



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Facultad de Ciencias
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Botánica

Construcción y caracterización de una colección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo de canola (*Brassica napus* L.) y el efecto de su inoculación en cultivos *in vitro*.



**Enzo Agustín
Ferrari Fructos**

Orientadoras:
MSc. Cecilia Taulé
MSc. Cintia Mareque

Tribunal:
Dr. Raúl Platero
Dr. Gastón Azziz

*Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
(IIBCE-MEC)
Montevideo, Uruguay
2017*

DEDICATORIA

Este trabajo de final de carrera va dedicado a Cristina y Jorge, por darme la vida y enseñarme el amor y los misterios de las plantas.

“Hay que sembrar mucho. Toda semilla no germina, ni todo lo que germina florece, ni todo lo que florece da frutos, ni todo fruto madura, ni todo lo que madura es bueno...”

Sembremos con ordenado ritmo y sembremos como el viento. El viento siembra más allá de todos los surcos, más allá de toda tierra labrantía, más allá de todo regadío.

No siempre se sabe dónde cae la simiente, pero la tierra se pone verde...

Es el verde nuevo que amanece a la nueva luz del tiempo.

El entusiasmo es el viento de nuestras almas y siembra pródigamente todo lo que hay en ellas.”

Clemente Estable

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis orientadoras Cecilia y Cintia, quienes dedicaron mucho tiempo y energía para que este trabajo llegara a buen puerto. Por el apoyo constante en cada etapa, por su profesionalismo y dedicación a la construcción de conocimiento científico, por sus valiosas y puntillosas correcciones.

Además, agradecer especialmente a Federico Battistoni, quien me dio la oportunidad de participar del grupo de endófitos y siempre mantuvo su compromiso de apoyarme en esta etapa. Asimismo, agradezco compartir con él unas cuántas visiones del mundo, por lo cual me siento afortunado de haber contado con su acompañamiento.

A todos los compañeros de BIOGEM que directamente o indirectamente me acompañaron, y a pesar de ser una jungla muy diversa de universos paralelos, mantiene valores importantes y desarrolla investigaciones de gran relevancia, usualmente contra viento y marea.

A la ANII por su apoyo con la Beca de Iniciación a la Investigación. Al Ing. Agr. Oscar Alonso, de ALUR, por su invaluable apoyo en las colectas de las plantas de canola y su colaboración en las instancias iniciales del proyecto.

A los creadores de Mendeley, por convertir el tedioso universo de las citas bibliográficas en una labor más llevadera. Al botón “Deshacer” y el “Autoguardado” de Word, por evitarme unos cuántos infartos innecesarios.

A quienes no creen en el verso de que hay una única forma de hacer agricultura, y se mantienen fieles a su causa de alimentar al mundo desde una producción consciente. En especial a los Ingenieros Agrónomos Daniel Macías y Héctor Genta, por ser pioneros, inspirarme a creer en un futuro alimentario justo y posible, por su filantropía y su invaluable camino recorrido.

A la Educación Pública, de la que me considero doblemente hijo, por las oportunidades que me ofreció todos estos años y por los innumerables docentes, que me acompañaron desde mi infancia.

A mis hermanas Luciana y Camila, por el tiempo que vivimos juntos y a pesar de las asperezas de los años nos mantenemos unidos y compartimos el milagro de la vida.

A Cecilia de los Santos, una hermana con quien además de mesadas compartimos estos años muchos tablaos, renacimientos, viajes, aventuras, pasiones, tristezas, asuntos cósmicos y vinos.

A todos mis amigos de la infancia y adolescencia en Bella Unión y Salto, en especial a Gustavo, Rosmery, Michelle, Jenifer, Germán, Braian, el Vizconde Albano, Lady Victoria y sobre todo a Lady Almeida, quien ha sido mi gran cómplice en tantas

locuras que quedarán para la posteridad. A Marquitos, por su amistad inquebrantable y por la cantidad de recuerdos lindos.

A Gonzalo por haber sido mi compañero de vida muchos años y haberme regalado su afecto incondicional. A Ricardo, Carolina y Mariana con quien formamos nuestro loquísimo hogar chiapanguayo en la 2da Oriente, entre 7ma y 8va Norte.

A todos mis hermanos mexicanos, que a pesar de los golpes siguen latiendo y confiando en un México bello, justo y en paz. Porque me regalaron su amistad incondicional y experiencias que seguiré atesorando por siempre. A mis amigos chiapanecos Luis, Myrna, Gustavo, Yani, Gabriela, Ulises, Pancho, Marisa, Omar. A Wil y Beto, por iluminar mi camino de formas inexplicables. A Damián, por cada segundo y por acompañarme a renacer y mirar el mundo de nuevas formas. A Olivia, Miguel Ángel, Asunción y René, mi abrazo hasta la sierra mazateca. A mis amigazos chilangos Alethia, Humberto, Orlando y mis chilangas milangas Shahin, Anafrida, Ale y Gaby Ale, con quienes no perdemos la oportunidad de redescubrir el mundo y apostar a una construcción colectiva, consciente y respetuosa de las distintas formas de conocimiento. Un especial agradecimiento también a la familia Morales Valdelamar, con quienes nos unen tantas bellas coincidencias. Y a todos los colegas y amigos de la ReSiFEE y la AEM, con quienes hemos compartido experiencias muy significativas.

¡A mis amigazos yoruguas que tanto me acompañaron en esta hermosa etapa universitaria! En especial a mis compas de generación, a los amigos y compañeros del C-100, con quienes compartimos muchas reivindicaciones y visiones de cómo construir una mejor Universidad y Facultad. Y sobre todo a la barra de hermanos de “Ivatí” y la banda de “La Humedal”, con quienes las distancias y las fronteras del conocimiento, la aventura y la gozadera no tienen límites. También a Gregorio, JuanK, Carla, Andrés, la flaca María, Dada y la banda camaleónica, Dayana y los zambleros y otros tantos amigos con quienes compartimos charlas, arte, vinos, música, expediciones, etc.

A todos los compañeros de la ONG GruPAmA, por su incansable labor orientada a la conservación, por ser un faro en el extremo norte del paísito y por su apoyo constante en mis nuevos pasos profesionales. Asimismo, mi agradecimiento al grupo gestor de la Microcuenca Santa Rosa (Cultivando Agua Buena) por confiar en mis ideas y por dejar el plano de la discusión y pasar a la acción.

A todos los héroes anónimos que confían en un mundo más justo y consciente.

A mis pagos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Diversificación de la matriz energética nacional	3
1.2 Biodiesel: generalidades y contexto global.....	4
1.3 Producción de biodiesel en Uruguay	5
1.4 La colza o canola: Descripción y orígenes	6
1.5 El cultivo de canola	7
1.6 Bacterias endófitas.....	9
1.7 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)	12
1.8 Mecanismos de Promoción del Crecimiento Vegetal (MPCV)	13
1.8.1 Producción de ácido indol acético (AIA).....	13
1.8.2 Solubilización de fosfatos.....	15
1.8.3 Producción de sideróforos.....	16
1.8.4 Solubilización de potasio.....	17
1.8.5 Fijación biológica de Nitrógeno (FBN).....	17
ANTECEDENTES DEL GRUPO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Construcción de la Colección de Probables Endófitos Bacterianos (PEB) nativos	25
3.1.1 Estrategia General	25
3.1.2 Sitios de muestreo	25
3.1.3 Esterilización de la superficie y macerado.....	26
3.1.4 Recuento y aislamiento de PEB	28
3.1.5 Extracción de ADN.....	29
3.2 Búsqueda de características PCV <i>in vitro</i> en la colección de aislamientos.....	30

3.2.1 Detección de aislamientos con capacidad de solubilizar fosfatos	30
3.2.2 Detección de aislamientos con capacidad de producir sideróforos	30
3.2.3 Detección de aislamientos con capacidad de solubilizar potasio	31
3.2.4 Detección de aislamientos productores de AIA	31
3.2.5 Detección de posibles aislamientos diazótrofos de la colección	32
3.3 Identificación de aislamientos de interés	33
3.3.1 Amplificación por PCR del gen <i>ARNr 16S</i>	33
3.3.2 Secuenciación, edición y empalme de amplicones <i>ARNr 16S</i>	34
3.3.3 Identificación de los aislamientos por comparación con bases de datos	34
3.4 Ensayo de respuesta de plantas de canola a la inoculación con PEB en condiciones gnotobióticas	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Construcción de una colección de PEB nativos	37
4.2 Búsqueda de características PCV	38
4.3 Identificación de aislamientos de interés	42
4.4 Ensayo de respuesta de plantas de canola a la inoculación con PEB en condiciones gnotobióticas	45
5. DISCUSIÓN	49
5.1 PEB nativos asociados a variedades de canola cultivadas en Uruguay	49
5.2 Características PCV de la colección de aislamientos obtenida	51
5.3 Identificación de aislamientos de la colección	53
5.4 PCV de plantas de canola inoculadas con PEB	54
5.5 Conclusiones	56
6. PERSPECTIVAS	59
ANEXO 1	61
ANEXO 2	62
BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Características morfológicas de la colza (<i>Brassica napus</i>)	6
Figura 1.2. Tipos de endófitos bacterianos y sus procesos de colonización de la planta	11
Figura 3.1. Ubicación geográfica de los sitios muestreados de Soriano y Río Negro desde una altura de 955km	25
Figura 3.2. Esquema de la estrategia empleada para el aislamiento de los PEB y obtención de la colección.....	26
Figura 4.1. Ensayos de caracterización funcional de la colección	39
Figura 4.2. Número y porcentaje de aislamientos que mostraron MPCV <i>in vitro</i>	40
Figura 4.3. Cantidad y porcentajes de aislamientos con distintas características PCV	41
Figura 4.4. Vista del ensayo de inoculación de plantas de canola con aislamientos PEB en condiciones gnotobióticas	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Número de aislamientos obtenidos a partir de los diferentes medios de cultivo y condiciones de crecimiento, según órgano y sitio de muestreo	37
Tabla 4.2. Recuento de PEB cultivables de los cultivares Trapper e Igranola103.....	38
Tabla 4.3. Características PCV de los aislamientos <i>nifH+</i> , detallando órgano de procedencia, sitio de muestreo, medio de cultivo y condición de aislamiento	41
Tabla 4.4. Identificación de aislamientos a nivel de Filo, Familia y género, asignados utilizando la herramienta “RDP Classifier”	44
Tabla 4.5. Secuencias del gen ARNr 16s obtenidas de la base de datos de RDP identificado mediante la herramienta “Seq Match”	45
Tabla 4.6. Características PCV de los aislamientos utilizados en el ensayo de inoculación de plantas de canola del cv. Igranola103	46
Tabla 4.7. Medias de las variables biométricas de plantas de canola inoculadas con aislamientos de PEB seleccionados	47

ABREVIATURAS

AIA – Ácido Indol Acético

ARA – Ensayo de Reducción de Acetileno

BPCV – Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

FBN – Fijación Biológica de Nitrógeno

GEI – Gases de Efecto Invernadero

MPCV – Mecanismos Promotores del Crecimiento Vegetal

PCV – Promoción del Crecimiento Vegetal

PEB – Probables Endófitos Bacterianos

RESUMEN

En Uruguay, el interés creciente por el uso de energías renovables impulsó el desarrollo de políticas públicas que incentivan la producción de biocombustibles, fundamentalmente bioetanol y biodiesel, para su mezcla con naftas y gasoil, respectivamente. El biodiesel se produce a partir de fuentes animales (ej: sebo vacuno) y vegetales, siendo esta última la más común, utilizando principalmente soja y colza (canola). La canola (*Brassica napus* L.) es una opción de cultivo invernal atractiva por sus virtudes en la rotación de cultivos y su alto rendimiento. El área de cultivo a nivel nacional se ha ido incrementando, alcanzando las 15.551 ha en el 2016. Los cultivares (cv.) más comúnmente sembrados en 2016 fueron Rivette, Igranola103 y Trapper. Por otro lado, la cadena de producción de biodiesel presenta grandes costos económicos asociados a la fase agrícola, debido al suministro de semillas, herbicidas, insecticidas y fertilizantes empleados en el cultivo. En particular, el uso de fertilizantes químicos es en muchas ocasiones excesivo, trayendo como consecuencia la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Además, el uso indiscriminado de agroquímicos puede tener efectos negativos que incluyen la degradación del suelo y la pérdida de biodiversidad. Por esta razón, surge como alternativa a la fertilización química el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). Estas pueden establecer interacciones con las plantas, con diversos grados de asociación, ofreciendo ventajas a su desarrollo, mediante diversos mecanismos. Estos incluyen la biodisponibilización de nutrientes, la producción de fitohormonas y la resistencia a agentes de estrés biótico y abiótico. Dentro de estas BPCV, se resalta la importancia de conocer las comunidades de endófitos, es decir, bacterias que colonizan los órganos o tejidos internos de las plantas huéspedes, sin producir síntomas de enfermedad.

El objetivo general del presente trabajo fue obtener aislamientos de probables endófitos bacterianos (PEB) nativos asociados a cultivares (cv.) de canola de interés para ALUR S.A., con características de promoción del crecimiento vegetal (PCV). Para

esto se construyó una colección de 333 PEB asociados a los cultivares de canola Trapper e Igranola103, provenientes de sitios de Río Negro y Soriano, respectivamente. Dicha colección fue caracterizada funcionalmente buscando características PCV *in vitro*. Posteriormente se identificaron 8 de 10 aislamientos seleccionados, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Pantoea*. Dichos aislamientos fueron ensayados como inoculantes en semillas de canola del cultivar Igranola103 para evaluar su capacidad PCV *in vivo*. Los resultados mostraron que los aislamientos *Pseudomonas sp.* UYBN151 y *Arthrobacter sp.* UYBN204 promovieron el crecimiento de plantas de canola en las condiciones evaluadas. Varios aislamientos pertenecientes a estos géneros han sido reportados como endófitos y BPCV en diferentes especies de plantas, en especial en el caso de *Pseudomonas*.

El presente trabajo es la primera contribución a nivel nacional de búsqueda de BPCV asociadas a canola. El potencial biotecnológico de la colección obtenida puede permitir el desarrollo a mediano y largo plazo de formulaciones de inoculantes bacterianos que permitan mejorar la sustentabilidad de este cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diversificación de la matriz energética nacional

Debido a la creciente preocupación por los efectos a escala global del uso de combustibles fósiles convencionales (mayoritariamente petróleo, carbón y gas natural), que constituyen fuentes no renovables de energía, en las últimas décadas ha crecido el interés por el uso de fuentes de energía alternativas y renovables. En este contexto, la producción de biocombustibles, tales como bioetanol, biogás y biodiesel, surge como una opción factible para la diversificación de la matriz energética (Pousa et al. 2007; Garcez & Vianna 2009).

En Uruguay, a raíz de la promulgación en el año 2007 de la Ley de Agrocombustibles (Ley N° 18.195), existe un marco legal para fomentar la producción de biocombustibles con materias primas nacionales y renovables. La ley faculta a la empresa Alcoholes del Uruguay S.A. (ALUR) a ser la productora y proveedora de la Administración Nacional de Combustibles, Alcohol y Portland (ANCAP) de bioetanol y biodiesel, para la obtención de mezclas con naftas y gasoil, respectivamente. En ella se establece una proporción obligatoria mínima de 5% de biocombustibles en las mezclas antes mencionadas. De acuerdo con reportes de prensa de la empresa ALUR, en 2015 la proporción de biocombustibles fue de aproximadamente 10% para la mezcla bioetanol-nafta y de 7% para la mezcla biodiesel-gasoil (<http://www.elobservador.com.uy/costo-biocombustible-cayo-20-y-mantendra-tendencia-este-ano-n895125>).

