menos una fracción de los componentes de los exudados provenientes de *A. thaliana*.
- Variaciones genéticas en las capacidades para degradar compuestos aromáticos en *C. pinatubonensis* tienen efectos menores en la capacidad de la bacteria para colonizar rizosféricamente a *A. thaliana*.
- En general, la colonización rizosférica de *C. pinatubonensis* JMP134 y sus derivados produce un leve detrimento en el crecimiento de *A. thaliana*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., Carrère, S., Cruveiller, S., Dossat, C., Lajus, A., Marchetti, M., Poinso, V., Rouy, Z., Servin, B., Saad, M., Schenowitz, C., Barve, V., Batut, J., Médigue, C., y Masson-Boivin, C. 2008. Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res.* **18**:1472-1483.
- Amann, R.L., Ludwig, W., y Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**:143-169.
- Bais, H., Park, S., Weir, T., Callaway, R., y Vivanco, J. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* **9**:26-32.
- Bais, H., Weir, T., Perry, L., Gilroy, S. y Vivanco, J. 2006. The role of roots exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* **57**:233-66.
- Bertin, C., Yang, X., y Weston, L.A. 2003. The role of roots exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil.* **256**:67-83.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519-546.
- Broeckling, C.D., Broz, A.K., Bergelson, J., Manter, D.K., y Vivanco, J. 2008. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol* **74**:738-744.
- Bullock, W., Fernández, J. y Short, J. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-379.
- Coenye, T. y Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**:719-729.
- Don, R.H., Weightman, A.J., Knackmuss, H.J., y Timmis, K.N. 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J Bacteriol.* **161**:85-90.
- Dorn, E., Hellwing, M., Reineke, W. y Knackmuss, H.J. 1974. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch Microbiol.* **99**:61-70.
- Fernández, O., Theocharis, A., Bordiec, S., Feil, R., Jacquens, L., Clément, C., Fontaine, F., y Barka, E.A. 2012. *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Mol Plant Microbe Interact.* **25**:496-504.
- Francis, I., Holsters, M., y Vereecke, D. 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environ Microbiol.* **12**:1-12.
- Fricke, W.F., Kusian, B., y Bowien, B., 2009. The genome organization of *Ralstonia eutropha* strain H16 and related species of the *Burkholderiaceae*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **16**:124-135.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., y Lilburn, T. 2005. Order I. *Burkholderiales* ord. nov. En Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., y Garrity, G.M. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, USA: Springer, p. 575.
- Govan, J.R., Hughes, J.E. y Vandamme, P. 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol.* **45**:395-407.

- Harrison, PW., Lower, RPJ., Kim, NKD., y Young, JPW. 2010. Introducing the bacterial "chromid": not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* **18**:141-148.
- Hartmann, A., Rothballer, M., y Schmid, M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil.* **312**:7-14.
- Harwood, CS., y Parales, RE. 1996. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol.* **50**:553-590.
- Hiltner, L., 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb DLG* **98**:59-78.
- Houlden, A., Timms-Wilson, TM., Day, MJ. y Bailey, MJ. 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol Ecol.* **65**:193-201.
- Ledger, T., Pieper, DH., y González, B. 2006. Chlorophenol hydroxylases encoded by plasmid pJP4 differentially contribute to chlorophenoxyacetic acid degradation. *Appl Environ Microbiol.* **72**:2783-2792.
- Ledger, T., Zúñiga, A., Kraiser, T., Dasencich, P., Donoso, R., Pérez-Pantoja, D., y González, B. 2012. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *Antonie van Leeuwenhoek.* **101**:713-723.
- Lefrancois, J., Samrakandi, M., y Sicard, A. 1998. Electrotransformation and natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*: requirement of DNA processing for recombination. *Microbiology.* **144**:3061-3068.
- Louie, TM, Webster, CM y Xun, L. 2002. Genetic and biochemical characterization of a 2,4,6-trichlorophenol degradation pathway in *Ralstonia eutropha* JMP134. *J Bacteriol.* **184**:3492-3500.
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* **63**:541-556.
- Lykidis, A., Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, IJ., Ivanova, NN., Hooper, SD., Lapidus, A., Lucas, S., González, B., y Kyrpides, NC. 2010. The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS ONE* **5**:e9729.
- Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., y Hikichi, Y. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**:1031-1038.
- Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., y Dowson, CG. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol.* **104**:1539-1551.
- Mark, GL., Dow, JM., Kiely, PD., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., Morrissey, J., y O'Gara, F. 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to roots exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**:17454-17459.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M, Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., y Hakenbeck, R. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **20**:3479-3483.
- Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Pieper, DH. y González, B. 2003. Efficient turnover of chlorocatechols is essential for growth of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) in 3-chlorobenzoic acid. *J Bacteriol* **185**:1534-1542.

- Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, DH., y González, B. 2008. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:736–794.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Sánchez, MA., y González, B., 2009. Genuine genetic redundancy in maleylacetate-reductase-encoding genes involved in degradation of haloaromatic compounds by *Cupriavidus necator* JMP134. *Microbiology.* **155**:3641–3651.
- Pérez-Pantoja, D., González, B., y Pieper, DH. 2010a. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. En Timmis, K.N. (ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 799–837.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Junca, H., González, B., y Pieper, DH. 2010b. Phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. En Timmis, K.N. (ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1355–1397.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Aguiló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, DH., y González, B. 2012. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environ Microbiol.* **14**:1091–1117.
- Poole, PS., Blyth, A., Reid, CJ., y Walters, K. 1994. *myo*-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology.* **140**:2787–2795.
- Porra, RJ., Thompson, WA. y Kriedemann, PE. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys.* **975**:384–394
- Pühler, A., Arlat, M., Becker, A., Göttfert, M., Morrissey, JP., y O’Gara, F. 2004. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions?. *Current Opinion Plant Biology.* **7**:137–147.
- Rozen, S y Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* **132**:365–386.
- Schenzle, A., Lenke, H., Fischer, P., Williams, PA, y Knackmuss, HJ. 1997. Catabolism of 3-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP 134. *Appl Environ Microbiol.* **63**:1421–1427
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, AV., Vandamme, P., Barka, EA., Salles, JF., Van Elsas, JD., Faure, D., Reiter, B., Glick, BR., Wang-Pruski, G. y Nowak, J. 2005. *Burkholderia phytoformans* sp. nov, a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**:1187–1192.
- Sköt, L., y Egsgaard, H. 1984. Identification of ononitol and O- methyl-*scyllo*-inositol in pea root nodules. *Planta.* **161**:32–36.
- Skyba, A., Hecht, V. y Pieper, D.H. 2002. Formation of protoanemonin from 2-chloro-*cis,cis*-muconate by the combined action of muconate cycloisomerase and muconolactone isomerase. *J Bacteriol.* **184**: 5402–5409.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., y Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence in tomato. *J Bacteriol.* **183**:3597–3605.
- Uren, NC. 2000. Types, amount, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. En R. Pinton, Z.Varanini and P. Nannipieri (eds). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil- plant interface.* pp 19–40. Marcel Dekker, New York.
- Van Elsas, JD., Kastelein, P., van Bekkum, P., van der Wolf, JM. y van Overbeek, LS. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the Causative Agent of Potato

Brown Rot, in Field and Microcosm Soils in Temperate Climates. *Phytopathology*. **90**:1358-1366.

Walker, TS., Bais, HP., Halligan, KM., Stermitz, FR. y Vivanco, JM. 2003. Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *J Agric Food Chem*. **51**:2548-2554.

Zhou, NY, Fuenmayor, SL y Williams, PA. 2001. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J Bacteriol*. **183**:700-708.

## PARTICIPACIONES

### CONGRESOS

LIV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile.

Participación sesión de paneles: Microbiología

"Papel de las rutas catabólicas de *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 en el catabolismo de exudados y colonización de *Arabidopsis thaliana*"

**Dasencich, P & González, B.**

Noviembre, 2011, Puerto Varas, Chile

4th Congress of European Microbiologists FEMS 2011

Poster sesión:

"The  $\beta$ -Ketoacid pathway of *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 plays a role in *Arabidopsis thaliana* root exudates catabolism and plant colonization".

**P.Dasencich, T.Ledger, A.Zuñiga, R.Donosó. B. González, Chile**

Junio 2011, Ginebra, Suiza.

### PUBLICACIONES

Ledger, T., Zúñiga, A., Kraiser, T., **Dasencich, P.**, Donoso, R., Pérez-Pantoja, D., y González, B. 2012. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *Antonie van Leeuwenhoek*. **101:713-723**