

Tesina para obtener el título de Licenciada en Bioquímica



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
CIENCIAS

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



**iibce**  
INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS  
CLEMENTE  
ESTABLE

# Evaluación de la capacidad de promover el crecimiento vegetal por bacterias endófitas nativas



**Bach. Matilde Lanza**

Tutora: MSc. Cecilia Taulé

Co-tutor: Dr. Federico Battistoni

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay 2018

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>1. RESUMEN</b> .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1 Bacterias endófitas.....	3
2.2 Interacción endófito bacteriano-planta.....	3
2.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PCV) por endófitos bacterianos .....	6
2.3.1 <i>Mecanismos directos</i> .....	6
2.3.2 <i>Mecanismos indirectos</i> .....	11
2.4 Relevancia de los endófitos y BPCV en la agricultura .....	13
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	16
5.1 Objetivo general .....	16
5.2 Objetivo específico .....	16
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
6.1 Cepas bacterianas y plantas utilizadas en este estudio .....	17
6.2 Caracterización fisiológica de las cepas .....	19
6.2.1 <i>Resistencia a antibióticos</i> .....	19
6.2.2 <i>Compatibilidad entre cepas</i> .....	19
6.3 Ensayos de respuesta de cultivos a la inoculación bacteriana .....	20
6.3.2 <i>Ensayos de respuesta a la inoculación en plantas de sorgo dulce, arroz, maíz y rabanito en condiciones gnotobióticas</i> .....	21
6.3.3 <i>Ensayo de respuesta a la inoculación en plantas de alfalfa en condiciones gnotobióticas</i> .....	22
<i>Compatibilidad entre las cepas en estudio y S. meliloti 242</i> .....	23
<i>Aislamiento e identificación de bacterias presentes en los nódulos de alfalfa</i> .....	23
<i>Aislamiento de endófitos de semillas de alfalfa</i> .....	25
6.3.4 <i>Procesamiento de las plantas y tratamiento estadístico</i> .....	25
<b>7 RESULTADOS</b> .....	27
7.1 Caracterización de las cepas a ensayar como inoculantes.....	27
7.1.1 <i>Resistencia a antibióticos</i> .....	27

7.1.2	<i>Compatibilidad de crecimiento entre las cepas</i> .....	28
7.2	Estudio de la capacidad de promover el crecimiento de diferentes cultivos por las cepas en estudio .....	29
7.2.1	<i>Sorgo dulce var. ADV 2010</i> .....	29
7.2.2	<i>Arroz var. Tacuarí</i> .....	30
7.2.3	<i>Maíz var. NT426</i> .....	31
7.2.4	<i>Rabanito var. Cherry Belle</i> .....	33
7.2.5	<i>Alfalfa var. Crioula</i> .....	35
7.2.5.1	<i>Nodulación de plantas de alfalfa</i> .....	37
7.2.5.2	<i>Aislamiento e identificación de bacterias de nódulos y semillas de alfalfa</i> .....	39
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	42
8.1	Caracterización fisiológica .....	42
8.1.1	<i>Resistencia a antibióticos</i> .....	42
8.1.2	<i>Compatibilidad entre cepas</i> .....	42
8.2	Estudio de la capacidad de PCV en diferentes cultivos por las cepas en estudio .....	43
8.2.1	<i>Promoción del crecimiento en plantas de sorgo dulce</i> .....	44
8.2.2	<i>Promoción del crecimiento en plantas de arroz</i> .....	44
8.2.3	<i>Promoción del crecimiento en plantas de maíz</i> .....	45
8.2.4	<i>Promoción del crecimiento en plantas de rabanito</i> .....	46
8.2.5	<i>Efecto de la inoculación con endófitos bacterianos en plantas de alfalfa</i> .....	46
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	49
<b>10.</b>	<b>ANEXO</b> .....	51
10.1	Medios de cultivo .....	51
10.1.1	<i>Medios de cultivo para bacterias</i> .....	51
10.1.2	<i>Medios de cultivo para plantas</i> .....	52
10.2	Soluciones.....	53
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista del ensayo de compatibilidad entre cepas.....	29
Figura 2. Vista de las plantas de maíz, 30 días post inoculación en el momento de la cosecha.....	33
Figura 3. Vista del ensayo de inoculación bacteriana en plantas de rabanito.....	34
Figura 4. Vista del ensayo de inoculación bacteriana de plántulas de alfalfa, 30 días post inoculación.....	37
Figura 5. Nódulos totales en plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> 242 y co-inoculadas con las cepas en estudio.....	38
Figura 6. Morfología en medio de cultivo YEM con Rojo Congo de las cepas en estudio.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio. ....	18
Tabla 2. Condiciones de esterilización y germinación de las semillas en estudio. ....	21
Tabla 3. Variables biométricas medidas en las plantas estudiadas. ....	26
Tabla 4. Evaluación de la capacidad de las cepas de resistir a distintos antibióticos. ....	28
Tabla 5. Respuesta de plantas de sorgo dulce variedad ADV 2010 a la inoculación bacteriana .....	30
Tabla 6. Respuesta de plantas de arroz variedad Tacuarí a la inoculación bacteriana. ....	31
Tabla 7. Respuesta de plantas de maíz variedad NT426 a la inoculación bacteriana. ....	32
Tabla 8. Respuesta de plantas de rabanito variedad Cherry Belle a la inoculación bacteriana. ....	34
Tabla 9. Respuesta de plantas de alfalfa variedad Crioula a la inoculación bacteriana. ....	36
Tabla 10. Identificación de los aislamientos obtenidos a partir de los nódulos .....	41
Tabla A1. Composición del medio LB .....	51
Tabla A2. Composición del medio YEM con Rojo Congo .....	51
Tabla A3. Composición del medio Jensen .....	52
Tabla A4. Composición de la solución de micronutrientes para el medio Jensen .....	52
Tabla A5. Composición del buffer TAE .....	53

## **ABREVIATURAS**

**ABA:** ácido abscísico

**ACC:** 1- aminociclopropano- 1 carboxilato

**AIA:** ácido indol acético

**BPCV:** bacteria promotora del crecimiento vegetal

**FBN:** fijación biológica de nitrógeno

**PCV:** promoción del crecimiento vegetal

**RSA:** resistencia sistémica adquirida

**RSI:** resistencia sistémica inducida

## 1. RESUMEN

Uno de los problemas que presenta la explotación agrícola moderna es la necesidad de aplicar grandes cantidades de fertilizantes químicos para alcanzar el mayor rendimiento de los cultivos. Sin embargo, la aplicación de fertilizantes causa graves problemas de sustentabilidad económica y ambiental. Esta problemática resalta la importancia de buscar alternativas tecnológicas más sustentables para los sistemas productivos agrícolas. La alternativa que se plantea en este trabajo es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), ampliamente reportadas como benéficas al aplicarse como bioinoculantes en cultivos de interés agronómico.

El presente trabajo tuvo como finalidad profundizar en el estudio de la capacidad de promover el crecimiento vegetal por parte de bacterias endófitas nativas en cultivos de interés agronómico para nuestro país. El desarrollo de la propuesta permitió evaluar un grupo de cuatro cepas provenientes de una colección caracterizada *in vitro*, de bacterias endófitas aisladas de plantas de caña de azúcar. Las cepas fueron: *Pseudomonas* sp. UYSO01, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24. Los resultados mostraron que las cepas evaluadas como inoculantes fueron promotoras del crecimiento vegetal de los cultivos de *Oryzae sativa* (arroz), *Zea mays* (maíz), y *Raphanus sativus* (rabanito), a partir de ensayos de inoculación en condiciones *gnotobióticas*. Los resultados obtenidos sientan las bases para seguir profundizando en el estudio de las respuestas de estos cultivos a la inoculación con las BPCV en futuros ensayos en condiciones de invernáculo y campo, como primer paso para el desarrollo de bioinoculantes.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Bacterias endófitas**

Las plantas y las bacterias han co-evolucionado desarrollando diferentes tipos de interacciones entre ellas, estas pueden ser de tipo comensalistas, mutualistas y/o patogénicas.