1.2. Biodiesel: generalidades y contexto global

El biodiesel se produce al combinar los triglicéridos de la materia grasa (aceite de origen vegetal o sebo vacuno) con un alcohol liviano, típicamente metanol, mediante una reacción de transesterificación. El término «biodiesel» fue acuñado inicialmente por Charles Chavanne, quien desarrolló, describió y patentó la reacción química antes mencionada (Chavanne 1937; Chavanne 1943).

Si bien es posible utilizar fuentes tanto animales como vegetales, los cultivos oleaginosos son el pilar fundamental de la cadena productiva. Se reconocen alrededor de 350 especies aptas para la producción de biodiesel, a partir de aceites comestibles y no comestibles (Zapata et al. 2012). Los países productores de biodiesel optan por diferentes opciones de cultivo de acuerdo con sus condiciones climáticas, edáficas, disponibilidad de semillas y variables económicas. Por ejemplo, la colza o canola (*Bassica napus*) es la fuente principal de biodiesel en Europa, mientras que la soja es la fuente más común en Estados Unidos, Argentina y Brasil. Por otra parte, Malasia e Indonesia producen biodiesel fundamentalmente a partir de aceite de palma (Mahmudul et al. 2017). La elección del cultivo oleaginoso apropiado resulta crucial, teniendo en cuenta que solamente la producción de las materias primas insume alrededor de un 75% del costo total de producción del biodiesel (Lin et al. 2011).

A su vez, quienes promueven la producción de biodiesel señalan sus ventajas frente a los combustibles fósiles en cuanto a un mejor balance global en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). A diferencia de los combustibles fósiles, que liberan dióxido de carbono (CO₂) resguardado durante

millones de años bajo la superficie terrestre, el biodiesel producido a partir de biomasa presenta diferencias en cuanto a la estabilidad de los ciclos del carbono, ya que su combustión sólo devuelve a la atmósfera el mismo dióxido de carbono absorbido desde el aire por los cultivos a través de la fotosíntesis (Lin et al. 2011). Si bien las diversas etapas de producción del biodiesel requieren el aporte de energía derivada de combustibles fósiles, se considera que el biodiesel producido a partir de soja ocasiona en promedio una reducción del 57% de emisiones de GEI comparado con el diesel derivado del petróleo, mientras que el biodiesel producido a partir de desechos grasos ocasionaría una reducción del 86% (U.S. EPA 2010).

1.3. Producción de biodiesel en Uruguay

Actualmente ALUR cuenta con dos complejos agroindustriales ubicados en Capurro y Paso de la Arena (Montevideo), con una capacidad instalada que permite una producción anual de aproximadamente 80 millones de litros de biodiesel (<http://www.alur.com.uy/agroindustrias/>). Además de biodiesel, se producen: harinas proteicas para alimentos animales como subproducto de la extracción de aceite, oleína como subproducto de la refinación y glicerina como subproducto de la etapa final de obtención de biodiesel (transesterificación).

La producción de biodiesel en Uruguay se realiza a partir de materias primas de origen vegetal: soja y canola; y de origen animal, utilizando sebo vacuno; o mediante el reciclado de aceite de cocina usado para fritura.

1.4. La colza o canola: Descripción y orígenes



Figura 1.1. Características morfológicas de la canola (*Brassica napus*). Fuente: Masclef (1891). Imagen de dominio público tomada de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:28 Brassica napus L.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:28_Brassica_napus_L.jpg).

La colza (*Brassica napus* L.) o canola (por su acrónimo en inglés “Canadian Oil Low Acid”) se utiliza en varias regiones a nivel mundial para la producción de forrajes, aceite comestible y biodiesel. Dichos términos son intercambiables, aunque recientemente se ha vuelto más popular el nombre «canola», que originalmente hace referencia a variedades cultivadas o cultivares (cv.) específicos, bajos en ácido erúxico. Si este compuesto, tóxico

para el ser humano, está en proporciones lo suficientemente bajas, es posible su uso comestible, aunque a lo largo de la historia han habido casos documentados de intoxicación (Bozcali et al. 2009). La especie pertenece a la familia de las crucíferas (Cruciferae/Brassicaceae), al igual que las coles y la mostaza. La canola tiene follaje de color verde azulado oscuro, con hojas glaucas, blandas y de lámina dividida. El patrón de ramificación es variable, con ramas usualmente originadas en las axilas de las hojas más altas, las cuales rematan en inflorescencias. Las inflorescencias son racimos elongados de 20-60 flores tetrámeras, de pétalos amarillos, con pedicelos de 12-18mm al momento de la apertura de la flor (antesis). El fruto es una silícuca bilocular de 60-100 x 2,5-

4 mm, típicamente con 12-18 semillas por lóculo (Castroviejo et al. 1993) (Fig. 1.1).

Existen dos tipos principales de colzas, las oleaginosas (ej: canola) y las productoras de raíces tuberosas (ej: nabo sueco). Las colzas oleaginosas incluyen variedades o cv. adecuados a distintos momentos de siembra. Si bien existen registros en sánscrito que datan el uso de la colza hacia el 2000 A.C. en la India, se cree que su domesticación en Europa ocurrió a partir de la Edad Media temprana, con plantaciones comerciales establecidas en los Países Bajos a partir del siglo XVI. En ese entonces el aceite de colza era utilizado fundamentalmente como aceite para lámparas. A partir de la Segunda Guerra Mundial se incrementó drásticamente su cultivo a nivel global (Plant Biosafety Office 1994).

1.5. El cultivo de canola

En Uruguay, la canola es una opción de cultivo invernal atractiva para los productores, por sus virtudes en la rotación, tanto por liberar el suelo anticipadamente para el siguiente cultivo de verano (típicamente soja), como por cortar el ciclo de enfermedades de los cereales de invierno (Vera et al. 2014). El área del cultivo se ha ido incrementando desde 2.933 ha en el año 2010 hasta 15.551 ha en el año 2016, siendo en el año 2015 el récord de área sembrada, con 30.436 ha. Según ALUR el rendimiento promedio del cultivo fue de 1,6 toneladas de grano por ha en 2016. Los cultivares de canola más sembrados en la zafra 2016 fueron: Rivette (57%), Igranola103 (34%) y Trapper (6,5%) (Corcoll, com. pers.).

Partiendo de reportes agronómicos del estado de Minas Gerais, Brasil, Silva et al. (2017) analizaron los costos energéticos asociados a las distintas etapas de producción de biodiesel a partir de canola. Se estimó que el 63% de la energía empleada en la producción corresponde a la fase agrícola, mientras que el 37% restante a la fase industrial (extracción, refinamiento y transesterificación). El mayor costo energético, aproximadamente 25% del proceso, corresponde a los insumos agrícolas como las semillas, herbicidas, insecticidas y fertilizantes empleados en el cultivo. Especialmente el 19% aproximadamente se utiliza para suplir los requerimientos de nitrógeno, fósforo y potasio mediante fertilizantes químicos (Silva et al. 2017). Dado que el óptimo desarrollo de las plantas se encuentra limitado por la escasez de estos nutrientes en el suelo (Masclaux-Daubresse et al. 2010), los fertilizantes químicos son en muchos casos utilizados en exceso. Además de la limitada capacidad de las plantas de absorber los fertilizantes suministrados, la lixiviación de éstos trae como consecuencia la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, provocando riesgos a la salud humana y problemas de eutrofización. Otros efectos negativos asociados al uso indiscriminado de químicos en la agricultura incluyen la degradación del suelo y pérdida de biodiversidad (Ramos 1996). Asimismo, estos insumos son en su mayoría importados, aumentando el grado de dependencia tecnológica de nuestro país e incrementando los costos de producción.

A partir de esta problemática se plantea la necesidad de aportar conocimientos al desarrollo e implementación de tecnologías alternativas, las cuales pueden estar basadas en el uso de recursos genéticos de nuestro país tendiendo a sistemas de producción más sustentables. Una alternativa a la fertilización química es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento

vegetal (BPCV). Estas bacterias pueden estar asociadas a las plantas viviendo en la rizósfera (porción de suelo más inmediata a las raíces vivas y fuertemente influenciada por éstas) o en su interior, en cuyo caso se denominan endófitas.

1.6. Bacterias endófitas

Un caso particular de asociación planta-bacteria es el de los endófitos bacterianos, definidos como bacterias que colonizan los órganos o tejidos internos de las plantas huéspedes. Lo hacen en gran número, sin causar daños a éstas ni desarrollar síntomas de enfermedad, e incluso favoreciendo el crecimiento y salud de la planta (Schulz & Boyle 2006). La composición de endófitos en una planta es variable y depende de muchos factores, entre los que el genotipo del cultivar juega un rol estructurante de la comunidad, así como el estado nutricional del suelo y los compuestos que son exudados por las plantas (Malfanova et al. 2013).

Cuando estamos frente a probables endófitos bacterianos (PEB), aislados a partir de tejidos vegetales esterilizados en su superficie, se debe corroborar el estilo de vida endófito de los aislamientos mediante técnicas de microscopía. Por lo tanto, la confirmación como endófitos verdaderos requiere de la identificación de las bacterias mediante técnicas como la hibridación inmunológica *in situ*, o a través de marcaje con genes reporteros. De esta forma un probable endófito puede ser confirmado como tal (Reinhold-Hurek & Hurek 1998). Se debe verificar, a su vez, que la bacteria aislada cumpla al menos tres de los cuatro postulados de Koch, siendo capaz de infectar a la planta hospedera y persistir en ella (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

Los endófitos bacterianos pueden ser clasificados de acuerdo con sus estrategias de vida. En este sentido, existen endófitos «obligados» o «facultativos». Los primeros son estrictamente dependientes de la planta hospedera, tanto en crecimiento como en supervivencia, y su transmisión hacia otras plantas ocurre de forma vertical o mediante vectores. En cambio, los últimos tienen un estadio de su ciclo de vida en el que existen fuera de la planta hospedera, alternando entre la vida en el interior de la planta y fuera de ella (típicamente en el suelo) (Hardoim et al. 2008). Estos últimos están presentes en el suelo e infectan la planta hospedera ingresando, por ejemplo, a través de fisuras que se producen por la emergencia de las raíces laterales y luego se diseminan a los espacios intercelulares de la raíz (Chi et al. 2005).

Considerando la forma en que los endófitos ingresan a la planta, éstos se pueden clasificar como fortuitos (o “pasajeros”), oportunistas y competentes (Hardoim et al. 2008). La Figura 1.2 resume los tipos de endófitos bacterianos existentes y sus mecanismos de colonización de la planta. Se considera que la principal vía de entrada al interior de la planta son las fisuras presentes en la superficie de la raíz. El ingreso a la planta también puede producirse a través de heridas causadas por microorganismos o nemátodos fitopatógenos, o por los estomas, presentes en mayor número en la epidermis foliar (McCully 2001).

En suma, la presencia de un conjunto particular de bacterias endófitas en una planta, es el resultado de: i) procesos estocásticos determinados por la probabilidad de que las raíces en desarrollo entren en contacto con una cantidad adecuada de bacterias, ii) factores determinísticos tales como la presencia de genes y sistemas de regulación génica que permiten el diálogo molecular

bacteria-planta específico y iii) factores de colonización endofítica activos (Hardoim et al. 2008).

A diferencia de los endosimbiontes, los endófitos no habitan dentro de

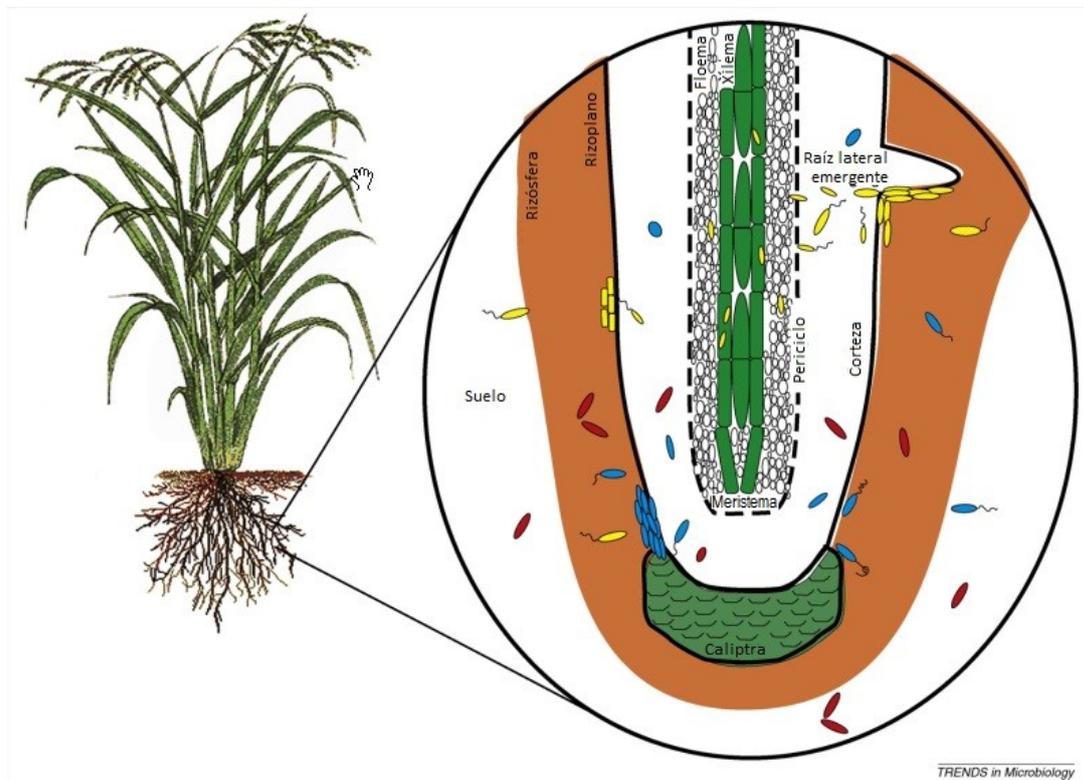


Figura 1.2. Tipos de endófitos bacterianos y sus procesos de colonización de la planta. Las bacterias del suelo que pueden ingresar de forma pasiva producto del azar (ej: a través de heridas) se denominan “pasajeras” o fortuitas (células rojas), generalmente restringidas al tejido cortical de la raíz. Los endófitos oportunistas (células azules) presentan características que sirven a la colonización radicular (ej: respuesta quimiotáctica), colonizan el rizoplano y luego invaden los tejidos vegetales a través de fisuras en la zona de emergencia de las raíces laterales o en las zonas de meristemas activos de la raíz. Los endófitos competentes (células amarillas) poseen las propiedades de los endófitos oportunistas; además están muy bien adaptados al ambiente interno de la planta. Son capaces de invadir tejidos vegetales específicos, (ej: cilindro vascular), diseminándose por la planta. Modificado de Hardoim et al. (2008).

células vivas de sus huéspedes ni desarrollan estructuras especializadas, colonizan los espacios intercelulares y pueden diseminarse de forma sistemática por los diferentes órganos de la planta. Diversos estudios han demostrado el efecto benéfico del uso de este tipo de bacterias en cultivos de interés agrícola (Ryan et al. 2008; Compant et al. 2010). Estas experiencias resaltan la

importancia del estudio de las BPCV nativas asociadas a cultivos estratégicos de interés nacional. A partir de cultivares de plantas de interés agronómico que sean capaces de desarrollar interacciones positivas con endófitos, es posible aumentar la productividad vegetal. Esto sucede cuando se establecen grandes poblaciones en la rizósfera, aunque puede haber efectos tanto a nivel del suelo como de la fisiología interna de la planta. En el primer caso, por ejemplo, ocurre mediante la modificación de los ciclos de nutrientes. En el segundo caso, por ejemplo, se da por cambios a nivel de la producción o regulación de las hormonas vegetales (Mei & Flinn 2010).

1.7. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)

El crecimiento vegetal requiere de la actividad sinérgica de diversas formas de vida en un ambiente de gran complejidad. Si bien existe una percepción común de que las interacciones entre microorganismos y plantas causan con frecuencia enfermedades a éstas, los microorganismos patógenos representan sólo una pequeña fracción de las comunidades microbianas asociadas a las plantas (Mei & Flinn 2010). Las plantas y los microorganismos han coevolucionado desarrollando diferentes tipos de interacciones, las cuales abarcan las antagónicas, las neutras y las sinérgicas. Dentro de estas últimas existen distintos grados de asociación, tales como las interacciones a nivel de la rizósfera, con bacterias endófitas o la más estudiada interacción endosimbiótica rizobio-leguminosa (Masson-Boivin et al. 2009). Como resultado de las interacciones sinérgicas, los microorganismos pueden ofrecer ventajas al desarrollo de las plantas, promoviendo su crecimiento (Lugtenberg et al. 2013).

1.8. Mecanismos de Promoción del Crecimiento Vegetal (MPCV)

La promoción del crecimiento vegetal (PCV) por bacterias puede darse de forma directa cuando estas benefician aspectos nutricionales u hormonales de las plantas o indirecta cuando les confieren mayor resistencia a agentes de estrés biótico o abiótico (Lugtenberg & Kamilova 2009). Algunos de los mecanismos de PCV directos incluyen: 1) la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas), 2) la síntesis de enzimas reguladoras de hormonas del crecimiento en la planta, como la 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa) y 3) la disponibilización de nutrientes mediante la fijación biológica del nitrógeno (FBN), o la solubilización de minerales poco biodisponibles (ej. P, Fe, K). En el caso de la promoción indirecta, los mecanismos conocidos incluyen: 1) el aumento en la tolerancia a agentes de estrés abiótico, tales como sequía, temperaturas extremas, estrés salino o contaminantes y 2) la protección contra parásitos, insectos u otros fitopatógenos (control biológico) (Bhattacharjee et al. 2008; Spaepen & Vanderleyden 2014; Mei & Flinn 2010).

1.8.1. Producción de ácido indolacético (AIA)

El ácido indol acético (AIA) es el representante más abundante de las auxinas (hormonas vegetales) en plantas. Algunas estimaciones sugieren que hasta un 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera podrían sintetizar AIA (Spaepen & Vanderleyden 2011). Se ha demostrado la síntesis de auxina en bacterias de vida libre como *Azospirillum brasiliense*, en cianobacterias fijadoras

de nitrógeno (diazótrofas), en actinobacterias *Frankia* y en bacterias del género *Rhizobium* (Castro & Bucio 2013). La cepa endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 ha sido confirmada como productora de AIA (Lee et al. 2004).

Las bacterias pueden producir AIA mediante diferentes vías, la mayoría de las cuales utilizan el triptófano como precursor. El triptófano es excretado por la planta como un componente de los exudados de la raíz. Kamilova et al. (2006) observaron que la cepa usada como biocontrolador *Pseudomonas fluorescens* WCS365, que produce AIA en presencia de triptófano, es capaz de estimular el crecimiento de la raíz del rabanito, una planta que secreta altas concentraciones de triptófano en sus exudados, pero no en tomate, morrón dulce o pepino. Esto se debería a que en estas últimas la liberación de triptófano es 10 veces menor (Lugtenberg et al. 2013).

La concentración de auxinas y su relación frente a otras hormonas es crítica para la respuesta fisiológica de la planta (Lambrecht et al. 2000). Se ha visto que la PCV generada por el aumento de auxinas actúa estimulando el crecimiento de la raíz, tanto en longitud como en área superficial, permitiendo que la planta acceda a más nutrientes y agua del suelo (Lugtenberg et al. 2013). Esto se logra incrementando la formación de raíces laterales, así como de pelos radicales absorbentes (tricomos) en la epidermis de la raíz (Vessey 2003). También puede inhibir la elongación radicular en algunos casos (Droge et al. 2013).

Otro aspecto relevante que se ha observado del AIA es que funciona como una molécula señalizadora en algunos microorganismos, afectando, por ejemplo, la expresión génica (Spaepen et al. 2007). Se ha reportado en *Arabidopsis*

(especie de la misma familia que la canola, Brassicaceae) que el AIA está implicado en la defensa contra bacterias fitopatógenas, a través de un sistema de retroalimentación negativa mediado por miARN (Navarro et al. 2006).

1.8.2. Solubilización de fosfatos

El fósforo participa en numerosos procesos biológicos, tales como la generación de energía, síntesis de ácidos nucleicos, fotosíntesis, respiración y señalización celular. Constituye el tercer factor limitante del crecimiento de las plantas, luego del agua y el nitrógeno (Lugtenberg et al. 2013). Si bien la mayoría de los suelos posee una cantidad suficiente de fósforo para permitir el crecimiento de las plantas, estas sólo pueden absorberlo en forma de iones H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} (Vance et al. 2003). Además, el fósforo soluble aplicado al suelo como fertilizante químico puede ser rápidamente convertido a formas insolubles, cuyo efecto acumulativo, sumado a su escurrimiento hacia los cuerpos de agua, ocasiona problemas de eutrofización e hipoxia en lagos y estuarios (Smyth 2011).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos son capaces de catalizar reacciones que incorporan el fósforo a moléculas inorgánicas u orgánicas que sí son asequibles por las plantas (Igal et al. 2001; Kim et al. 1998). Dichas bacterias son ubicuas en los ecosistemas, siendo los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* y *Pseudomonas* los que tienen representantes más significativos en su capacidad para solubilizar fosfatos (Browne et al. 2013). Particularmente se ha detectado este MPCV en aislamientos de endófitos de arroz relacionados filogenéticamente con *Pantoea agglomerans* (Verma et al.

2001). Numerosas bacterias endófitas de la especie *Pseudomonas fluorescens* han sido estudiadas para esta característica PCV (Browne et al. 2009). En particular, se ha demostrado el efecto de PCV en las cepas *P. fluorescens* L11, L228 y L321, siendo esta última la más efectiva en condiciones limitantes de fósforo (Oteino et al. 2015).

1.8.3. Producción de sideróforos

El hierro es un elemento esencial para todos los organismos. Si bien este elemento es abundante en la corteza terrestre, es poco soluble en las condiciones normales de pH y aereación de los suelos y por ende no apto para su absorción por parte de los seres vivos. Las plantas producen y excretan fitosideróforos, que captan los iones Fe^{3+} y los transportan a la superficie de la raíz donde es reducido a Fe^{2+} y absorbido por la planta (Lemanceau et al. 2013).

En la rizósfera, las bacterias deben crecer con concentraciones bajas de Fe^{3+} . Algunas pueden producir y excretar una variedad de sideróforos que se unen a este ion con gran afinidad y luego lo internalizan de forma activa (Lugtenberg et al. 2013). Asimismo, muchas especies de plantas pueden absorber los complejos Fe^{3+} /siderofoforo bacterianos, lo cual permite una mayor captación de hierro por parte de la planta (Zhang et al. 2009). La producción de sideróforos ha sido especialmente estudiada en cepas de la especie *Pseudomonas fluorescens*, debido a que es un mecanismo que permite biocontrolar el crecimiento de patógenos (Lugtenberg et al. 2013b; Charest et al. 2005). A su vez, se ha visto que, en condiciones de escasez de hierro en la rizósfera, este grupo de bacterias se ve sobrerrepresentado en el suelo (Barriuso

et al. 2008). Es interesante resaltar el hecho de que la producción *in vivo* del sideróforo pioverdina por la cepa *Pseudomonas fluorescens* C7 ha sido vinculada a la PCV en *Arabidopsis* (Lemanceau et al. 2013; Vansuyt et al. 2007).

1.8.4. Solubilización de potasio

El potasio, es en grado de importancia el tercer macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas. Las concentraciones de potasio soluble en el suelo son a menudo muy bajas y más del 90% del potasio en el suelo existe en forma de rocas insolubles y minerales de silicato. Se han reportado bacterias rizosféricas capaces de disolver el potasio a partir de minerales que contienen potasio insoluble (Parmar & Sindhu 2013). Un caso documentado de solubilización de potasio *in vivo* fue estudiado en ensayos de inoculación de maíz con la cepa *Bacillus mucilaginosus* HKK-2, donde se observó PCV y mayor captación de K (Wu et al. 2005).

1.8.5. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

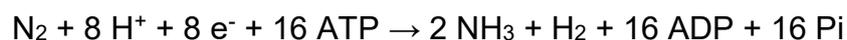
El nitrógeno constituye el segundo factor limitante del crecimiento vegetal, luego del agua, indispensable en la síntesis de diversas biomoléculas (Lugtenberg et al. 2013). La fertilización nitrogenada de cultivos representa uno de los insumos más costosos en la agricultura. Además, se considera que hasta un 65% del nitrógeno mineral aplicado se pierde como emisiones gaseosas, lixiviados o por erosión del suelo (Bruijn 2015). Los impactos ambientales de dicha práctica incluyen la producción de GEI, disminución del ozono

estratosférico, así como la posible formación de lluvias ácidas, modificaciones en el ciclo global del nitrógeno y contaminación con nitratos de aguas superficiales y subterráneas (Bhattacharjee et al. 2008). Dado que las plantas asimilan el nitrógeno pasivamente como ión amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), el aporte de fertilizantes químicos en exceso puede causar cambios en el pH de la rizósfera, afectando su funcionalidad (Lugtenberg et al. 2013).

El nitrógeno atmosférico o elemental (N_2) representa aproximadamente el 78% de los gases de la atmósfera, pero es relativamente inerte, por lo cual difícilmente reacciona con otros compuestos químicos para formar nuevos compuestos. El ciclo del nitrógeno requiere de bacterias capaces de incorporar dicho elemento a la biomasa, a través del proceso conocido como biológica de nitrógeno (FBN) (de Bruijn 2015).

A través de la FBN las bacterias convierten el N_2 atmosférico a NH_4^+ . Esta capacidad se encuentra muy difundida en procariontes, con representantes de los dominios Archaea y Bacteria. Las bacterias más estudiadas con esta capacidad se conocen como rizobios, que son bacterias Gram negativas pertenecientes a las Clases Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria (Filo Proteobacteria), que establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas (Masson-Boivin et al. 2009). Estas bacterias pueden inducir la formación de nódulos en plantas leguminosas (Leguminosae/Fabaceae) (Lugtenberg et al. 2013). Sin embargo, la asociación planta-bacteria diazotrofa no se limita únicamente a las bacterias simbióticas (nodulantes), sino que incluye bacterias con diversos grados de asociación, tales como de vida libre, rizosféricas o endófitas (Lugtenberg et al. 2013).

La reacción química de la fijación biológica es:



Esta reacción es catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que en la mayoría de las bacterias contiene molibdeno y hierro (Mo-Fe) como cofactor. El complejo enzimático nitrogenasa está compuesto por dos metaloproteínas. La primera, también denominada proteína MoFe, es un tetrámero de 220 kDa compuesto por dos subunidades distintas α y β , mientras que la segunda, también denominada proteína Fe, es un dímero de 68 kDa compuesto por dos subunidades idénticas. Los genes estructurales que codifican para las subunidades α y β de la proteína MoFe se conocen como *nifD* y *nifK*, respectivamente, mientras que el gen que codifica para la proteína Fe es el *nifH*. Existen asimismo otros genes *nif*, implicados en la síntesis del cofactor FeMoCo y en el ensamblaje y maduración del complejo enzimático (Franche et al. 2009). Se ha reportado que algunas bacterias también pueden tener una nitrogenasa adicional en la que se sustituye el cofactor por uno que contiene vanadio y hierro o sólo hierro, aunque son menos eficientes que la primera nitrogenasa mencionada (de Bruijn 2015).

Las bacterias diazótroficas de vida libre y asociadas (rizosféricas o endófitas, no rizobios) pertenecen a numerosos géneros, tales como: *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* (Lugtenberg et al. 2013).

La PCV observada *in vivo*, resultante de la inoculación con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno está vinculada a su capacidad FBN. Esto se

evidenció mediante el uso de mutantes de *nifH* (incapaces de fijar nitrógeno), con las cepas endófitas diazótrofes *Azoarcus* sp. BH72 en arroz (Hurek et al. 2002) y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* PAL5 en caña de azúcar (Sevilla et al. 2001), entre otras.

ANTECEDENTES DEL GRUPO

El estudio de las comunidades nativas de bacterias endófitas sirve como base para desarrollar posibles aplicaciones biotecnológicas, que contribuyan a la sustentabilidad económica y ambiental.

Los estudios de BPCV endófitas en el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) comenzaron con la investigación de las BPCV asociadas a la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con énfasis en las bacterias diazótrofes (Taulé et al. 2012, Taulé et al. 2016), y se amplió a otros cultivos tales como el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) (Mareque et al. 2015, Heijo 2015), la festuca (*Festuca arundinacea*) (de los Santos et al. 2015) y finalmente la canola (*Brassica napus*).