Particularmente, las bacterias endófitas son aquellas que colonizan activamente los espacios intercelulares de los tejidos internos de las plantas estableciendo una asociación endosimbiótica, la cual resulta en un beneficio para ambas (Reinhold-hurek & Hurek, 1998). Las bacterias endófitas son aisladas de los tejidos vegetales internos, esterilizados en su superficie y no provocan síntomas de enfermedad en la planta. Para comprobar el estilo de vida endofítico, la bacteria aislada debe tener la habilidad de cumplir los postulados de Koch, debiendo ser capaz de reinfectar al huésped y persistir en él (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). La presencia de la bacteria dentro del tejido de la planta re-inoculada debe ser constatada mediante microscopía empleando anticuerpos específicos o genes reporteros (Reinhold-hurek & Hurek, 1998).

### **2.2 Interacción endófito bacteriano-planta**

Las plantas son colonizadas por diversas bacterias endófitas en sus raíces, hojas, tallos, tejidos vasculares y semillas, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas características que cada tejido presenta (Ramey et al., 2004). Los pasos de colonización de la planta por las bacterias endófitas han sido descritos a partir de estudios mediante técnicas de visualización microscópica y caracterización de mutantes. Se



definen tres etapas principales: (I) colonización del rizoplasma, (II) infección de la planta y (III) colonización del córtex.

### *I Colonización del rizoplasma*

En una primera instancia, los endófitos bacterianos se mueven hacia las superficies de las raíces mediante flagelos guiados por respuestas quimiotácticas. En este sentido, se han reportado diversas moléculas quimioatrayentes presentes en los exudados radiculares y en las semillas, así como en el mucílago de la raíz. Estas incluyen: ácidos orgánicos, aminoácidos, y azúcares (De Weger et al., 1987). Una vez en las raíces, las bacterias se adhieren al rizoplasma como paso fundamental de la colonización endofítica (Malfanova et al., 2013). En primera instancia lo hacen de manera inespecífica (rápida, débil y reversible), para luego colonizar la superficie de forma irreversible, donde intervienen estructuras celulares tales como fimbrias o pilis (Balsanelli et al., 2010; Dörr et al., 1998; Malfanova et al., 2013). Los sitios de la raíz preferentemente colonizados por los endófitos son aquellos en los que hay una activa división celular, incluyendo la coifa de la raíz principal y la zona de emergencia de las raíces laterales, otro sitio de colonización es la zona de la raíz donde se encuentran los pelos radiculares (Compant et al., 2005b; Reinhold-hurek, et al., 2006). Dichos sitios son los sitios de mayor exudación por parte de las raíces. Las bacterias pueden emplear estos compuestos como fuente de nutrientes (Compant et al., 2005b).

Establecidos en estos sitios radiculares, los endófitos bacterianos son capaces de formar biofilms en capa o como agregados. Los biofilms son asociaciones multicelulares de microorganismos secretores de una matriz extracelular polimérica que les permite la adhesión a superficies del ambiente. Las células que viven en dichas asociaciones son fisiológicamente diferentes que las de vida libre (Ramey et al., 2004).

## *II Infección de la planta*

El ingreso a los espacios intercelulares de los tejidos internos de la planta por los endófitos se da por medio de mecanismos pasivos (heridas, estomas, lenticelas), o activos mediante enzimas que hidrolizan la pared celular de las células exodérmicas de la planta (Malfanova et al., 2013). En particular, las celulasas y las pectinasas bacterianas son enzimas fundamentales para degradar la pared celular vegetal de celulosa y la pectina de la lámina intercelular, respectivamente. En este sentido, se ha reportado en la cepa endófito *Azoarcus* sp. BH72, el rol principal de una celulasa del tipo endo-1,4-glucanasa en la colonización e infección de los tejidos de la planta de arroz (Reinhold-hurek & Hurek, 1998).

Es importante resaltar en cuenta que también se da una colonización pasiva de los tejidos internos de la planta a partir de la microbiota presente en las semillas o en los tejidos empleados para la reproducción vegetativa de los cultivos (ej. papa o caña azúcar), así como por vectores como hongos o insectos (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

## *III Colonización del córtex*

Una vez en los tejidos internos de la planta, los endófitos pueden permanecer en el lugar de entrada a la planta o pueden acceder a los espacios intercelulares del córtex y al xilema, para luego transportarse y colonizar hojas, tallos, frutos y semillas (Gasser et al., 2011; Malfanova et al., 2013).

## **2.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PCV) por endófitos bacterianos**

Los endófitos bacterianos establecen relaciones de mutualismo con la planta hospedera: la bacteria se beneficia por la disponibilidad de nutrientes presentes en la planta, mientras que la planta se beneficia por la PCV (Hardoim et al., 2008). Los mecanismos PCV que presentan las bacterias endófitas se clasifican en **directos e indirectos**. Los mecanismos **directos** incluyen: (I) la producción y modulación de fitohormonas; (II) la fijación biológica del N<sub>2</sub>-atmosférico y (III) el aumento de la capacidad de absorción de minerales del suelo (Fe, P, K) cuando se encuentran en su forma rizosférica. Por otra parte, los mecanismos PCV **indirectos** incluyen: (I) la activación de la respuesta inmune de la planta; y (II) el control biológico de fitopatógenos (Hardoim et al., 2008; Rojas-solís et al., 2013).

### **2.3.1 Mecanismos directos**

#### *I- Producción y modulación de fitohormonas*

Los endófitos bacterianos son capaces de modular los niveles hormonales de la planta mediante la síntesis y regulación de diferentes fitohormonas tales como el etileno, ácido abscísico (ABA), giberelinas, auxinas y citoquininas.

El **etileno** es una hormona que es producida en exceso bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, generando un desarrollo anormal de las raíces y como consecuencia repercute en el crecimiento de toda la planta. La enzima 1- aminociclopropano- 1 carboxilato (ACC) desaminasa, presente en ciertas bacterias, provoca un descenso del nivel de etileno mediante la hidrólisis del precursor, el ACC, en alfa-cetobutirato y amonio (Esquivel-

Cote et al., 2013; Hardoim et al., 2008; Mei & Flinn, 2010; Saleem et al., 2007). Como ejemplo de endófitos que presentan este mecanismo de PCV se encuentran las cepas *Pseudomonas putida* GR12-2 y *Pseudomonas fluorescens* TDK1 capaces de promover la elongación de la raíz de plantas de *Brassica napus* (canola) en condiciones *gnotobióticas* y de aumentar el rendimiento de plantas de *Arachis hypogaea* (maní) bajo estrés salino en condiciones de campo (Glick et al., 1995; Saravanakumar & Samiyappan, 2007).

Por su parte, las **giberelinas**, son fitohormonas que promueven el crecimiento de la parte aérea de la planta mediante el aumento de la tasa de división celular (Govindasamy, et al., 2017; Mei & Flinn, 2010). Las cepas *Herbaspirillum seropedicae* Z67 y *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 son ejemplos de endófitos capaces de producir esta fitohormona teniendo efectos de PCV en gramíneas (Bastian et al., 1998). Asimismo, la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* SE370, es productora de giberelinas bioactivas tales como GA1, GA3 y GA4 con las que promueve el crecimiento de *Cucumis sativus* (pepino), *Brassica rapa* y la hierba *Chrysanthemum coronarium* (Kang et al., 2009).

Por otra parte, las concentraciones de auxinas y citoquininas pueden ser afectadas por la producción endógena de las BPCV. Las **auxinas** son fitohormonas vitales para el inicio de la formación y elongación de las raíces laterales y adventicias (Govindasamy et al., 2017). La auxina mejor estudiada en lo que respecta a los mecanismos de PCV es el ácido indol acético (AIA). Esta fitohormona controla procesos fisiológicos diversos como son la diferenciación de tejidos, alargamiento y división celular así como el fototropismo y gravitropismo (Vega-Celedón et al., 2016). Existen diversas rutas metabólicas de síntesis de AIA en bacterias, de las cuales algunas son dependientes de triptófano (Spaepen et al., 2007). También se ha propuesto que el AIA puede actuar como molécula de señalización en bacterias, pudiendo tener efectos en su fisiología (Spaepen et al., 2007). Existe una gran diversidad taxonómica de BPCV productoras de

AIA que incluye muchos de los Firmicutes y Proteobacterias. Como ejemplos se encuentran las cepas *Azospirillum brasilense*, *G. diazotrophicus*, *Burkholderia cepacia*, *P. putida*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus megaterium* (Vega-Celedón et al., 2016).