En líneas generales, la etapa inicial de este tipo de estudios consiste en obtener colecciones de PEB asociados a variedades específicas de cultivos de interés agronómico. Posteriormente, se realiza una búsqueda de MPCV *in vitro*, luego de la cual se seleccionan aislamientos que resulten de interés en función de los MPCV que presenten y se busca evidenciar la PCV derivada de la inoculación bacteriana, inicialmente en condiciones gnotobióticas. Una vez confirmados los efectos PCV, se procede a realizar ensayos de invernáculo y por último en condiciones de campo para probar su efectividad y aplicación biotecnológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Generar conocimiento acerca de las bacterias cultivables endófitas asociadas a plantas de canola y sus posibles características de promoción del crecimiento vegetal.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Construir una colección de probables endófitos bacterianos, asociados a los cultivares de canola Trapper e Igranola103.
- 2- Caracterizar dicha colección de aislamientos bacterianos buscando mecanismos promotores del crecimiento vegetal *in vitro*.
- 3- Identificar mediante técnicas moleculares aislamientos de interés según sus características PCV.
- 4- Evaluar la respuesta de plantas de canola del cultivar Igranola103 a la inoculación bacteriana con aislamientos seleccionados en condiciones gnotobióticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Construcción de la colección de Probables Endófitos Bacterianos nativos

3.1.1. Estrategia General

Como estrategia de trabajo, a partir de tallos y raíces de las plantas colectadas se realizó el recuento y aislamiento de probables endófitos bacterianos (PEB) utilizando diferentes medios de cultivo y condiciones de aerobiosis. Dicha colección se caracterizó *in vitro* buscando MPCV directos tales como: la capacidad de FBN,

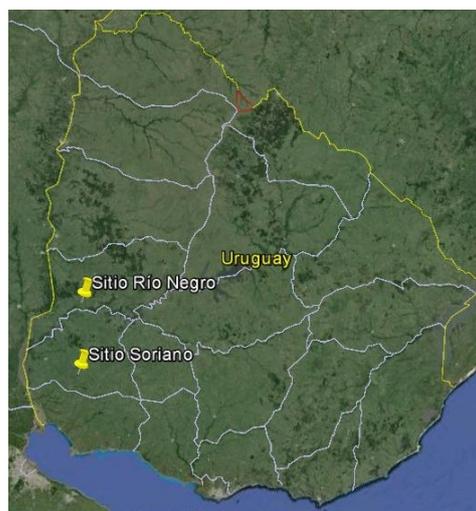


Figura 3.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de Soriano y Río Negro (desde una altura de 955km).

solubilización de K, P y Fe y la producción de la fitohormona AIA. Posteriormente, se seleccionaron aislamientos, tomando en consideración sus características PCV detectadas *in vitro*, los cuales fueron identificados y utilizados como inoculantes de canola en ensayos en condiciones gnotobióticas.

3.1.2. Sitios de muestreo

Se realizaron muestreos de plantas adultas de canola en edad de cosecha. Las mismas fueron colectadas en parcelas sin fertilizar de ALUR, de dos sitios diferentes: uno en el departamento de Soriano ($33^{\circ} 41' 58''$ S, $57^{\circ} 50' 19''$ O) y el otro en Río Negro ($32^{\circ} 59' 25''$ S, $57^{\circ} 47' 44''$ O) (Fig. 3.1), de los

cultivares Igranola103 y Trapper, respectivamente. Se registró el historial de producción de los predios y una muestra del suelo fue enviada para su análisis fisicoquímico al Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de INIA La Estanzuela (Anexo 1). El material vegetal (raíces y tallos de canola) fue transportado y mantenido a 4 °C hasta su procesamiento.

3.1.3. Esterilización de la superficie y macerado

Se puso a punto un protocolo de esterilización de la superficie del material vegetal. Para esto, se ensayaron distintas concentraciones de NaClO (3% y 4% v/v) y tiempos de incubación de 10, 15 y 20 min, realizando un control de esterilización mediante impresión de tejido así tratado (tallo o raíz) en medio rico Trypticase Soy Agar™(TSA, BBL™) (Anexo 2).

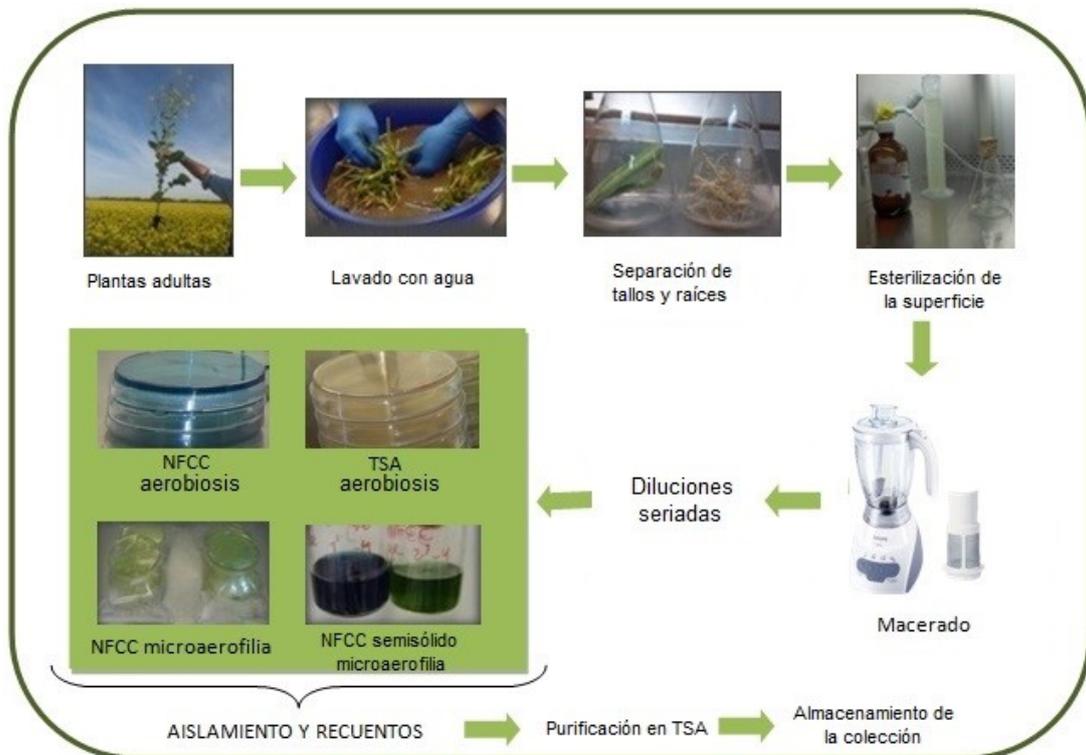


Figura 3.2. Esquema de la estrategia empleada para el aislamiento de los PEB y obtención de la colección.

El protocolo final de esterilización de la superficie y macerado vegetal (Figura 3.2) consistió en el lavado inicial de tallos y raíces con abundante agua de la canilla para eliminar restos de suelo. Posteriormente se separó el tallo de la raíz, seleccionando en el caso de los tallos los primeros 2-3 nudos y las raíces se cortaron en porciones menores para facilitar su manipulación. Luego se realizó por separado el lavado de tallos y raíces con agua de la canilla en matraces con agitación hasta observar agua limpia.

Se prosiguió con la esterilización de la superficie en cámara de flujo laminar. Para ello se colocó el material vegetal de cada órgano por separado en matraces estériles con etanol 70% (v/v) durante 3 min, seguido de la incubación con NaClO 4% (v/v) por 15 min en agitación. Luego se realizaron seis enjuagues en agua destilada estéril, y para corroborar si la esterilización fue efectiva se deslizó la superficie de los tejidos esterilizados en una placa de Petri conteniendo medio rico TSA. Diez gramos de cada tejido tratado fueron macerados con el agregado de 90 mL de solución salina NaCl 0,9% (p/v) estéril, utilizando una licuadora previamente lavada en EtOH 70% (v/v) y expuesta a radiación UV (15 min). Se recuperaron 10 mL de la fracción líquida del macerado, la cual se consideró como dilución -1 (1/10). Se agregó al macerado 100 μ L de cicloheximida (100 mg/mL) para evitar el crecimiento de hongos y luego se realizaron las diluciones seriadas en solución salina NaCl 0,9% (p/v) estéril: -2, -3, -4 (1/100, 1/1.000 y 1/10.000, respectivamente), con el fin de realizar el recuento y aislamiento de los PEB.

3.1.4. Recuento y aislamiento de PEB

Para los recuentos y aislamientos se utilizó un medio de cultivo rico: TSA, y uno selectivo: NFCC (Mirza & Rodrigues 2012) (Anexo 2).

Los recuentos fueron realizados en placa, utilizando el método de la gota. Para esto, 5 μ L de las diluciones -2, -3 y -4, fueron sembrados por triplicado, efectuando el conteo a las 48 h de incubación en condiciones aerobias a 30 °C.

Para el aislamiento, se utilizaron distintas condiciones de oxígeno (aerobiosis y microaerofilia), de acuerdo con las siguientes combinaciones: (i) placas de TSA en aerobiosis, (ii) placas de NFCC en aerobiosis, (iii) placas de NFCC en microaerofilia y (iv) viales conteniendo medio semisólido NFCC (condición de microaerofilia). El medio de cultivo NFCC es un medio rico selectivo adecuado para la búsqueda de bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) (Mirza & Rodrigues 2012). Este medio posee tres fuentes de carbono distintas y no posee fuente de N. A su vez, se utilizó el agente gelificante, Gellan Gum (2% p/v sólido y 0,1% p/v semisólido) ya que posee bajo contenido de N en comparación con el agar (Mirza & Rodrigues 2012). Al momento de la siembra, se introdujo con un ansa material de las diluciones -1 de los macerados vegetales, inoculándose por triplicado en viales conteniendo medio NFCC semisólido. En el caso de las placas con medio de cultivo sólido TSA Y NFCC, se sembró mediante el uso de rastrillo 100 μ L de las diluciones -2, -3 y -4. Los viales y las placas se incubaron en condiciones aerobias a 30 °C durante 48 h en el caso del medio TSA y 7 días para el medio NFCC. Además, otra serie de placas con medio de cultivo NFCC fueron inoculadas e incubadas a 30 °C

durante 21 días en condiciones de microaerofilia generadas por el sistema Microbiology Anaerocult A Mini (Merck KGaA, Alemania).

Los aislamientos se seleccionaron por diferencias morfológicas y tejido de procedencia, fueron purificados en medio de cultivo rico TSA mediante siembras sucesivas por agotamiento en estrías hasta obtener las colonias aisladas y puras. Los aislamientos puros obtenidos fueron nombrados UYBN001 hasta UYBN333 y guardados en crioviales con glicerol 25% (v/v) a -20 y -80 °C, así como en microplaca de 96 pocillos para facilitar la manipulación en la posterior búsqueda de características PCV *in vitro*.

3.1.5. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se realizaron lisados celulares de todos los aislamientos bacterianos mediante ruptura celular por choque térmico. Esto se realizó en microtubos de 1,5 mL a partir de colonias de placas frescas suspendidas en 100 µL de agua miliQ estéril y centrifugadas a 15.600 g durante 2 min. Tras descartar el sobrenadante se suspendió el pellet en 100 µL de NaOH 0,05 M. Luego se incubó a 100 °C durante 4 min y posteriormente en hielo durante 2 min. Por último, se agregó 900 µL de agua miliQ estéril y se centrifugó a 15.600 g durante 2 min, conservando 700 µL del sobrenadante a -20 °C para su uso.

3.2. Búsqueda de características PCV *in vitro* en la colección de aislamientos

Para evaluar la capacidad de solubilización de fosfato y de potasio y la producción de sideróforos, se crecieron los aislamientos en microplaca (placa madre) de 96 pocillos (350 μ L c/pocillo) con 200 μ L de medio de cultivo líquido TSB a 28 °C, en agitación a 270 rpm, durante 48h. Para la evaluación *in vitro* de la producción de AIA, en cambio, los aislamientos se crecieron en microplacas de 96 pocillos (2 mL c/pocillo) en las mismas condiciones, pero durante 72 h y en 1 mL de medio DYGS suplementado con triptófano (Rodrigues et al. 1986) (Anexo 2).

3.2.1. Detección de aislamientos con capacidad de solubilizar fosfatos

A partir de los precultivos en microplaca, los aislamientos bacterianos se sembraron por duplicado con multiansa en placas de Petri conteniendo medio de cultivo NBRIP (Nautiyal 1999) (Anexo 2) y se incubaron a 30 °C. Las colonias positivas fueron visualizadas por presencia de un halo traslúcido a su alrededor, evaluado a las 72 h de incubación. La cepa *Achromobacter sp.* UYSO02 se utilizó como control positivo (Taulé et al. 2012). Los aislamientos positivos fueron confirmados repitiéndose el ensayo una vez más.

3.2.2. Detección de aislamientos con capacidad de producir sideróforos

A partir de los precultivos en microplaca, los aislamientos se sembraron por duplicado con multiansa en placas con medio CAS (Schwyn & Neilands

1987) (Anexo 2) y se incubaron a 30 °C por 72 h. Asimismo, se ensayó una variante del medio CAS usando las fuentes de carbono presentes en el medio NFCC: ácido málico, piruvato de sodio y acetato de sodio, sin adicionar glucosa, en las mismas concentraciones que el medio NFCC (Anexo 2). Los aislamientos positivos fueron visualizados por la presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia. En este ensayo, la cepa *Herbaspirillum seropedicae* Z67 se utilizó como control positivo (Rosconi et al. 2013). Aquellos aislamientos que dieron positivos en alguna de las variantes del medio CAS fueron confirmados nuevamente.

3.2.3. Detección de aislamientos con capacidad de solubilizar potasio

A partir de los precultivos en microplaca, los aislamientos se sembraron por duplicado con multiansa en placas con medio Aleksandrov (Avakyan et al. 1986) (Anexo 2) y se incubaron a 30 °C por 72 h. Se utilizó la cepa *Bacillus sp.* UYSB04, en la se había evidenciado este MPCV (Mareque et al. 2015). Los aislamientos positivos, por presentar un halo traslúcido, fueron reconfirmados en el mismo medio.

3.2.4. Detección de aislamientos productores de AIA.

A partir del precultivo de los aislamientos en 1 mL de medio DYGS con triptófano (100 µg/mL), a las 72 h se centrifugaron durante 5 min a 12.000 g. Posteriormente 150 µL del sobrenadante fueron incubados con 100 µL del reactivo de Salkowsky (Gordon & Weber 1951) (Anexo 2) durante 30 min en la oscuridad. Para determinar la producción de AIA, se realizó un análisis cualitativo

evaluando la aparición de color rosado/rojizo en comparación con los pocillos conteniendo concentraciones crecientes de AIA (de 0 a 100 μM). En este experimento, la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (Bastián et al. 1998), cultivada en medio DYGS sin ácido málico, se utilizó como control positivo, mientras que como blanco se empleó el medio de cultivo sin inocular.

3.2.5. Detección de posibles aislamientos diazótrofos en la colección

Un conjunto de aislamientos fue evaluado con el fin de determinar la presencia del gen *nifH* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para esto se empleó la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 25 μL : 2,5 μL de *DreamTaq Buffer* 10X (Thermo Fisher Scientific Inc.) que incluía MgCl_2 en una concentración de 20 mM; 2,5 μL de dNTPs 2 mM, 1 μL de cada cebador 20 mM, 0,18 μL de BSA 1% (v/v), 1 μL de *DreamTaq* (5 u/ μL 500U), 2 μL de extracto de ADN (obtenido por lisado de colonias; sección 3.1.5) como molde y 14,82 μL de agua bidestilada estéril. Para la reacción se utilizó el par de cebadores: PoIF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PoIR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (Poly et al. 2001).

La reacción de amplificación fue programada de la siguiente manera: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de: i) 45 s a 95 °C para la desnaturalización de ADN, ii) 45 s a 58 °C para la hibridación de los cebadores al molde de ADN y iii) 30 s a 72 °C para la etapa de polimerización del ADN. La reacción se culminó con un ciclo final de extensión de 5 min a 72 °C. En este experimento como control positivo se utilizó un lisado de la cepa *Enterobacter sp.* UYSO10 (Taulé et al. 2012a).

Para la visualización de los amplicones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE 1X) (Anexo 2) utilizando el agente intercalante Good View (Beijing SBS. Genetech. Co. Ltd.) en una relación de 1 µL/50mL (colorante/gel), durante 40 min, a 90 V. El amplicón del tamaño esperado (aproximadamente 360 pb), fue confirmado mediante comparación con el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermoscientific #SM1332) al exponer el gel a luz ultravioleta.

3.3. Identificación de aislamientos de interés

3.3.1. Amplificación por PCR de gen *ARNr 16S*

Para la identificación de los aislamientos, a partir de los lisados bacterianos se efectuó la amplificación por PCR del gen *ARNr 16S*, que codifica para uno de los ARNs de la subunidad menor del ribosoma bacteriano.

En este caso, la mezcla de reacción de 50 µL consistió en: 5µL de *DreamTaq Buffer* 10X (Thermo Fisher Scientific Inc.) que incluía MgCl₂ en una concentración de 20 mM; 5 µL de dNTPs (2 mM), 2 µL de cada cebador (20 µM), 2 µL de BSA (1% v/v), 0,4 µL de Taq (5u/µL 500U), 4 µL de lisado bacteriano y 29,6 µL de agua bidestilada estéril. Para la amplificación se utilizaron los cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3) (Lane, 1991).

La reacción de amplificación fue programada de la siguiente manera: una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de i) 1 min a 94 °C, ii) 1 min a 55 °C y iii) 1 min a 72 °C, con un ciclo de extensión final de 15 min

a 72 °C. La detección del amplicón (aproximadamente 1400 pb) fue realizada como se describe en la sección 3.2.5.

3.3.2. Secuenciación, edición y empalme de amplicones *ARNr 16S*

La purificación del producto de PCR y su secuenciación fue realizada en MACROGEN Inc. Corea, para lo cual se emplearon los mismos cebadores utilizados previamente. La edición y empalme de las secuencias nucleotídicas obtenidas de ambos extremos se hizo mediante el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012) (HeracleBioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>). Se obtuvieron secuencias de 1400 pb aproximadamente.

3.3.3. Identificación de los aislamientos por comparación con bases de datos

La identificación a nivel de género de los aislamientos, así como la búsqueda de las cepas tipo con mayor similitud, se realizó mediante la comparación de las secuencias nucleotídicas editadas con las bases de datos del Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al. 2014; Wang et al. 2007; <https://rdp.cme.msu.edu/>). Para la identificación a nivel de género se utilizó la herramienta “RDP Classifier”, mientras que para la búsqueda de las cepas con mayor similitud se empleó la herramienta “RDP Seq Match”.

3.4. Ensayo de respuesta de plantas de canola a la inoculación con PEB, en condiciones gnotobióticas

En este ensayo se evaluaron como inóculo aquellas cepas seleccionadas por la presencia de características PCV, a saber: UYBN151, UYBN163, UYBN170, UYBN174, UYBN182, UYBN200, UYBN 204, UYBN208, UYBN221 y UYBN223. Estas fueron inoculadas en plantas de canola de la variedad Igranola103, en condiciones gnotobióticas. Para esto, las semillas fueron lavadas durante 3 min con EtOH 70% (v/v). Posteriormente se esterilizaron en su superficie utilizando NaClO 2% (v/v) durante 15 min y por último se enjuagaron 6 veces con agua destilada estéril. La eficiencia de la esterilización se controló mediante la impresión de las semillas tratadas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TSA. Luego de este tratamiento, las semillas se germinaron en placas de agar-agua 0,8% (p/v) durante 48 h a temperatura ambiente.

Las semillas germinadas se colocaron en tubos de vidrio conteniendo 20 mL de medio de cultivo Jensen sin nitrógeno (Vincent 1970) (Anexo 2). Se colocaron 3 plántulas por tubo, las que fueron inoculadas con 1×10^7 células/plántula. Para cada tratamiento se emplearon 10 tubos. Como controles se emplearon tubos conteniendo plántulas: i) sin fertilizar ni inocular y ii) fertilizadas con el agregado de KNO_3 0.05% (p/v) (de los Santos et al. 2016). Los tubos fueron incubados durante 4 semanas en condiciones controladas a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Al final del ensayo, se realizaron mediciones de longitud de la raíz principal y del tallo para todas las plantas. Posteriormente, fueron secadas a 60 °C hasta observar peso seco

contante y fueron pesadas. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Infostat versión 2015 (Di Rienzo et al. 2015). Tanto para las medidas de longitud como de peso seco se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y de existir diferencias significativas se compararon las medias de los tratamientos.

4. RESULTADOS

4.1. Construcción de una colección de PEB nativos

Las muestras de suelo analizadas provenientes de Río Negro y Soriano (Anexo 1) mostraron que en ambos casos se trataba de suelos limo arcillosos, con un contenido de arcilla de 43% y 33%, y de materia orgánica (%MO= %C.org x 1,72) de 2,49% y 3,10%, respectivamente.

A partir de la metodología descrita, se obtuvo una colección de 333 aislamientos de PEB, 200 provenientes de raíz y 133 de tallo. De éstos, 168 corresponden a las plantas del cultivar Trapper del predio de Río Negro y 165 a las plantas del cultivar Igranola103 del predio de Soriano (Tabla 4.1).

De los 333 aislamientos, 272 fueron obtenidos en condiciones de aerobiosis y 61 de microaerofilia. De este total, 162 fueron aislados en TSA en aerobiosis, 110 en NFCC en aerobiosis, 32 en NFCC en microaerofilia con el sistema Microbiology Anaerocult y 29 en NFCC semisólido, en microaerofilia.

Tabla 4.1. Número de aislamientos obtenidos a partir de los diferentes medios de cultivo y condiciones de crecimiento, según órgano y sitio de muestreo.

Órgano	Cultivar (cv.) ^a	Cantidad de aislamientos según medio de cultivo y condición de aerobiosis			
		TSA aerobiosis	NFCC aerobiosis	NFCC microaerofilia	NFCC semisólido microaerofilia
Raíz	Trapper	41	35	23	9
	Igranola103	46	32	5	9
Tallo	Trapper	41	16	0	3
	Igranola103	34	27	4	8
Total según medio de cult. y cond. de aerobiosis		162	110	32	29

^a El cultivar Trapper corresponde al sitio de Río Negro, mientras que el cultivar Igranola103 corresponde al sitio de Soriano.

Respecto al recuento de bacterias cultivables, para el cv. Trapper se obtuvo en promedio: i) en TSA, $5,33 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias por

gramo de material vegetal procesado (ufc/g) para raíz, ii) en NFCC, en condiciones de aerobiosis, $1,02 \times 10^6$ y $1,33 \times 10^4$ ufc/g para raíz y tallo, respectivamente y iii) en NFCC, en condiciones de microaerofilia, $5,93 \times 10^5$ ufc/g para raíz (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Recuento de PEB cultivables de los cultivares Trapper e Igranola103.

Órgano	Cultivar (cv.) ^a	Recuento bacteriano (ufc/g de tejido)		
		según medio de cultivo y condición de aerobiosis		
		TSA aerobiosis	NFCC aerobiosis	NFCC microaerofilia
Raíz	Trapper	$5,33 \times 10^5$	$1,02 \times 10^6$	$5,93 \times 10^5$
	Igranola103	$1,33 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5$	SD
Tallo	Trapper	SD	$1,33 \times 10^4$	SD
	Igranola103	$1,07 \times 10^5$	$7,33 \times 10^4$	SD

^a El cultivar Trapper corresponde al sitio de Río Negro, mientras que el cultivar Igranola103 corresponde al sitio de Soriano. **SD**: sin determinar.

Asimismo, para el cv. Igranola103 se obtuvo: i) en TSA, $1,33 \times 10^5$ y $1,07 \times 10^5$ ufc/g para raíz y tallo, respectivamente ii) en NFCC, en condiciones de aerobiosis, $2,20 \times 10^5$ y $7,33 \times 10^4$ ufc/g para raíz y tallo, respectivamente. En algunos casos no se obtuvo recuentos (SD: sin determinar) (Tabla 4.2).

4.2. Búsqueda de características PCV

Las características PCV identificadas *in vitro* están vinculadas a disponibilizar nutrientes esenciales para las plantas: solubilización de fosfatos (P) y potasio (K), producción de sideróforos y FBN; así como a la producción de la fitohormona ácido indolacético (AIA).

La solubilización de P y K y producción de sideróforos, fueron evaluadas para el total de la colección, mientras que la producción de AIA y la presencia del gen *nifH*, fueron evaluadas para 191 y 116 aislamientos, respectivamente. En este sentido, se priorizó analizar los aislamientos de PEB obtenidos a partir

del cultivar Igranola103, dado que es el más comúnmente plantado de los dos cultivares empleados.

La caracterización funcional o búsqueda de MPCV *in vitro* de la colección (total: 333 aislamientos) mostró que 106 aislamientos fueron productores de sideróforos (Figura 4.1A), 88 solubilizadores de fosfatos (Figura 4.2B) y 19 solubilizadores de potasio (Figura 4.1C). Por otra parte, de 191 aislamientos evaluados en el ensayo de producción de AIA, 70 presentaron dicha capacidad (Figura 4.1D). En relación con la presencia del gen *nifH*, de 116 aislamientos evaluados, 42 presentaban dicho gen (*nifH*+) (Figura 4.1E).

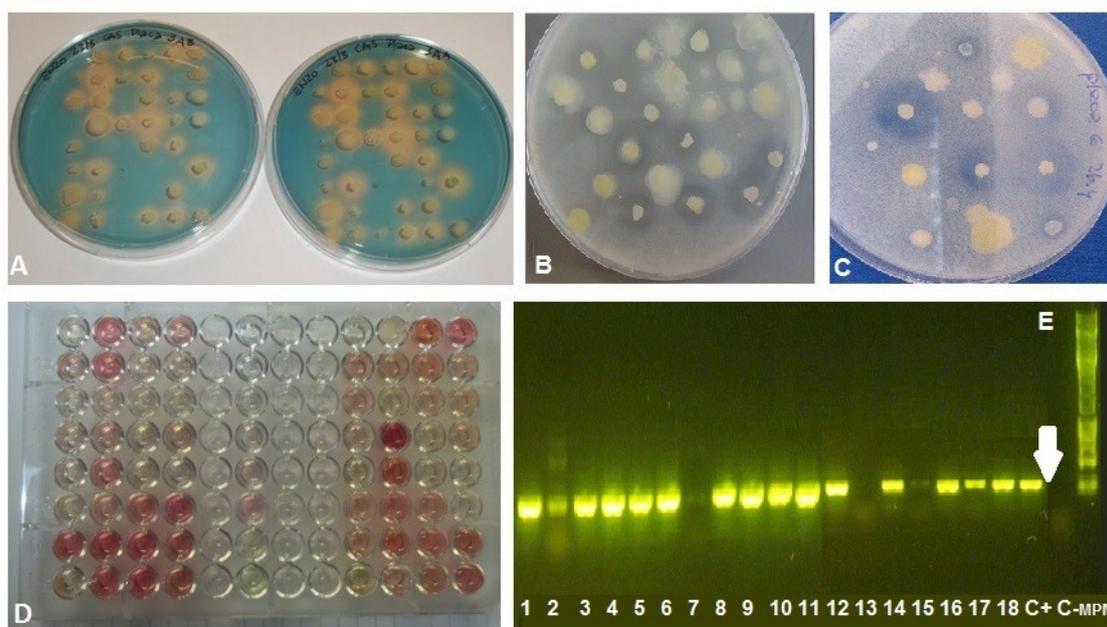


Figura 4.1. Ensayos de caracterización funcional de la colección. **A:** Producción de sideróforos en medio CAS. Control positivo: *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **B:** Solubilización de P en medio NBRIP. Control positivo: *Achromobacter* sp. UYSO02. **C:** Solubilización de K en placa con medio Aleksandrov. Control positivo: *Bacillus* sp. UYSB04. **D:** Detección de la producción de AIA. Control positivo: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **E:** Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos de amplificación del gen *nifH* obtenidos mediante PCR. Carriles: 1-18: aislamientos de la colección, C+: control positivo *Enterobacter* sp. UYSO10 (flecha blanca a 360 pb), C-: control sin ADN, MPM: marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

De los 333 aislamientos, 192 (57,7%) mostraron al menos una característica PCV (Figura 4.2). De estos, 98 presentaron una característica PCV, 62 dos características, 27 tres características y 5 cuatro características.

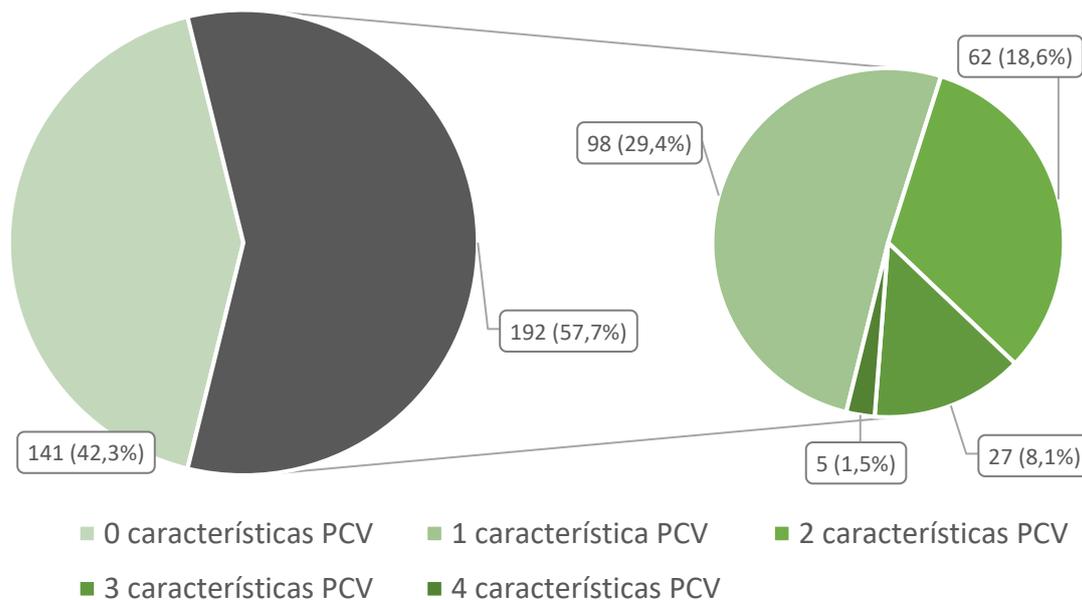


Figura 4.2. Número y porcentaje de aislamientos que mostraron MPCV *in vitro*, según la cantidad de características que presentaron. Los aislamientos que presentaron al menos un MPCV (gris oscuro) se desglosan en el segundo gráfico.

Teniendo en cuenta solamente los aislamientos *nifH+*, 18 presentaron únicamente esta característica PCV, 15 presentaron dos características, 4 presentaron tres características y 5 presentaron cuatro características (Figura 4.3). La Tabla 4.3 presenta el listado de aislamientos *nifH+* y sus características PCV.