Las **citoquininas**, por su parte, son un grupo de fitohormonas que promueven la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz y estimulan la síntesis de clorofila retardando la senescencia (Bhore, et al., 2010; Bhore & Sathisha, 2010). Esta función tiene la aplicabilidad de aumentar la vida útil de los vegetales de hojas verdes y de las flores luego de la cosecha (Bhore & Sathisha, 2010). Se han reportado endófitos PCV de la planta medicinal *Gynura procumbens*, productores de citoquinas identificados como *Pseudomonas resinovorans* y *Paenibacillus polymaxa*. En dicho trabajo se propone dicho mecanismo como responsable de la PCV (Bhore et al., 2010).

El **ABA** es una fitohormona que influye en la iniciación y mantenimiento de la dormancia de la semilla, así como en la inhibición del crecimiento y la apertura de los estomas cuando la planta se enfrenta al estrés abiótico. A su vez, esta hormona influye en el desarrollo de la planta por la interacción usualmente antagonista con auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno (Taiz & Zeiger, 2010). El ABA puede contribuir junto con otras moléculas bacterianas, en la regulación de la homeostasis de la planta y respuesta al estrés (Cassán et al., 2011). Un ejemplo de BPCV productora de ABA es la cepa *Azospirillum brasilense* Az39 (Cassán et al., 2011; Perrig et al., 2007).

## *II- Capacidad de fijar biológicamente el N<sub>2</sub>-atmosférico*

Las plantas no pueden hacer uso del nitrógeno atmosférico directamente, utilizan únicamente los iones nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o amonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de N presentes en el suelo (Young, 1992). Se estima que alrededor del 60% del nitrógeno incorporado al suelo en forma de amonio, se debe a la FBN

(Fernández- Pascual et al., 2002). Los beneficios de este proceso se pueden explotar en la agricultura con el fin de reducir y optimizar la aplicación de fertilizantes nitrogenados, permitiendo reducir la contaminación ambiental (Lloret & Martínez-Romero, 2005; Vessey, 2003).

Los diazótrofos bacterianos son aquellos microorganismos capaces de reducir el nitrógeno atmosférico  $N_2$  a amoníaco  $NH_3$ , proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN). Este proceso es exclusivo de procariotas y es el único por el cual es posible adquirir el nitrógeno directamente de la atmósfera. Los microorganismos diazótrofos pertenecen solamente a los *phyla* Euryarchaeota del dominio Archaea y a 5 de los más de 50 *phyla* del dominio Bacteria: las bacterias verdes del azufre, cianobacterias, Spirochaetas, Firmicutes y Proteobacteria (Lloret & Martínez-romero, 2005). Presentan diferentes estrategias de vida y metabolismos que incluyen microorganismos: aerobios, anaerobios, autótrofos heterótrofos, metanótrofos, fijadores de vida libre y en simbiosis (Lloret & Martínez-romero, 2005).

La FBN es mediada por el complejo enzimático nitrogenasa presente en los microorganismos fijadores de nitrógeno. La nitrogenasa mejor caracterizada es la Mo-nitrogenasa. Este complejo está formado por dos metaloenzimas: una homodimérica de menor tamaño, conocida como proteína Fe o dinitrogenasa reductasa (proteína NifH), que funciona como un dador de electrones ATP dependiente. Posteriormente, los electrones pasan al componente mayor heterotetramérico conocido como proteína MoFe o dinitrogenasa (proteínas NifD y NifK) que contiene el sitio catalítico de la enzima (Mus et al., 2018).

La nitrogenasa cataliza la reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$  bajo la reacción general:



Cabe destacar que la actividad de esta enzima es inhibida por el oxígeno. Es por esto que los diazótrofos presentan mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de oxígeno intracelular libre. Dichos mecanismos incluyen estrategias como aumentar la tasa respiratoria, la realización del proceso en compartimentos especializados y/o la protección conformacional donde la nitrogenasa se inactiva de forma reversible (Peters et al., 1995)

### *III- Solubilización de minerales*

El fosfato y el potasio son dos de los macronutrientes esenciales para el crecimiento de los seres vivos. Sin embargo, las concentraciones de P y K biodisponibles en el suelo generalmente son bajas, ya que la mayor proporción de estos minerales se encuentran formando depósitos insolubles (Hu et al., 2006). Estos reservorios insolubles pueden ser solubilizados por microorganismos y de esta forma volverse biodisponibles para el consumo de las plantas (Hu et al., 2006).

El **fósforo** es generalmente el segundo nutriente limitante para el rendimiento de los cultivos luego del nitrógeno. Este elemento se encuentra formando complejos insolubles con cationes de calcio, aluminio y hierro mientras que la planta es capaz asimilarlo solamente bajo las formas  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Vance et al., 2003). Las bacterias solubilizadoras de fosfato operan en la rizósfera secretando ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, glucónico, 2- cetoglucónico, oxálico, cítrico, butírico, malónico, succínico, láctico, málico y fumárico (Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010; Richardson & Simpson, 2011). Existen muchos ejemplos de rizobacterias PCV solubilizadoras de fosfato, uno de ellos es la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 (Kang et al., 2009).

El **potasio** es el tercer nutriente fundamental para las plantas luego del N y P (Basak & Biswas, 2008). Más del 98% del potasio del suelo se encuentra en forma de silicatos. Existen microorganismos que liberan

ácidos orgánicos capaces de romper la red cristalina de este compuesto como la bacteria *Bacillus mucilaginosus* (Sugumaran & Janarthanam, 2007).

Por otro lado, el **hierro** es un micronutriente esencial para la vida. Participa en importantes funciones para la célula como lo son la síntesis de ADN, la respiración y detoxificación de radicales libres (Aguado-Santacruz et al., 2012). Sin embargo, los suelos agrícolas suelen ser deficientes en este nutriente esencial y a su vez el hierro puede encontrarse en formas no asimilables por las plantas. El hierro puede estar presente en el suelo en sus estados de oxidación  $Fe^{2+}$  (ferroso) y  $Fe^{3+}$  (férrico). El  $Fe^{2+}$  es relativamente soluble, pero se oxida fácilmente a  $Fe^{3+}$ , que tiende a precipitarse. La disponibilidad del hierro depende del pH, contenido de materia orgánica y arcilla del suelo (Roca et al., 2007). El  $Fe^{3+}$  es insoluble a pH neutro y básico, y por lo tanto no está disponible para las plantas en suelos alcalinos y calcáreos. Además, el hierro puede formar sales con fosfatos, carbonatos, calcio y magnesio (Aguado-Santacruz et al., 2012).

Algunas bacterias son capaces de producir y liberar sideróforos, moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad para iones metálicos (Fe, Zn y Cu), incrementando la disponibilidad de dichos micronutrientes (Rosconi et al., 2016). Esto ocurre debido a que los complejos  $Fe^{3+}$ -sideróforo bacteriano pueden ser reconocidos e internalizados por las plantas (Weyens et al., 2009).

### **2.3.2 Mecanismos indirectos**

#### *I- Activación de la respuesta inmune de la planta*

Ciertas bacterias endófitas desencadenan un fenómeno conocido como resistencia sistémica inducida (RSI) en las plantas, similar al mecanismo de defensa en las plantas conocido como resistencia sistémica adquirida



(RSA). La RSA se produce cuando las plantas activan su mecanismo de defensa frente a la infección primaria por un patógeno. Esto ocurre cuando el patógeno induce una reacción de hipersensibilidad por la cual es limitado a una lesión necrótica localizada. Por su parte, la RSI es efectiva contra diferentes tipos de patógenos pero difiere de la RSA en que la bacteria que la induce no causa síntomas visibles en la planta hospedera (Kloepper & Ryu, 2006; van Loon et al., 1998). Diferentes características bacterianas han sido descritas como inductoras de la RSI incluyendo la presencia de flagelina o lipopolisacáridos, la producción de sideróforos, así como la producción de compuestos orgánicos volátiles (Compant et al., 2005a). Los microorganismos inductores de la respuesta sistémica, benefician a las plantas ya que sin ocasionarles daños les permite movilizar sus defensas rápida y efectivamente en presencia de un patógeno (Lugtenberg et al., 2013). Se ha reportado que las cepas *Pseudomonas* sp. PsJN, *Serratia marcescens* 90-166 y *Bacillus subtilis* Lu144, son capaces de inducir la resistencia sistémica contra enfermedades causadas por patógenos bacterianos o fúngicos en plantas de *Vitis vinifera* (vid), *Cucumis sativus* (pepino) y *Morus alba* (mora) respectivamente (Barka et al., 2000; Ji et al., 2008; Liu et al., 1995).

## *II- Control biológico de fitopatógenos*

Los endófitos bacterianos pueden actuar como agentes de biocontrol debido a que colonizan un hábitat similar al ocupado por los patógenos. El biocontrol puede realizarse por competencia por los nutrientes como Fe, O<sub>2</sub>, agua, luz o mediante la producción de sustancias bactericidas o fungicidas (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Ryan et al., 2008). Dentro de la competencia, un nutriente esencial y escaso en los ambientes del suelo así como en el interior de la planta es el hierro. En este sentido, aquellos endófitos productores de sideróforos son capaces de competir por el ión

férrico con potenciales patógenos, en especial hongos cuyos sideróforos tienen menor afinidad por el metal (Compant et al., 2005a). Por otro lado, algunos endófitos son capaces de sintetizar antibióticos y toxinas que previenen la infección por patógenos (Bailey et al., 2008). A modo de ejemplo, se demostró la producción de Oocydina A por una cepa endófito de *S. marcescens* y la producción de antibióticos por un aislamiento endófito del género *Streptomyces* (Castillo et al., 2002; Strobel & Daisy, 2003). Dichos antibióticos son activos contra un extenso grupo de hongos fitopatógenos.

#### **2.4 Relevancia de los endófitos y BPCV en la agricultura**

Diversos reportes han descrito el efecto benéfico de la inoculación con endófitos bacterianos y BPCV en diferentes cultivos en condiciones de campo (Borda-Molina et al., 2009; García-Olivares et al., 2006; Punshke & Mayans, 2011; Rangel et al., 2014). La explotación de las interacciones planta-bacteria puede resultar en importantes aplicaciones para la agricultura sustentable al reducir la necesidad de aplicación de fertilizantes inorgánicos (Bhattacharjee et al., 2008). La aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados, contribuye a la eutrofización de las aguas y a la emisión de gases de efecto invernadero tales como el N<sub>2</sub>O, así como también conlleva un importante costo económico (Bhattacharjee et al., 2008).

La asociación planta-bacteria más extensamente estudiada, es la de los rizobios y las leguminosas. En ella la capacidad de FBN es el beneficio más relevante y se han desarrollado diversos inóculos usados como biofertilizantes para leguminosas en la agricultura (Bhattacharjee et al., 2008). En los últimos años ha incrementado el interés por extender los conocimientos aplicados en la asociación leguminosa-rizobio, a otros cultivos de interés agronómico, especialmente de la familia de las

gramíneas tales como el sorgo, la caña de azúcar, el arroz y el maíz (Bhattacharjee et al., 2008).

Debido a sus características PCV y a su ubicación en el interior de la planta, es que las bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal constituyen una alternativa promisoría para la sustitución total o parcial de la fertilización, con el fin de lograr una producción agronómica sustentable.

### 3. ANTECEDENTES

El presente trabajo se enmarca en una de las líneas de investigación del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Esta línea se enfoca en el estudio de bacterias endófitas PCV de cultivos de interés agronómico tiene como principal objetivo generar conocimientos sobre la diversidad microbiana asociada a ellos con el fin de desarrollar posibles aplicaciones biotecnológicas. Los cultivos de los cuales se cuenta con colecciones de bacterias endófitas caracterizadas según sus características PCV *in vitro* son: *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), *Sorghum bicolor* (sorgo dulce), *Festuca arundinacea* (festuca), *Brassica napus* (canola) y *Cannabis sativa* (cáñamo). Los aislamientos de estas colecciones, luego de ser caracterizados *in vitro*, fueron estudiados en cuanto a sus efectos benéficos en el crecimiento de las plantas (De los Santos et al., 2015; Mareque et al., 2015; Taulé et al., 2012).

En particular, esta tesina se centra en la profundización de la caracterización de cuatro cepas endófitas promotoras del crecimiento de plantas de caña de azúcar (Battistoni et al., 2017; Taulé et al., 2012). Ellas son: *Pseudomonas* sp. UYSO01, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24. A su vez, se cuenta con los genomas completos de las cuatro cepas y en particular las cepas UYSO10 y UYSO24 fueron definidas como endófitos verdaderos de caña de azúcar (Taulé et al., 2016). Debido a las características mencionadas, estas cepas resultan muy interesantes como modelo de estudio, así como buenas candidatas para evaluar su potencial como bioinoculantes en diferentes cultivos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las cepas UYSO01, UYSO03, UYSO10 y UYSO24 son capaces de promover el crecimiento vegetal de otros cultivos de interés agronómico.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Contribuir a la sustentabilidad ambiental de diferentes cultivos de interés agronómico mediante el empleo de BPCV, en sustitución a la fertilización inorgánica.

##### **5.2 Objetivo específico**

Evaluar la capacidad de las cepas en estudio, de promover el crecimiento de distintos cultivos de interés agronómico.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cepas bacterianas y plantas utilizadas en este estudio**

En este trabajo se evaluaron cuatro cepas endófitas promotoras del crecimiento de cañas de azúcar, pertenecientes a la colección de cepas del laboratorio BIOGEM (Tabla 1). Además, se utilizaron como referencia cepas PCV reportadas en la bibliografía dependiendo del cultivo a ensayar (Tabla 1).

Por otro lado, se emplearon los cultivos: sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) variedad ADV 2010, arroz (*Oryza sativa*) variedad INIA - Tacuarí, maíz (*Zea mays*) variedad NT426, rabanito (*Raphanus sativus*) variedad Cherry Belle y alfalfa (*Medicago sativa*) variedad Crioula.

**Tabla 1.** Descripción de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Características*	PCV	Referencias
<i>Pseudomonas</i> sp.UYSO01	AIA, <i>nifH</i> , SolP.	Caña de azúcar.	Taulé et al., 2012; Taulé, et al., 2016
<i>Acinetobacter</i> sp.UYSO03	AIA, ARA, Sid, SolP.	Caña de azúcar.	Taulé et al., 2012;Taulé et al.,2016
<i>Kosakonia</i> sp.UYSO10	AIA, ARA, SolK.	Caña de azúcar.	Taulé et al., 2012; Taulé, et al., 2016
<i>Rhizobium</i> sp.UYSO24	AIA	Caña de azúcar.	Taulé et al., 2012;Taulé et al.,2016
<i>A. brasilense</i> Sp7	ABA, AIA, Citoq, Gib, FBN.	Sorgo, maíz, mijo, trigo.	Perrig et al.,2007; Tien et al., 1979
<i>H. seropedicae</i> Z67	ACC, AIA, Gib, FBN, Sid.	Arroz, maíz, caña de azúcar.	Bastian et al., 1998; Borges Baldotto et al., 2011
<i>S. meliloti</i> 242	ACC, AIA, Citoq, Gib, FBN, Sid.	Alfalfa.	Checucci et al., 2017; Galleguillos et al., 2000

\*Características relacionadas a la PCV de las cepas: ABA- producción de ácido abscísico. ACC- presencia de la enzima ACC deaminasa. AIA- producción de ácido indol acético. ARA- actividad de reducción del acetileno (actividad nitrogenasa). Citoq- producción de citoquininas. FBN- fijación biológica de nitrógeno. Gib- producción de giberelinas. *nifH*- presencia del gen *nifH*. Sid- producción de sideróforos. SolK- solubilización de K. SolP- solubilización de P.