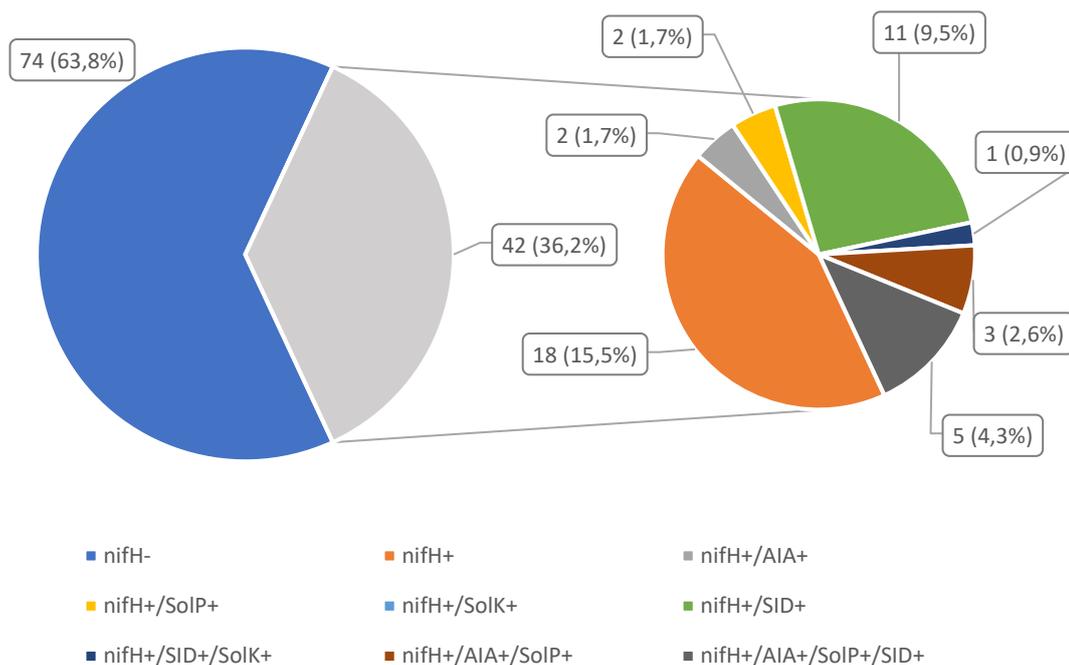


Figura 4.3. Cantidad y porcentajes de aislamientos con distintas características PCV. El primer gráfico muestra el porcentaje de aislamientos *nifH*- (celeste) y *nifH*+ (gris). El segundo gráfico detalla los 42 aislamientos *nifH*+. Se indica cantidad y porcentajes (del total) de las distintas combinaciones de características PCV.

Tabla 4.3. Características PCV de los aislamientos *nifH*+, detallando órgano de procedencia, sitio de muestreo, medio de cultivo y condición de aislamiento.

Aislamiento bacteriano	Características PCV					Características del aislamiento		
	<i>nifH</i>	AIA	SID	Sol K	Sol P	Órgano	Cultivar (cv.) de canola	Medio y cond. aislam.
UYBN118	+	-	-	-	-	Tallo	Trapper	TSA aerobiosis
UYBN120	+	-	-	-	-	Tallo	Trapper	NFCC aerobiosis
UYBN122	+	-	-	-	-	Tallo	Trapper	NFCC aerobiosis
UYBN127	+	-	-	-	-	Tallo	Trapper	TSA aerobiosis
UYBN128	+	-	-	-	-	Tallo	Trapper	NFCC aerobiosis
UYBN129	+	-	-	-	-	Tallo	Trapper	NFCC aerobiosis
UYBN135	+	-	-	-	-	Raíz	Trapper	TSA aerobiosis
UYBN149	+	-	-	-	-	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN151	+	+	+	-	+	Raíz	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN152	+	-	-	-	-	Raíz	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN156	+	-	+	+	-	Raíz	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN157	+	-	-	-	-	Raíz	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN163	+	+	+	-	+	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN164	+	-	+	-	-	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN170	+	+	+	-	+	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN171	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN172	+	-	-	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis

UYBN173	+	-	-	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN174	+	+	-	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN175	+	-	-	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN176	+	-	-	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN177	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN178	+	-	-	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN180	+	-	+	-	-	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN182	+	+	+	-	+	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN184	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN192	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN193	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN197	+	-	-	-	+	Raíz	Igranola103	NFCC microaer.
UYBN200	+	+	-	-	+	Raíz	Igranola103	NFCC microaer.
UYBN201	+	-	-	-	+	Raíz	Igranola103	NFCC microaer.
UYBN204	+	+	-	-	-	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN208	+	+	+	-	+	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN210	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN211	+	-	-	-	-	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN220	+	-	+	-	-	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN221	+	+	-	-	+	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN223	+	+	-	-	+	Tallo	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN225	+	-	-	-	-	Raíz	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN229	+	-	+	-	-	Raíz	Igranola103	NFCC aerobiosis
UYBN232	+	-	+	-	-	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis
UYBN233	+	-	-	-	-	Raíz	Igranola103	TSA aerobiosis

Referencias: Se indican resultados positivos (+) o negativos (-) para los MPCV evaluados: FBN (*nifH*), producción de ácido indolacético (**AIA**), producción de sideróforos (**SID**), solubilización de potasio (**Sol K**) y fosfatos (**Sol P**) para los aislamientos de PEB de los cultivares Trapper (sitio Río Negro) y Igranola103 (sitio Soriano).

4.3. Identificación de aislamientos de interés

Se seleccionaron aislamientos PCV que fueran *nifH*⁺ y produjeran la fitohormona AIA para su identificación y posterior ensayo de respuesta de plantas de canola a la inoculación. Con este criterio, se eligieron 10 aislamientos de la colección: UYBN151, UYBN163, UYBN170, UYBN174, UYBN182, UYBN200, UYBN204, UYBN208, UYBN221 y UYBN223.

A partir de la amplificación por PCR del gen *ARNr 16S*, secuenciación y comparación con base de datos, se identificó a nivel de género a 8 de los 10 aislamientos seleccionados. La herramienta «RDP Classifier» permitió determinar que pertenecen a tres géneros de dos Filos distintos dentro del Dominio Bacteria (Tabla 4.4). El filo bacteriano Actinobacteria estuvo representado por un solo aislamiento del género *Arthrobacter*, mientras que los 7 aislamientos restantes pertenecen al filo Proteobacteria, representado por los géneros *Pseudomonas* y *Pantoea*. Cabe destacar que 6 de dichos aislamientos fueron asignados al género *Pseudomonas*. Los aislamientos UYBN163 y UYBN200 no se determinaron a nivel de género, pero fueron clasificados hasta el nivel de familia como pertenecientes a Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae, respectivamente. En particular, para la identificación del aislamiento UYBN163, se contaba solamente con la secuencia de uno de los extremos del amplicón. Al comparar esta secuencia con la base de datos de RDP, se obtuvo un resultado de baja confianza (59%), no pudiendo obtener una identificación a nivel de género. En el caso del aislamiento UYBN200, si bien sí se pudo hacer una edición y empalme correcto de las secuencias, al comparar con la base de datos del RDP se obtuvo un resultado de baja confianza (74%), por lo que tampoco fue posible la identificación a nivel de género.

Tabla 4.4. Identificación de aislamientos a nivel de Filo, Familia y género, asignados utilizando la herramienta “RDP Classifier”

Aislamiento	Filo bacteriano	Familia	Género asignado	Confianza (%)
UYBN151	Proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	100
UYBN170			<i>Pseudomonas</i>	100
UYBN174			<i>Pseudomonas</i>	100
UYBN182			<i>Pseudomonas</i>	100
UYBN208			<i>Pseudomonas</i>	100
UYBN221			<i>Pseudomonas</i>	100
UYBN163			SD*	59
UYBN200			SD*	74
UYBN223		Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	100
UYBN204		Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>

*Se destacan los aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de género (SD) por obtener bajos niveles de confianza (<95%).

Por otra parte, al realizar la comparación con la base de datos de RDP mediante la herramienta «Seq Match», se determinó las cepas así como también las cepas tipo (^T) de mayor similitud con los aislamientos seleccionados de la colección (Tabla 4.5).

Para todos los aislamientos identificados en el paso anterior, hubo coincidencia en los géneros entre cepas ambientales y cepas tipo de este último análisis. Cabe señalar que los aislamientos UYBN151 y UYBN170 fueron relacionados con la misma cepa tipo, *Pseudomonas rhodesiae*^T, y distintas cepas ambientales: *Pseudomonas* sp. G10.5(2011) y *Pseudomonas rhodesiae* W5AF31, respectivamente. Por otro lado, los aislamientos UYBN174, UYBN182, UYBN208 y UYBN221 se relacionaron con la cepa tipo *Pseudomonas viridiflava*^T. En cuanto a las cepas ambientales, UYBN174 fue relacionado con la cepa *Pseudomonas viridiflava* ABAC43, mientras que los aislamientos UYBN182, UYBN208 y UYBN221, con la cepa *Pseudomonas* sp. PCa2bi.

Tabla 4.5. Secuencias del gen ARNr 16s obtenidas de la base de datos de RDP identificado mediante la herramienta «Seq Match».

^aSe presentan los géneros asignados en el paso anterior mediante la herramienta “RDP

Aislamiento bacteriano	Género asignado ^a	Nombre cepa ^b	ID	Similarity score ^c	s_ab score ^d	
UYBN151	Pseudomonas	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> ^T	S000013342	0,996	0,984	
		<i>Pseudomonas sp.</i> G10.5(2011)	S004090610	1	0,994	
UYBN170		<i>Pseudomonas rhodesiae</i> ^T	S000013342	0,996	0,982	
		<i>Pseudomonas rhodesiae</i> W5AF31	S003290705	1	0,996	
UYBN174		<i>Pseudomonas viridiflava</i> ^T	S000400225	0,999	0,977	
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> ABAC43	S003805898	1	0,991	
UYBN182		<i>Pseudomonas viridiflava</i> ^T	S000400225	0,996	0,979	
		<i>Pseudomonas sp.</i> PCa2bi	S003754134	0,998	0,998	
UYBN208		<i>Pseudomonas viridiflava</i> ^T	S000400225	0,996	0,985	
		<i>Pseudomonas sp.</i> PCa2bi	S003754134	0,998	0,999	
UYBN221		<i>Pseudomonas viridiflava</i> ^T	S000400225	0,996	0,978	
		<i>Pseudomonas sp.</i> PCa2bi	S003754134	0,998	0,985	
UYBN163		SD	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> ^T	S000013342	0,957	0,826
			<i>Pseudomonas sp.</i> 22(2015)	S004483757	0,986	0,862
UYBN200	SD	<i>Lelliottia amnigena</i> ^T	S000381744	0,995	0,943	
		<i>Enterobacter aerogenes</i> IEY	S001551074	0,999	0,979	
UYBN223	Pantoea	<i>Pantoea agglomerans</i> ^T	S000016079	0,991	0,933	
		<i>Pantoea sp.</i> AnA5.1	S004450560	0,993	0,949	
UYBN204	Arthrobacter	<i>Arthrobacter humicola</i> ^T	S000749604	0,999	0,962	
		<i>Arthrobacter sp.</i> BJC15-A20	S003614797	1	0,987	

Classifier” (Tabla 4.4). ^bPara cada aislamiento se presenta la cepa ambiental y la cepa tipo con mayor similitud. ^cÍndice de identidad ^dÍndice de cobertura

4.4. Ensayos de respuesta de plantas de canola a la inoculación con PEB en condiciones gnotobióticas

La evaluación de la respuesta de plantas de canola fue realizada mediante la inoculación con los aislamientos seleccionados por sus características PCV *in vitro* (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Características PCV de los aislamientos utilizados en el ensayo de inoculación de plantas de canola del cultivar Igranola103.

Aislamiento bacteriano	<i>nifH</i>	AIA	SID	Sol K	Sol P	Género asignado*
UYBN151	+	+	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
UYBN170	+	+	+	-	+	
UYBN174	+	+	-	-	-	
UYBN182	+	+	+	-	+	
UYBN208	+	+	+	-	+	
UYBN221	+	+	-	-	+	
UYBN163	+	+	+	-	+	SD
UYBN200	+	+	-	-	+	SD
UYBN223	+	+	-	-	+	<i>Pantoea</i>
UYBN204	+	+	-	-	-	<i>Arthrobacter</i>

Se indican resultados positivos (+) o negativos (-) para los mecanismos PCV: presencia del gen *nifH* (*nifH*), producción de ácido indolacético (AIA), producción de sideróforos (SID), solubilización de potasio (Sol K) y fosfatos (Sol P). *Géneros asignados mediante la herramienta "RDP Classifier" (Tabla 4.4).

A los 28 días post inoculación (Figura 4.4A), se cosechó el ensayo y se realizaron los registros biométricos (longitud de la raíz y del tallo) y se determinó el peso seco total para cada tratamiento (Figura 4.4B, Tabla 4.7). A continuación, se compararon las medias de las variables biométricas de los tratamientos en relación con el control (sin inocular ni fertilizar) mediante un análisis de varianza (Kruskal Wallis) (Tabla 4.7).



Figura 4.4. Vista del ensayo de inoculación de plantas de canola con aislamientos PEB en condiciones gnotobióticas. **A:** Plantas de canola creciendo en condiciones gnotobióticas e inoculadas con aislamientos seleccionados. **B:** Medición de longitud de raíz y tallo al finalizar el ensayo.

Los resultados mostraron que el tratamiento con la cepa UYBN151 se diferenció significativamente del control ($p < 0.01$), con incremento de las tres variables biométricas analizadas. Asimismo, el tratamiento con la cepa UYBN204 mostró un incremento significativo ($p < 0.01$) en la longitud de la raíz principal y un mayor peso seco ($p < 0.1$). Por último, el control con fertilización no se diferenció del control sin fertilizar en cuanto a la longitud de la raíz (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Medias de las variables biométricas de plantas de canola inoculadas con aislamientos de PEB seleccionados

Tratamiento	Peso seco (mg)	Longitud Tallo (cm)	Longitud Raíz (cm)
<i>Pseudomonas sp.</i> UYBN151	20,2***	8,7***	15,8***
UYBN163	16,9	7,6	13,2
<i>Pseudomonas sp.</i> UYBN170	16,9	7,7	11,0
<i>Pseudomonas sp.</i> UYBN174	14,3	7,1	9,2
<i>Pseudomonas sp.</i> UYBN182	-	7,5	10,5
UYBN200	17,1	7,6	13,2
<i>Arthrobacter sp.</i> UYBN204	19,0*	7,4	15,7***
<i>Pseudomonas sp.</i> UYBN208	14,7	7,3	12,6
<i>Pseudomonas sp.</i> UYBN221	-	7,1	11,1
<i>Pantoea sp.</i> UYBN223	15,0	7,2	12,8
Control con fertilización	31,0***	11,1***	9,6
Control sin fertilizar	16,3	6,8	11,9

Los asteriscos representan diferencias significativas con el control negativo (* $p < 0.1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$).

5. DISCUSIÓN

5.1. PEB nativos asociados a variedades de canola cultivadas en Uruguay

El presente trabajo es la primera contribución a nivel nacional en conocimiento sobre BPCV asociadas a variedades comerciales de canola, con énfasis en PEB. El potencial biotecnológico que supone el aislamiento y estudio de BPCV nativas radica en que es el punto de partida para el desarrollo a mediano y largo plazo de formulaciones de inoculantes bacterianos que permitan mejorar la sustentabilidad de los cultivos. En el presente estudio, se trabajó con dos cultivares de importancia estratégica para Uruguay, Igranola103 y Trapper. Si bien existen investigaciones previas en otros países, donde se aislaron bacterias rizosféricas y endófitas asociadas a canola (Germida et al. 1998; A. Misko & Germida 2002; Poonguzhali et al. 2006; Farina et al. 2012; Nejad & Johnson 2000; Sheng et al. 2008), los objetivos de dichas investigaciones, así como la metodología utilizada (ej: medios, condiciones de oxígeno, etc) difieren de los usados aquí.