## **6.2 Caracterización fisiológica de las cepas**

### **6.2.1 Resistencia a antibióticos.**

Las cepas provenientes de un cultivo crecido en LB líquido (Anexo) toda la noche se sembraron en forma de estría en placas conteniendo medio de cultivo LB (Anexo), suplementado con uno de los siguientes antibióticos: Tetraciclina (Tc), Gentamicina (Gm), Espectinomicina (Spc), Estreptomina (Str), Kanamicina (Km) o Ampicilina (Amp). Cada antibiótico se ensayó en concentraciones de 25 y 100 µg/ml y la caracterización se realizó por duplicado. La cepa se consideró resistente cuando fue capaz de crecer en la placa luego de una incubación a 30°C durante 48h. Aquellas cepas consideradas positivas se volvieron a crecer en las mismas condiciones con el fin de corroborar su fenotipo.

### **6.2.2 Compatibilidad entre cepas**

Con el objetivo de conocer si las cepas a estudiar presentan interacciones de antagonismo entre sí, se realizaron ensayos de compatibilidad de crecimiento en placa. Para ello se realizó la siembra incorporada de 100 µl de un cultivo fresco de cada cepa, crecido en medio LB, en 20 ml de medio de cultivo LB agar. Una vez que el medio de cultivo solidificó, se sembraron en la superficie con un ansa, las otras cepas a evaluar. Se consideró la existencia de antagonismo entre cepas cuando se formó un halo de inhibición alrededor de la colonia sembrada en la superficie. Cada cepa se ensayó por duplicado y aquellos pares de cepas que presentaron antagonismo, se volvieron a crecer en las mismas condiciones con el fin de corroborar su fenotipo.



## **6.3 Ensayos de respuesta de cultivos a la inoculación bacteriana**

### *6.3.1 Esterilización y germinación de las semillas*

Para la esterilización de las semillas, en una primera instancia se incubaron con etanol en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 ml en agitación, seguido de un lavado con agua estéril y posteriormente de una incubación con hipoclorito. A continuación, las semillas esterilizadas se enjuagaron 5 veces con abundante agua estéril. Los tiempos de incubación así como la concentración de etanol e hipoclorito se detallan según cada semilla en la tabla 2. La eficiencia del procedimiento se evaluó rodando dos semillas estériles por una placa de Petri conteniendo medio rico LB, la cual se incubó a 30°C durante 24h. En el caso de las semillas de alfalfa, luego de su esterilización, se incubaron en agua estéril a 30°C por 45 min, para propiciar su germinación.

Finalmente, las semillas estériles se traspasaron a placas de agar-agua 0,8% (p/v) y se incubaron a 30°C o a temperatura ambiente según el cultivo en estudio (Tabla 2).

En particular, para las semillas de rabanito se pusieron a punto las condiciones de esterilización y germinación. Para ello se evaluó la incubación de las semillas con hipoclorito 1,5% (v/v) durante 2,5 min, hipoclorito 4% (v/v) durante 5 min, e hipoclorito 4% (v/v) por 15 min y su germinación de las mismas a temperatura ambiente y a 30°C (Tabla 2). Para la elección del protocolo adecuado se realizaron controles de esterilización y germinación de la semilla, de forma de seleccionar aquel que permitiera un mayor porcentaje de germinación manteniendo la esterilidad de la semilla.

**Tabla 2.** Condiciones de esterilización y germinación de las semillas en estudio.

	Esterilización		Germinación		Referencia
	Etanol	Hipoclorito	T	Tiempo	
<b>Sorgo dulce</b>	70% (v/v), 5 min	4% (v/v), 15 min	30°C	4 días	Mareque, 2014
<b>Arroz</b>	70% (v/v), 5 min	6%, 30 min	30°C	3 días	Hernández et al., 2017
<b>Maíz</b>	70% (v/v), 5 min	5%, 5 min	30°C	2 días	Beracochea, 2011
<b>Rabanito</b>	70% (v/v), un enjuague	4% (v/v), 5 min;	Ambiente	-	Este trabajo
<b>Alfalfa</b>	95% (v/v), 2 min	10% (v/v), 15 min.	Ambiente	-	Battistoni et al., 2002; del Saz., 2016

### **6.3.2 Ensayos de respuesta a la inoculación en plantas de sorgo dulce, arroz, maíz y rabanito en condiciones gnotobióticas**

Una vez germinadas las semillas, las plántulas fueron transferidas a tubos conteniendo 15 ml de medio de cultivo Jensen (Anexo) con bolitas de polipropileno estéril como soporte. Se transfirió una plántula por tubo excepto en el ensayo de arroz, donde se transfirieron dos plantas por tubo.

A continuación, cada planta se inoculó con 100 µl de una suspensión conteniendo  $10^7$  células de la cepa en estudio (*Pseudomonas* sp. UYSO01, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Kosakonia* sp. UYSO10 o *Rhizobium* sp. UYSO24). Dichas cepas fueron previamente crecidas a 30°C durante toda la noche en medio de cultivo LB líquido, suplementado con el antibiótico a la concentración máxima en que la cepa presentó resistencia y la concentración de células a inocular se calculó midiendo la DO del cultivo a una longitud de onda de 620 nm. Para la inoculación de las plantas las células fueron centrifugadas a 10.000 g por 2 min, lavadas

y suspendidas en NaCl 0,9% (p/v). Como control negativo se inocularon plantas con 100 µl de NaCl 0,9% (p/v) y como control positivo se fertilizaron con KNO<sub>3</sub> a una concentración final en el tubo de 0,05% (p/v). A su vez, se incluyó un tratamiento con una cepa reportada en la bibliografía como promotora del cultivo a ensayar (cepa de referencia). Con dicho fin se utilizó *Azospirillum brasilense* Sp7 para los ensayos de inoculación de sorgo y maíz y *Herbaspirillum seropedicae* Z67 para arroz. Para el ensayo de rabanito no se utilizó una cepa de referencia debido a no contar con una cepa adecuada. Las plantas se mantuvieron durante un mes en cuarto de plantas a 26°C con un fotoperíodo 16/8 horas de luz/oscuridad (Mareque et al., 2015). En particular, para las plantas de rabanito se evaluaron dos temperaturas de crecimiento, 21°C y 26°C. En todos los casos cada tratamiento contó con 10 réplicas biológicas y los tubos se dispusieron al azar en el cuarto de plantas.

### **6.3.3. Ensayo de respuesta a la inoculación en plantas de alfalfa en condiciones gnotobióticas**

Las semillas esterilizadas fueron colocadas en tubos conteniendo 15 ml de medio Jensen con agar 0,8% (p/v) (semisólido), a razón de dos plantas por tubo. En este caso, los tratamientos fueron: 1- inoculación con cada una de las cuatro cepas en estudio en forma individual, 2- la cepa *Sinorhizobium meliloti* 242 utilizada como referencia, 3- la co-inoculación de cada una de las cepas en estudio con la cepa de referencia, 4- un control positivo y 5- un control negativo tal como se mencionó en el punto anterior.

Las plantas se dejaron crecer por un mes en cuarto de plantas a 21°C con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/ oscuridad (Battistoni et al., 2002; Del Saz Navarro, 2016). Durante el crecimiento se registró la cantidad de nódulos totales presentes por tubo, a los 13, 20 y 27 días post inoculación.

### *Compatibilidad entre las cepas en estudio y S. meliloti 242*

Se evaluó la compatibilidad de crecimiento entre las cuatro cepas en estudio con la cepa *S. meliloti* 242 tal como se describió en el punto 6.2.2.

### *Aislamiento e identificación de bacterias presentes en los nódulos de alfalfa*

Los nódulos provenientes de 5 de las 10 réplicas de cada tratamiento se cosecharon a los 30 días post-inoculación. Se esterilizaron en su superficie por incubación en etanol 70% (v/v) durante 3 min y luego en hipoclorito 2,5% (v/v) durante 5 min en agitación. Seguidamente, se los lavó cinco veces con abundante agua destilada estéril (Somasegaran, P., Hoben, 1994). El control de la esterilización de la superficie de los nódulos se realizó haciendo rodar un nódulo en placas de Petri conteniendo los medios de cultivo LB y YEM con Rojo Congo (Anexo).

A continuación, los nódulos se maceraron con una varilla de vidrio esterilizada por flambeado en una placa Petri de vidrio estéril, junto con 20-40 µl de NaCl 0,9%. Con un ansa estéril se sembró por estría una gota de la suspensión obtenida, en medio YEM con Rojo Congo y se incubaron las placas a 30°C por 72h (Cuadrado et al., 2009; Somasegaran & Hoben, 1994).

Previamente y con el fin de encontrar un medio de cultivo donde se diferencien morfológicamente las cepas inoculadas, se evaluó el crecimiento de las cinco cepas inoculadas en medio de cultivo YEM con Rojo Congo (Anexo).

A partir de las placas obtenidas de los aislamientos de nódulo, se identificaron las cepas inoculadas por su morfología. En el caso de que la identificación no fuera concluyente, se amplificó y secuenció un fragmento

de aproximadamente 1500 pb del gen 16S rRNA utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') (Lane, 1991).

Para esto último se empleó como molde un lisado de colonia. Este se obtuvo suspendiendo una anzada de la colonia proveniente de cultivo fresco en 100 µl de agua miliQ. La suspensión se centrifugó a 10.000g por 2 min. A continuación, el *pellet* se suspendió en 100 µl de NaOH 0,05M, se incubó a 100°C por 4 min, la reacción se detuvo al incubando los tubos en hielo por 2 min. Finalmente se agregaron 900 µl de agua miliQ y se centrifugó a 10.000g por 2 min. A partir del sobrenadante se depositaron 700 µl en un tubo eppendorf (Taulé et al., 2012).

Para la PCR se utilizó un volumen final de 50 µl por reacción, en el cual se incluyeron 25 µl de Master Mix (ThermoScientific DreamTaq Green PCR), 1µl de cada cebador 20 µM, 4 µl de lisado bacteriano, 2 µl de BSA 0,1 % (p/v) y 17 µl de agua. La amplificación se realizó con un termociclador siguiendo el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial, de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 59°C y 90 s a 72°C, estos tres últimos pasos corresponden a la desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores al molde de ADN y a la extensión de la cadena de ADN respectivamente. Para finalizar se realizó un paso de elongación final de las cadenas de ADN de 7 min a 72°C.

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,9% (p/v) en buffer TAE (Anexo), se empleó el agente intercalante Goodview™ (SBS GeneTech Co. Ltd) en una proporción de 2,5 µl cada 50 ml de agarosa. El tamaño del amplicón se confirmó mediante su comparación con el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus (Thermo Scientific). El gel se corrió a 90 V y se visualizó en un transiluminador UV. Una vez visualizada la banda del tamaño esperado,

el producto de PCR se envió para su purificación y secuenciación utilizando el cebador 1492R, a Macrogen Inc, Korea.

Con el fin de identificar los aislamientos, las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

#### *Aislamiento de endófitos de semillas de alfalfa*

Se esterilizaron en su superficie 500 semillas, empleando el mismo protocolo descrito anteriormente (6.3.1). A continuación, las mismas se maceraron en un mortero estéril con 10 ml de una solución de NaCl 0,9% (p/v) y Cicloheximida 100 µg/ml. A partir de la suspensión obtenida se plaquearon 200 µl con ayuda de un rastrillo estéril en placas conteniendo medio de cultivo YEM con Rojo Congo. Las placas se incubaron a 30°C hasta observar crecimiento.

Una vez obtenidas las colonias aisladas en medio YEM, se procedió a su identificación mediante amplificación y secuenciación del gen *rrs* como se mencionó anteriormente.

#### **6.3.4 Procesamiento de las plantas y tratamiento estadístico**

Todos los ensayos de respuesta a la inoculación descritos se cosecharon al mes de la inoculación. Las variables biométricas evaluadas fueron la altura de la planta, el largo de la raíz principal, el peso seco total o aéreo, así como el peso seco de la raíz, según las características de la planta (Tabla 3). Para realizar las medidas del peso seco, las plantas se secaron en una estufa a 60°C hasta alcanzar un peso constante y posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Shimadzu AUX 220).

El análisis estadístico constó de un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa Infostat versión 2008. De existir diferencias significativas entre los tratamientos, se compararon las medias aplicando el test de Tukey y utilizando los niveles de significancia 0,01, 0,05 y 0,1.

**Tabla 3.** Variables biométricas medidas en las plantas estudiadas.

	<b>Sorgo</b>	<b>Arroz</b>	<b>Maíz</b>	<b>Rabanito</b>	<b>Alfalfa</b>
<b>Altura</b>	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Largo de la raíz</b>	No	Si	Si	No	Si
<b>Peso seco total</b>	Si	Si	No	Si	Si
<b>Peso seco aéreo</b>	No	No	Si	No	No
<b>Peso seco radicular</b>	No	No	Si	No	No

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de las cepas a ensayar como inoculantes

#### 7.1.1 Resistencia a antibióticos

Los resultados de la resistencia a los antibióticos ensayados, para las diferentes cepas evaluadas, se muestran en la tabla 4. Se observó que la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 es sensible a todos los antibióticos y dosis evaluadas, mientras que la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 es resistente a ampicilina 100 µg/ml, la cepa *Rhizobium* sp. UYSO24 a kanamicina 25 µg/ml y la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01 a ampicilina 100 µg/ml, tetraciclina 25 µg/ml y espectinomicina 100 µg/ml.

A partir de estos resultados, en los siguientes ensayos realizados, el medio de cultivo fue suplementado con el antibiótico al que la cepa es resistente, a excepción de la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03.



**Tabla 4.** Evaluación de la capacidad de las cepas de resistir a distintos antibióticos.

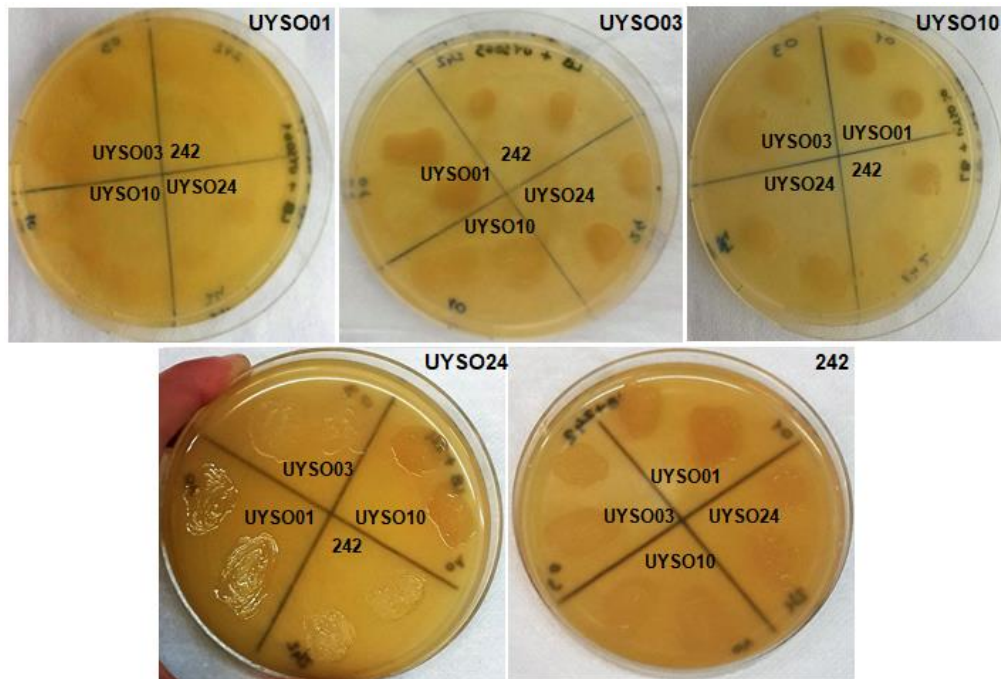
Antibiótico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cepas			
	UYSO01	UYSO03	UYSO10	UYSO24
Amp (100)	R	S	R	S
Amp (25)	R	S	R	S
Gm (100)	S	S	S	S
Gm (25)	S	S	S	S
Tc (100)	S	S	S	S
Tc (25)	R	S	S	S
Km (100)	S	S	S	S
Km (25)	S	S	S	R
Str (100)	S	S	S	S
Str (25)	S	S	S	S
Spc (100)	R	S	S	S
Spc (25)	R	S	S	S

R- resistente: crece en presencia del antibiótico y S- sensible: no crece en presencia del antibiótico.