En el presente trabajo se buscó obtener una colección enriquecida en diazótrofos, para lo cual se utilizaron distintos medios y condiciones de oxígeno. La posibilidad de crecer en condiciones de microaerobiosis podría estar vinculada al hábito endofítico de los aislamientos, lo cual contribuiría al éxito en la colonización de los diferentes órganos de la planta (Malfanova et al. 2013; Hardoim et al. 2008) y sería una característica deseable ante posibles aplicaciones biotecnológicas.

Mediante la metodología empleada fue posible obtener una cantidad similar de aislamientos a partir de los distintos cultivares de canola, Trapper e Igranola103. El aislamiento y recuento de PEB debe ser idealmente realizado de forma inmediata a la colecta de las plantas para evitar alteraciones en la composición de la comunidad bacteriana (Hardoim et al. 2008). En el momento en que se efectuó el recuento de PEB, no se obtuvo colonias de bacterias para todas las condiciones (Tabla 4.2). De acuerdo a estudios previos en que se cuantificaron las poblaciones de endófitos (Kuklinsky-Sobral et al. 2004; Sessitsch et al. 2002), se esperaría una mayor concentración de PEB en raíz respecto a tallo y en medio TSA en comparación con NFCC (de los Santos et al. 2016), así como en condiciones de aerobiosis en comparación con microaerofilia (Heijo 2015). Si bien estas tendencias no fueron observadas en todos los casos, los números se encuentran en el orden de lo reportado previamente para poblaciones de endófitos.

A pesar de los pocos estudios de BPCV asociadas a canola (fundamentalmente a nivel de la rizósfera) existe un conjunto de evidencias que sugieren que el factor determinante de la comunidad endofítica es el cultivar (Germida et al. 1998; Farina et al. 2012; Houlden et al. 2008; Smalla et al. 2001). Germida y colaboradores aislaron a partir del cultivar Westar, 300 bacterias del rizoplano y 220 asociadas a raíz (PEB), provenientes de tres sitios diferentes. Si bien los sitios presentaban diferencias en la composición y estructura del suelo, las comunidades no se diferenciaron entre sitios (Germida et al. 1998). En un estudio más reciente, en el cultivar Hyola 60, se buscó aislar e identificar bacterias cultivables del suelo, de la rizósfera y asociadas a raíces de canola (PEB), con el fin de detectar cambios en las comunidades microbianas en

distintas etapas de la rotación y crecimiento del cultivo. Los resultados de estas aproximaciones mostraron cambios en las comunidades bacterianas asociadas al estadio de crecimiento de las plantas, con una mayor diversidad en la etapa de roseta, es decir, cuando la planta presenta numerosas hojas dispuestas en entrenudos muy cortos, previo a la elongación de los entrenudos (Farina et al. 2012). Este efecto, que ha sido propuesto como un efecto rizosférico dependiente del estadio fenológico de la planta (Houlden et al. 2008) no es necesariamente igual en distintos cultivares, ya que difiere del observado por Smalla y colaboradores, que observaron que el enriquecimiento mayor se produce en la etapa de floración. Sin embargo, en dicho caso se utilizó el cultivar Licosmos (Smalla et al. 2001).

5.2. Características PCV de la colección de aislamientos obtenida

El análisis *in vitro* de los MPCV permitió obtener una aproximación sobre el potencial de la colección como fuente de BPCV nativas. De las características PCV evaluadas para el total de la colección, la que se vio más representada fue la producción de sideróforos (aprox. 32% de la colección), seguida de la solubilización de fosfatos (aprox. 26% de la colección). En cambio, la solubilización de potasio estuvo poco representada en la colección (aprox 6%).

En una colección de bacterias cultivables asociadas a canola de 308 aislamientos, también se realizó una búsqueda de MPCV. Dicho trabajo incluyó la detección de la producción de sideróforos y solubilización de fosfatos con una metodología similar. Como resultado obtuvieron un 35% de aislamientos

productores de sideróforos y un 31% de solubilizadores de fosfatos, similar a los resultados aquí reportados. Se reportó además una gran producción de compuestos indólicos, con un 98% de aislamientos que produjeron al menos cierta cantidad (Farina et al. 2012).

En el presente trabajo, de los 191 aislamientos evaluados para la producción de AIA, un 37% presentó producción *in vitro* de esta fitohormona. Este porcentaje es menor que el de una colección obtenida previamente en nuestro grupo de trabajo, en el que un 68% de PEB obtenidos de caña de azúcar presentaban este MPCV (Taulé 2011) y mayor que el de otras colecciones del grupo, con un 18% y 17% de PEB provenientes de sorgo dulce (Heijo 2015, Mareque et al. 2015) y un 8% de PEB obtenidos de festuca (de los Santos et al. 2016).

Por otra parte, de 116 aislamientos evaluados para la presencia del gen *nifH*, el 36% presentó amplificación del gen en las condiciones evaluadas. Este porcentaje es menor al de una colección de PEB de nuestro equipo, obtenida con una estrategia similar, en la que se obtuvo un 56% de PEB que amplificaron el gen (Heijo 2015) y mayor que el de otras colecciones del laboratorio, en las que un 30% (Mareque et al. 2014), un 17% (Taulé et al. 2012) y un 12% (de los Santos et al. 2016) de los PEB presentaron el gen. La amplificación del gen *nifH* no garantiza que la bacteria sea capaz de fijar nitrógeno, debido a que el operón implicado puede no expresarse *in vivo*. Para comprobar que la enzima nitrogenasa es expresada y está activa se deben realizar ensayos de actividad nitrogenasa *in vivo*, tal como el ensayo de reducción de acetileno (“acetylene reduction assay”, ARA) (Boddey & Knowles 1987).

5.3. Identificación de aislamientos de la colección

La selección de aislamientos de interés de la colección se realizó teniendo en cuenta dos MPCV de gran relevancia: la FBN y la producción de AIA. La FBN es crucial para el ciclo del nitrógeno, siendo el elemento más limitante para el crecimiento de las plantas. Asimismo, el AIA juega un papel importante en el desarrollo radicular, así como en el diálogo molecular que se establece en la relación planta-bacteria, afectando diversos aspectos del desarrollo de la planta (Lugtenberg et al. 2013).

La identificación a nivel de género, hecha a partir de la amplificación y secuenciación del gen *ARNr 16S*, y posterior comparación con la base de datos del RDP, permitió identificar a 8 de los 10 aislamientos analizados con un nivel de confianza >95%. Cabe destacar que los 3 géneros obtenidos: *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Arthrobacter*, han sido previamente reportados en estudios de PEB asociados a cultivos de canola (Germida et al. 1998; Misko & Germida 2002; Farina et al. 2012) y otros cultivos de interés agronómico (Malfanova et al. 2013; Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Ryan et al. 2008; Chelius & Triplett 2000; Sziderics et al. 2007; Verma et al. 2004; Mareque et al. 2015; Romero et al. 2014; Asis & Adachi 2004; Kuklinsky-Sobral et al. 2004; Li et al. 2008; Johnston-Monje 2011; Montañez et al. 2012; de los Santos et al. 2015; Heijo 2015; Taulé et al 2012).

En el caso del género *Pseudomonas*, se han descrito numerosas BPCV, entre ellas endófitas (Malfanova et al. 2013; Misko & Germida 2002). Si bien los aislamientos identificados fueron una pequeña fracción de la colección, el hecho

de que 6 de los 8 pertenezcan a *Pseudomonas* podría ser un indicio de la aptitud y potencial biotecnológico que posee este género, o bien que por su crecimiento rápido tienden a dominar en las placas de aislamiento, inhibiendo o no permitiendo el crecimiento de otras colonias. Se ha reportado su hábito endofítico en numerosas especies de plantas (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Ryan et al. 2008), incrementando el acceso a nutrientes esenciales y modulando respuestas fisiológicas que promueven el crecimiento de éstas. Además, por su crecimiento rápido y gran diversidad metabólica, el género *Pseudomonas* presenta ventajas en cuanto a su potencial como biofertilizante o inóculo bacteriano con fines de control biológico u otros MPCV (Misko & Germida 2002).

Los géneros restantes identificados, *Arthrobacter* y *Pantoea*, también han sido reportados como probables endófitos e incluso endófitos verdaderos (Ryan et al. 2008). El género *Arthrobacter* se ha sido descrito como PEB en plantas de maíz (Chelius & Triplett 2000) y morrón (Sziderics et al. 2007) y también en canola (Germida et al. 1998). En el caso de *Pantoea*, se ha encontrado como PEB asociados a cultivos agrícolas tales como tomate, papa, soja, arroz, sorgo y maíz (Verma et al. 2004; Mareque 2014; Romero et al. 2014; Asis & Adachi 2004; Kuklinsky-Sobral et al. 2004; Li et al. 2008; Johnston-Monje 2011; Montañez et al. 2012) y también a canola (Farina et al. 2012; Granér et al. 2003).

5.4. PCV de plantas de canola inoculadas con PEB

A partir del ensayo de inoculación de plantas de canola con los 10 aislamientos seleccionados, fue posible identificar dos aislamientos cuyos

tratamientos se diferenciaron de manera significativa en las medidas biométricas analizadas. Para el tratamiento en el cual se evaluó como inoculante la cepa *Pseudomonas sp.* UYBN151, los resultados mostraron un aumento del peso seco del 23,9% ($p < 0,01$); de la longitud del tallo en un 27,9% ($p < 0,01$), y de la longitud de la raíz principal de un 32,8% ($p < 0,01$), con respecto al control sin inocular ni fertilizar. En cambio, en el tratamiento con *Arthrobacter sp.* UYBN204, hubo diferencias significativas en longitud de raíz principal ($p < 0,01$), con un incremento del 31,9% y en peso seco ($p < 0,1$) de 16,6%, con respecto al control sin inocular ni fertilizar, lo cual muestra un efecto de PCV *in vivo* en las condiciones ensayadas.

El efecto PCV en plantas de canola ha sido especialmente reportado en cepas endófitas pertenecientes fundamentalmente al género *Pseudomonas*. Entre los mecanismos involucrados en la PCV en condiciones gnotobióticas, se citan la producción de citoquininas y AIA para las cepas de *Pseudomonas fluorescens* G20-18 (García de Salamone et al. 2001) y la endofítica 6-8 (Hynes et al. 2008), habiéndose confirmado con mutantes, *in vivo*. Para esta última cepa también se confirmó su hábito endofítico (Pallai et al. 2012). También mediante mutantes, en condiciones gnotobióticas, inoculando la cepa endofita *Pseudomonas putida* GR12-2 se evaluó la PCV en canola, lechuga, tomate, cebada, trigo y avena. Salvo en trigo y avena, se expresó PCV vinculado a la inhibición de producción de etileno (Hall et al. 1996).

Finalmente, teniendo en cuenta que con los tratamientos con los aislamientos UYBN151 y UYBN204 la longitud de la raíz principal fue mayor, en comparación con las plantas sin inocular (fertilizadas y sin fertilizar), se propone que estos PEB contribuyen a una mejor exploración radicular del sustrato en

condiciones limitantes de nitrógeno. Este efecto podría estar vinculado a la producción de AIA por parte del endófito. Asimismo, el incremento de las demás variables biométricas podría deberse a un efecto sinérgico de diversos MPCV (Malfanova 2013; Lugtenberg et al. 2013; Mei & B. Flinn 2010). No obstante, desde el punto de vista productivo la variable biométrica más relevante a medir sería la producción de grano, por ser la materia prima utilizada en la producción de biodiesel. Esta variable no podía ser medida en el presente trabajo, ya que únicamente se evaluó la PCV en condiciones gnotobióticas, a los 28 días de sembradas, es decir, en los estadios iniciales de la planta. Para evaluar la producción de grano sería necesario emplear otro método de cultivo de la canola, ya sea en invernáculo o a campo para llegar a dicho estadio fenológico.

5.5. Conclusiones

El presente trabajo representa la primera contribución a nivel nacional en cuanto al estudio de bacterias nativas asociadas al cultivo de canola. Fue posible desarrollar las diferentes etapas planteadas: se construyó una colección de 333 PEB asociados a los cultivares Trapper e Igranola103, la cual fue caracterizada parcialmente desde el punto de vista bioquímico, genético y fisiológico. Se seleccionaron 10 aislamientos por su potencial PCV *in vitro* y dos de ellos, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Arthrobacter*, demostraron promover el crecimiento vegetal de plantas de canola del cultivar Igranola103, *in vivo*.

A partir de estos resultados y sus implicancias, es posible vislumbrar un potencial biotecnológico en el uso de endófitos bacterianos, para la obtención de sistemas de producción de canola sustentables.

6. PERSPECTIVAS

La cantidad de aislamientos obtenidos en la colección constituye un buen punto de partida para futuras investigaciones. Se podría completar las caracterizaciones efectuadas de forma parcial (*nifH* y AIA) y profundizar en los MPCV más relevantes, como la FBN, ejemplo, mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA). Asimismo, sería aconsejable aislar PEB de semillas de canola, debido a la capacidad que tendrían de transmitirse verticalmente de una generación a otra. Una vez completado el estudio *in vitro* de MPCV se debería confirmar su efecto PCV mediante ensayos de inoculación en condiciones gnotobióticas y en invernáculo y a campo. Otros MPCV de relevancia agronómica podrían tener un gran potencial biotecnológico, como el control biológico (Malfanova 2013) y la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Taghavi et al. 2009; Weilharther et al. 2011).

Sería importante confirmar los MPCV que están actuando y en qué condiciones se expresan en la interacción planta-bacteria, para su aplicación biotecnológica. Por ejemplo, mediante ensayos en condiciones gnotobióticas y de invernáculo con cepas mutantes para distintos MPCV, observando qué sucede con la PCV.

Para la producción de un bioinoculante basado en estas BPCV, es de gran importancia saber cómo utilizan las diferentes fuentes de carbono, debido a que, al producir a escala industrial un inóculo bacteriano, es importante conocer su plasticidad metabólica para tomar decisiones acertadas y económicas en cuanto a las condiciones de cultivo empleadas. Por lo tanto, se podría evaluar distintas fuentes de C y N para el crecimiento de estas bacterias.

Asimismo, para los dos aislamientos que mostraron PCV en este estudio, se podría corroborar su hábito endofítico mediante técnicas de microscopía, así como su efectividad en condiciones de invernáculo y a campo. También el efecto PCV mediante inoculación cruzada (bacterias provenientes de diferentes cultivares), en especial en Rivette, por ser el cultivar más comúnmente plantado en Uruguay. Asimismo, se podría evaluar el efecto de coinocular varias bacterias en simultáneo.

ANEXO 1

Las plantas de canola y suelo del sitio fueron colectados en la primavera del año 2014. En la Tabla A1 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los suelos y en la Tabla A2 el historial de producción de los mismos.

Tabla A1. Características fisicoquímicas de los suelos provenientes de los predios de Soriano y Río Negro.