### 7.1.2 Compatibilidad de crecimiento entre las cepas

La capacidad de cada una de las cepas en estudio de inhibir el crecimiento de las otras, así como de inhibir la cepa *Sinorhizobium meliloti* 242 co-inoculada en el ensayo de alfalfa, se evaluó *in vitro*. Los resultados

obtenidos mostraron que ninguna de las cepas inhibe el crecimiento de otra (Figura 1).



**Figura 1.** Vista del ensayo de compatibilidad entre cepas. Afuera de la placa se indica la cepa que está incluida en el medio de cultivo LB, mientras que las cepas indicadas dentro, corresponden a las cepas sembradas en la superficie.

## **7.2 Estudio de la capacidad de promover el crecimiento de diferentes cultivos por las cepas en estudio**

La respuesta de los cultivos ensayados frente a la inoculación con las cepas bacterianas en estudio fue variable, dependiendo del cultivo y la cepa ensayada.

### **7.2.1 Sorgo dulce var. ADV 2010**

En el ensayo de inoculación de sorgo, los resultados mostraron que ninguna de las cepas inoculadas, incluyendo la cepa de referencia

utilizada, *Azospirillum brasilense* Sp7 promovió el crecimiento de las plantas (Tabla 5).

**Tabla 5.** Respuesta de plantas de sorgo dulce variedad ADV 2010 a la inoculación bacteriana

Tratamiento	Altura (cm)	Peso seco (mg)
Control negativo (C-)	6,0	48,2
Control positivo (C+)	8,9**** <sup>a</sup>	79,6***
<i>A. brasilense</i> Sp7	6,1	51,9
UYSO01	5,5	44,2
UYSO03	6,2	54,2
UYSO10	5,6	44,9
UYSO24	5,4	42,9
<b>Coefficiente de variación (%)<sup>b</sup></b>	10,8	8,3

<sup>a</sup> Los asteriscos representan diferencias significativas con el control negativo (\*p < 0,1, \*\* p < 0,05, \*\*\* p < 0,01). <sup>b</sup> Medida de la variación del ensayo: se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje.

### 7.2.2 Arroz var. Tacuarí

En el ensayo de inoculación de arroz se observó que la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 aumentó significativamente la altura de la planta y el largo de la raíz, respecto al control sin inocular. Con respecto a la inoculación con la cepa *Rhizobium* sp. UYSO24, las plantas mostraron un aumento significativo en el crecimiento en la altura de la planta, en el largo de la raíz y en el peso seco, respecto al control negativo (Tabla 6).

**Tabla 6.** Respuesta de plantas de arroz variedad Tacuarí a la inoculación bacteriana.

Tratamiento	Altura (cm)	Largo de raíz (cm)	Peso seco (mg)
Control negativo (C-)	4,0	4,8	9,7
Control positivo (C+)	6,9*** <sup>a</sup>	10,1***	19,2***
<i>H. seropedicae</i> Z67	2,6	5,0	9,4
UYSO01	4,4	4,6	10,8
UYSO03	5,1**	6,8*	11,6*
UYSO10	3,2	4,2	7,5
UYSO24	4,9*	6,6**	11,5*
<b>Coefficiente de Variación (%)<sup>b</sup></b>	29,1	29,0	44,3

<sup>a</sup> Los asteriscos representan diferencias significativas con el control negativo (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,01$ ). <sup>b</sup> Medida de la variación del ensayo: se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje.

### 7.2.3 Maíz var. NT426

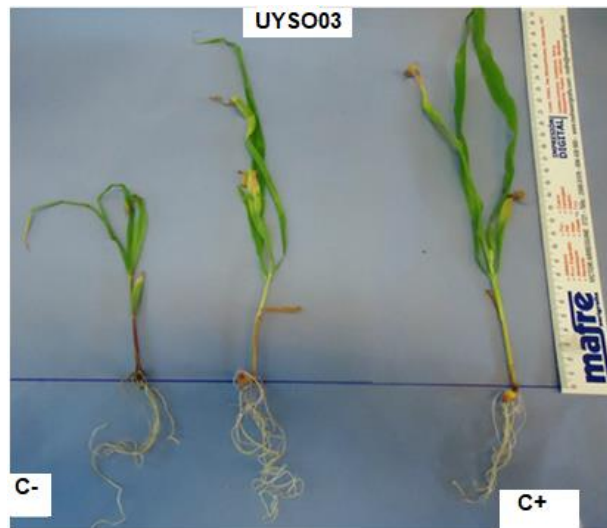
En el ensayo de inoculación de maíz, la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 promovió significativamente el crecimiento de la altura de la planta. También aumentó significativamente el largo y peso seco de la raíz respecto a los controles negativo y positivo (Tabla 7, Figura 2). Por su parte, la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 aumentó el peso seco radicular respecto a dichos controles.

Cabe resaltar que en este ensayo la cepa de referencia utilizada en el ensayo no promovió el crecimiento de la planta en ninguna de las variables medidas (Tabla 7).

**Tabla 7.** Respuesta de plantas de maíz variedad NT426 a la inoculación bacteriana.

<b>Tratamiento</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Largo de raíz (cm)</b>	<b>Peso seco aéreo (mg)</b>	<b>Peso seco raíz (mg)</b>
<b>Control negativo (C-)</b>	4,8	14,2	51,1	38,8
<b>Control positivo (C+)</b>	7,5*** <sup>a</sup>	19,0	73,7***	32,6
<b><i>A. brasilense</i> Sp7</b>	4,6	18,8	42,5	46,4
<b>UYSO01</b>	5,7	18,5	49,8	47,4
<b>UYSO03</b>	6,0*	23,8***	57,0	50,2***
<b>UYSO10</b>	5,3	21,0	52,2	49,1**
<b>UYSO24</b>	4,9	11,0	44,8	38,7
<b>Coefficiente de Variación (%)<sup>b</sup></b>	26,0	44,3	31,1	19,9

<sup>a</sup> Los asteriscos representan diferencias significativas con el control negativo (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,01$ ). <sup>b</sup> Medida de la variación del ensayo: se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje.



**Figura 2.** Vista de las plantas de maíz, 30 días post inoculación en el momento de la cosecha. C-: Control negativo sin inocular. UYSO03: tratamiento inoculado con la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03. C+: Control positivo fertilizado con N.

#### **7.2.4 Rabanito var. Cherry Belle**

Para el ensayo de rabanito, en primera instancia se seleccionó el método de esterilización más efectivo. El método seleccionado fue el que empleó hipoclorito 4% (v/v) durante 5 minutos, debido a que se obtuvo una mejor germinación y se logró la esterilidad de las semillas. También, se decidió germinar dichas semillas a temperatura ambiente ya que observó un porcentaje de germinación similar al obtenido a 30°C. Por otro lado, se seleccionó la temperatura de crecimiento de las plantas de 26°C, debido a que la planta se desarrolló mejor (Figura 3A).

En el ensayo de respuesta a la inoculación en rabanito, la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01 promovió significativamente el crecimiento de la altura de la planta con respecto al control negativo (Tabla 8, Figura 3B).



**Figura 3.** Vista del ensayo de inoculación bacteriana en plantas de rabanito. **A.** Visualización del crecimiento de plantas de rabanito a 21°C y 26°C. **B.** Plantas de rabanito al momento de la cosecha, 30 días post inoculación. C+: Control positivo fertilizado con N. UYSO01: tratamiento inoculado con la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01. C-: control negativo sin inocular.