Sitio	pH (H ₂ O)	N %	C. Org %	Ca meq/100g	Mg meq/100g	K meq/100g	Na meq/100g
Soriano	5,7	0,22	1,80	9,9	2,0	0,54	0,21
R. Negro	6,1	0,13	1,45	15,3	3,1	0,59	0,31
Sitio	A.Tit. meq/100g	ClCpH ₇ meq/100g	Bases T. meq/100g	% Sat Bases	N-NH ₄ µg N/g	Bray I µg N/g	Fe mg/Kg
Soriano	5,3	17,9	12,6	70,4	5,7	7,4	186,7
R. Negro	3,5	22,8	19,3	84,7	5,9	9,2	63,9
Sitio	Textura (Familia Textural)						
	% Arena	% Limo	% Arcilla	Clasificación			
Soriano	16	51	33	Limo arcilloso			
R. Negro	21	36	43	Limo arcilloso			

Tabla A2. Historial de producción de los predios.

Sitio	Cultivar (cv.) de canola*	Historial de producción según temporada		
		Verano 2013	Invierno 2013	Verano 2014
Soriano	Igranola103	Soja*	Barbecho	Soja*
Río Negro	Trapper	Soja*	Trigo	Soja*

*Cultivo realizado en siembra directa.

ANEXO 2

Medios de cultivo y soluciones empleadas

Medio TSA y TSB	
TSB - Tryptic Soy Broth (Difco)	15 g
Agua desionizada	c.s.p. 1,0 L
Observación: el medio de cultivo TSA se prepara agregando 15 g/L de agar al TSB	
Medio NFCC	
<i>Medio Base</i>	
Ácido Málico	5,0 g
NaOH	4,7 g
K₂PO₄	0,1 g
KH₂PO₄	0,4 g
MgSO₄.7H₂O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl₂	20 mg
FeCl₃	10 mg
NaMoO₄.2H₂O	2,0 mg
Azul de Bromotimol	2,5 mg
Agua Desionizada	c.s.p. 1,0 L
<i>Fuentes de Carbono</i>	
Glucosa	2,50 g
Acetato de sodio	2,46 g
Piruvato de sodio	2,53 g
pH = 6,8	
Solidificante: Gellan Gum	20 g/L (sólido); 1,0 g/L (semisólido)
Medio DYGS (para AIA)	
Glucosa	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona	1,5 g
Extracto de levadura	2,0 g
K₂HPO₄	0,5 g
MgSO₄.7H₂O	0,5 g
Ácido glutámico	1,5 g
Agua desionizada	c.s.p. 1,0 L
pH = 6,5	
Reactivo de Salkowsky	
FeCl₃.6H₂O 0,5 M	1 mL
HClO₄ 35% p/v	50 mL

Medio CAS	
Medio Base	
Solución salina*	100 mL
PIPES	30,24 g
Extracto de levadura desferrado	1,0 g
MgCl ₂ 1 M	1 mL
CaCl ₂ 0,1 M	1 mL
Manitol	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua desionizada	748 mL
*Solución Salina	
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Agua desionizada	c.s.p. 100 mL
Solución colorante	
CAS	60,48 g
Agua desionizada	59mL
Preparación	
<p>-Se agregó 10 mL de Glucosa 20% p/v estéril al Medio Base</p> <p>-Se mezcló la solución colorante con 1 mL de FeCl₃.6H₂O (135mg/50mL en HCl 0,01 N), en agitación, agregándose gota a gota en una solución de HDTMA (72,88 mg/40 mL en agua desionizada)</p> <p>-Se mezclan las dos soluciones obtenidas anteriormente al momento de preparar las placas.</p>	

Medio NBRIP	
Glucosa	10,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
Agar	15 g
Agua desionizada	c.s.p. 1,0 L
Medio Aleksandrov	
Sacarosa	10 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CaCO ₃	1 g
Agar	15 g
Agua desionizada	c.s.p. 1,0 L
Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 1X	
Tris-Acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

Medio Jensen	
CaHPO₄	1,0 g
K₂HPO₄	0,2 g
MgSO₄.7H₂O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl₃/FeCl₃.6H₂O	0,1/0,16 g
Solución de micronutrientes*	1,0 mL
Agar	8 g
Agua desionizada	c.s.p. 1,0 L
pH 6,8-7,0	
*Solución de micronutrientes	
H₃BO₃	2,86 g
MnSO₄.H₂O	2,03 g
ZnSO₄.7H₂O	0,22 g
CuSO₄.5H₂O	0,08 g
Na₂MoO₄	0,14 g
Agua desionizada	c.s.p. 1,0 L

BIBLIOGRAFÍA

- Asis, C.A. & Adachi, K., 2004. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, 38(1), pp.19-23.
- Avakyan, Z.A., Pivovarova, T.A. & Karavaiko, G.I., 1986. Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Microbiology*, 55(3), pp.369-374.
- Barriuso, J. et al., 2008. Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Microbial Ecology*, p.1.
- Bastián, F. et al., 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation*, 24(1), pp.7-11.
- Bhattacharjee, R.B., Singh, A. & Mukhopadhyay, S.N., 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(2), pp.199-209.
- Boddey, R.M. & Knowles, R., 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 6(3), pp.209-266.
- Bozcali, E. et al., 2009. Effects of erucic acid supplemented feeding on chronic doxorubicin toxicity in rats. *Int J Clin Exp Med*, 2, pp.337-347.
- Browne, P. et al., 2013. Molecular-Based Strategies to Exploit the Inorganic Phosphate-Solubilization Ability of *Pseudomonas* in Sustainable Agriculture. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 615-628.
- Browne, P. et al., 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology*, 43(1), pp.131-138.
- de Bruijn, F., 2015. Introduction. En *Biological Nitrogen Fixation*, de Bruijn, ed., John Wiley & Sons, pp. 1-4.
- de Bruijn, F., 2015. Biological Nitrogen Fixation. En *Principles of Plant-Microbe Interactions*, B. Lugtenberg, ed., Springer International Publishing, pp. 215-224.
- Castro, R.O. & Bucio, J.L., 2013. Small Molecules Involved in Transkingdom Communication between Plants and Rhizobacteria. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 295-307.
- Castroviejo, S. et al., 1993. *Flora iberica Vol. IV CRUCIFERAE-MONOTROPACEAE*, Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Charest, M.H., Beauchamp, C.J. & Antoun, H., 2005. Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2), pp.219-227.
- Chavanne, C.G., 1937. Procédé de transformation d'Huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants. *Belgian patent*, 422.
- Chavanne, C.G., 1943. Sur un mode d'utilisation possible de l'huile de palme à la fabrication d'un carburant lourd (A method of possible utilization of palm oil for the manufacture of a heavy fuel). *Bull. Soc. Chim.*, 10, pp.52-58.
- Chelius, M., Triplett, E., 2000. Diazotrophic endophytes associated with maize, in: Triplett, E. (Ed.), *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*. HORIZON SCIENTIFIC PRESS, pp. 779–791.
- Chi, F. et al., 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), pp.7271-8.
- Cole, J.R. et al., 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1).
- Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), pp.669-678.

- Drogue, B. et al., 2013. Control of the Cooperation Between Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Crops by Rhizosphere Signals. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 279-293.
- Farina, R. et al., 2012. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Applied Soil Ecology*, 55, pp.44-52.
- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1), pp.35-59.
- Garcez, C.A.G. & Vianna, J.N.S., 2009. Brazilian Biodiesel Policy: Social and environmental considerations of sustainability. *Energy*, 34(5), pp.645-654.
- Germida, J. et al., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1), pp.43-50.
- Gordon, S.A. & Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), pp.192-195.
- Granér, G. et al., 2003. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 224(2), pp.269-276.
- Hall, J.A. et al., 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Israel Journal of Plant Sciences*, 44(1), pp.37-42.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. & Elsas, J.D. van, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), pp.463-471.
- Heijo, G., 2015. *Construcción y caracterización de una colección bacteriana de probables endófitos diazotófos nativos asociados a plantas adultas de la variedad M81E de sorgo dulce (Sorghum bicolor (L.) Moench)*. Tesis de Grado, Universidad de la República.
- Houlden, A. et al., 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), pp.193-201.
- Hurek, T. et al., 2002. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 15(3), pp.233-242.
- Hynes, R.K. et al., 2008. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(4), pp.248-258.
- Igual, J.M. et al., 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21, pp.561-568.
- Johnston-Monje, D.-M., 2011. *Microbial Ecology of Endophytic Bacteria in Zea Species As Influenced By Plant Genotype, Seed Origin, and Soil Environment*. University of Guelph.
- Kamilova, F. et al., 2006. Organic Acids, Sugars, and I-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), pp.250-256.
- Kim, K.Y., Jordan, D. & McDonald, G., 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), pp.995-1003.
- Kuklinsky-Sobral, J. et al., 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6(12), pp.1244-1251.
- Lambrecht, M. et al., 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in microbiology*, 8(7), pp.298-300.
- Lee, S. et al., 2004. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis Is Deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* Strains with Mutations in Cytochrome c Biogenesis Genes. *Journal of Bacteriology*, 186(16), pp.5384-5391.
- Lemanceau, P. et al., 2013. Reciprocal Interactions between Plants and Fluorescent

- Pseudomonads in Relation to Iron in the Rhizosphere. En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1181-1189.
- Li, J.H. et al., 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), pp.238-246.
- Lin, L. et al., 2011. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*, 88(4), pp.1020-1031.
- de los Santos, M.C. et al., 2016. Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Annals of Microbiology*, 66(1), pp.329-342.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63(1), pp.541-556.
- Lugtenberg, B.J.J. et al., 2013. Plant Growth Promotion by Microbes. En F. J. de Bruijn, ed. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Vol 2*. John Wiley and Sons, Inc, p. 561.
- Mahmulul, H.M. et al., 2017. Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72(April 2016), pp.497-509.
- Malfanova, N., 2013. *Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities*. Tesis de Doctorado, Leiden University.
- Malfanova, N., Lugtenberg, B. & Berg, G., 2013. Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there? En F. J. de Bruijn, ed. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley and Sons, pp. 393-403.
- Mareque, C., 2014. *Caracterización de la población endófito bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce*. Tesis de Maestría, Universidad de la República.
- Mareque, C. et al., 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*, 65(2), pp.1057-1067.
- Masclaux-Daubresse, C. et al., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*, 105(7), pp.1141-57.
- Masclef, A., 1891. *Atlas des plantes de France: utiles, nuisibles et ornementales*, Klincksieck.
- Masson-Boivin, C. et al., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10), pp.458-466.
- McCully, M.E., 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology*, 28(9), pp.983-990.
- Mei, C. & Flinn, B., 2010. The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(1), pp.81-95.
- Mirza, B.S. & Rodrigues, J.L.M., 2012. Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), pp.5542-5549.
- Misko, A. & Germida, J., 2002. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3), pp.399-407.
- Montañez, A. et al., 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, pp.21-28.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), pp.265-270.
- Navarro, L. et al., 2006. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science*, 312(5772), pp.436-439.

- Nejad, P. & Johnson, P. a, 2000. Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and Wilt Disease Suppression in Oilseed Rape and Tomato. *Biological Control*, 18, pp.208-215.
- Oteino, N. et al., 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6, p.745.
- Pallai, R. et al., 2012. Phytohormone production and colonization of canola (*Brassica napus* L.) roots by *Pseudomonas fluorescens* 6-8 under gnotobiotic conditions. *Canadian journal of microbiology*, 58(2), pp.170-8.
- Parmar, P. & Sindhu, S.S., 2013. Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3(1), pp.25-31.
- Plant Biosafety Office, 1994. Biology Document The Biology of *Brassica napus* L. (Canola/Rapeseed). *Canadian Food Inspection Agency*, 8(September), pp.1-16.
- Poly, F. et al., 2001. Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), pp.2255-2262.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. & Sa, T., 2006. Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. *Plant and Soil*, 286(1-2), pp.167-180.
- Pousa, G.P.A.G., Santos, A.L.F. & Suarez, P.A.Z., 2007. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, 35(11), pp.5393-5398.
- Ramos, C., 1996. Effect of agricultural practices on the nitrogen losses to the environment. *Fertilizer Research*, 43(1-3), pp.183-189.
- Reinhold-Hurek, B. & Hurek, T., 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17, pp.29-54.
- RODRIGUES NETO, J. & MALAVOLTA JÚNIOR, V VICTOR, O., 1986. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas capestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12(1/2), p.16.
- Romero, F.M. et al., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 351(2), pp.187-194.
- Rosconi, F. et al., 2013. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environmental microbiology*, 15(3), pp.916-27.
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), pp.827-837.
- Ryan, R.P. et al., 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), pp.1-9.
- Schulz, B.J.E. & Boyle, C.J.C., 2006. What are Endophytes? En B. Schulz, C. Boyle, & T. N. Sieber, eds. *Microbial Root Endophytes*. Soil Biology. Berlin: Springer, pp. 1-13.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(160), pp.47-56.
- Sessitsch, A. et al., 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), pp.23-32.
- Sevilla, M. et al., 2001. Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and 15 N 2 Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif- Mutant Strains. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(3), pp.358-366.
- Sheng, X.F. et al., 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, 156(3), pp.1164-1170.

- Silva, L.F.L. e et al., 2017. Energy balance of biodiesel production from canola. *Ciência Rural*, 47(2), pp.1-6.
- Smalla, K. et al., 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), pp.4742-51.
- Smyth, E., 2011. Selection and analysis of bacteria on the basis of their ability to promote plant development and growth. University College Dublin.
- Spaepen, S. & Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), pp.1-13.
- Spaepen, S. & Vanderleyden, J., 2014. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), pp.1-14.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp.425-448.
- Sziderics, A.H. et al., 2007. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 53(11), pp.1195-1202.
- Taghavi, S. et al., 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and environmental microbiology*, 75(3), pp.748-757.
- Taulé, C., 2011. *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción*. Tesis de Maestría, Universidad de la República.
- Taulé, C. et al., 2012. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, 356(1-2), pp.35-49.
- Taulé, C., Castillo, A., Villar, S., Olivares, F. & Battistoni, F. (2016). Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant and Soil*. 403.
- U.S. EPA, 2010. Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis. *Program*, 1109 pp.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C. & Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), pp.423-447.
- Vansuyt, G. et al., 2007. Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), pp.441-447.
- Vera, M. et al., 2014. Resultados experimentales de colza en Uruguay. I Simpósio Latino Americano de Canola. Passo Fundo, RS, Brasil
- Verma, S.C. et al., 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters*, 26(5), pp.425-429.
- Verma, S.C., Ladha, J.K. & Tripathi, A.K., 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of biotechnology*, 91(2-3), pp.127-141.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), pp.571-586.
- Vincent, J.M., 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*, Blackwell Scientific Publications, 164 pp.
- Wang, Q. et al., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), pp.5261-5267.
- Weilharter, A. et al., 2011. Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Journal of bacteriology*, 193(13), pp.3383-4.
- Wu, S.C. et al., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and

- AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1), pp.155-166.
- Zapata, N. et al., 2012. Quality of biodiesel and press cake obtained from *Euphorbia lathyris*, *Brassica napus* and *Ricinus communis*. *Industrial Crops and Products*, 38(1), pp.1-5.
- Zhang, H. et al., 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal*, 58(4), pp.568-577.