**Tabla 8.** Respuesta de plantas de rabanito variedad Cherry Belle a la inoculación bacteriana.

Tratamiento	Altura (cm)	Peso seco (mg)
Control negativo (C-)	5,4	11,2
Control positivo (C+)	7,0 <sup>**a</sup>	16,3 <sup>***</sup>
UYSO01	6,9 <sup>*</sup>	10,6
UYSO03	5,8	9,7
UYSO10	4,9	11,7
UYSO24	5,6	11,3
<b>Coefficiente de Variación (%)<sup>b</sup></b>	26,7	26,6

<sup>a</sup> Los asteriscos representan diferencias significativas con el control negativo (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,01$ ). <sup>b</sup> Medida de la variación del ensayo: se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje.

### **7.2.5 Alfalfa var. Crioula**

Para el caso del cultivo de alfalfa, los resultados mostraron que ninguna de las cepas evaluadas como inoculantes promovió individualmente el crecimiento de las plantas. En este caso la cepa de referencia *S. meliloti* 242, sí promovió el crecimiento en la altura de la planta y el peso seco aéreo (Tabla 9, Figura 4).

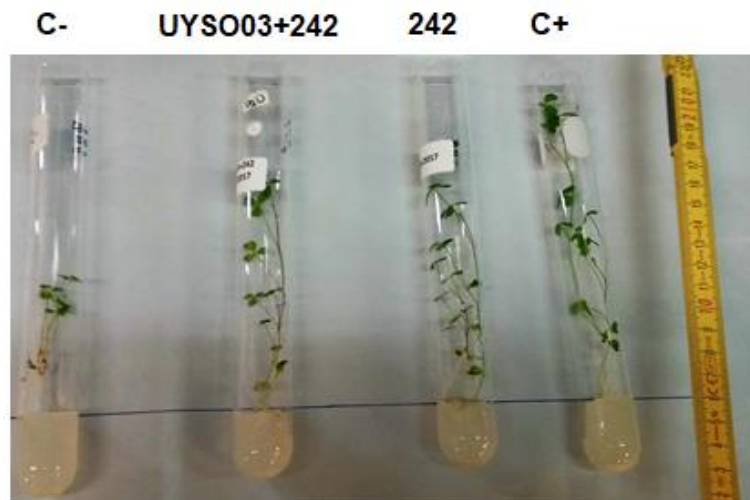
Teniendo en cuenta que la alfalfa se trata de una leguminosa con una fuerte asociación simbiótica con la cepa de rizobio *S. meliloti*, en este trabajo se evaluó también la co-inoculación de plantas de alfalfa utilizando las cepas en estudio y su simbiote. Los resultados mostraron que la co-inoculación de las cepas no mejoró ni empeoró el crecimiento en comparación con la inoculación simple con *S. meliloti* (Tabla 9, Figura 4). Asimismo, para descartar que existieran interacciones antagónicas entre las cepas inoculadas, previamente a la realización del ensayo se confirmó que las cepas co-inoculadas en los ensayos no se inhibían entre ellas (Figura 1).



**Tabla 9.** Respuesta de plantas de alfalfa variedad Crioula a la inoculación bacteriana.

Tratamiento	Altura (cm)	Largo raíz (cm)	Peso seco aéreo (mg)
Control negativo (C-)	4,1	14,0	4,0
Control positivo (C+)	9,9 <sup>***a</sup>	8,0	9,0 <sup>***</sup>
<b><i>S. meliloti</i> 242</b>	6,5 <sup>**</sup>	11,3	5,7 <sup>*</sup>
UYSO01	4,3	9,5	4,3
UYSO03	3,9	13,5	4,9
UYSO10	5,3	9,9	4,5
UYSO24	3,8	12,8	4,5
UYSO01+242 <sup>b</sup>	4,7	11,6	4,5
UYSO03+242	5,8	11,4	5,0
UYSO10+242	6,4	11,9	6,2
UYSO24+242	5,4	10,0	5,3
<b>Coefficiente de Variación (%)<sup>c</sup></b>	27,5	23,6	27,2

<sup>a</sup> Los asteriscos representan diferencias significativas con el control negativo (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,01$ ).<sup>b</sup> En los tratamientos co-inoculados las comparaciones se realizaron contra el tratamiento *S. meliloti* 242 <sup>c</sup> Medida de la variación del ensayo: se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje.



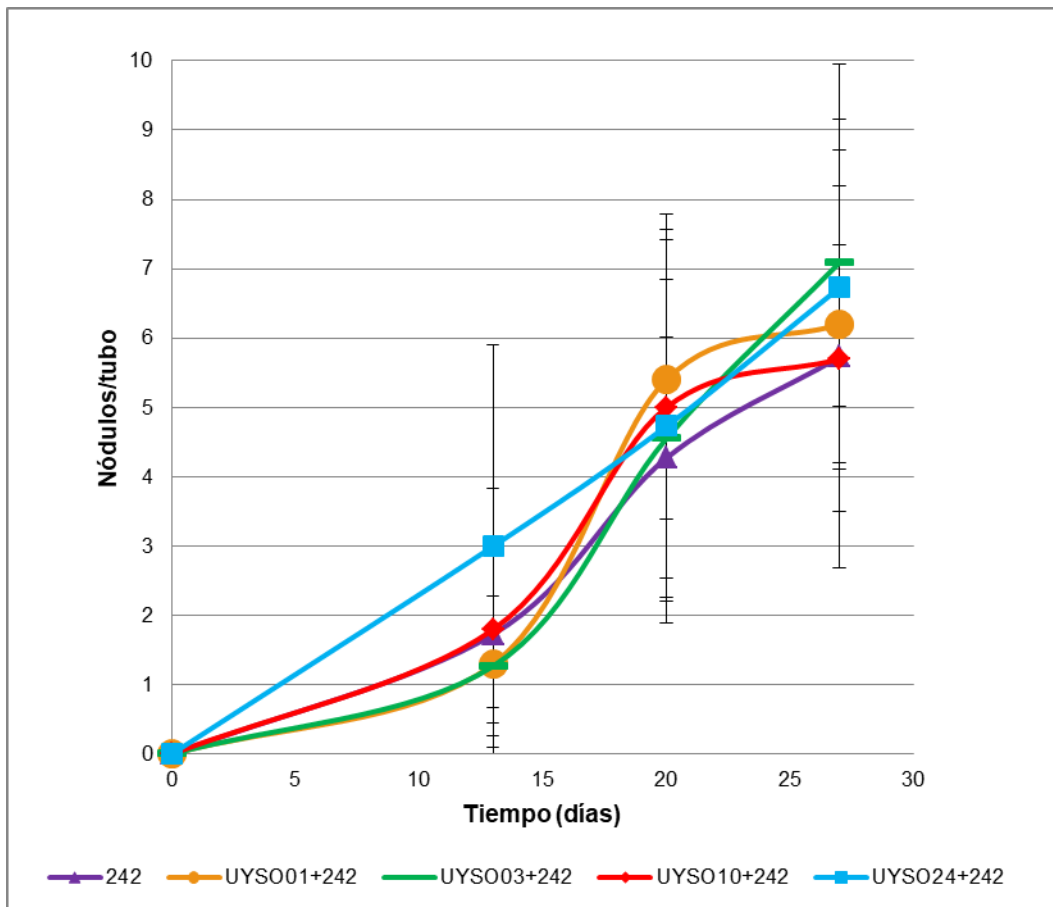
**Figura 4. Vista del ensayo de inoculación bacteriana de plántulas de alfalfa, 30 días post inoculación.** C-: Control negativo sin inocular. UYSO03+242: Co-inoculación *Acinetobacter* sp. UYSO03 + *Sinorhizobium meliloti* 242. 242: inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 242. C+: Control positivo fertilizado con N.

En cuanto a la presencia de nódulos, los resultados mostraron que todas las plantas inoculadas con la cepa 242 fueron noduladas (Figura 5). Por otro lado tanto en el control positivo como en el negativo las plantas no presentaron nódulos.

Asimismo, se contabilizó el número de nódulos en los tratamientos co-inoculados y se determinó cual era el simbionte presente en los nódulos observados.

#### 7.2.5.1 Nodulación de plantas de alfalfa

Con la finalidad de estudiar si la co-inoculación afectaba la nodulación, se contabilizó el número de nódulos en los tratamientos nodulados, a los 0, 13, 20 y 27 días post inoculación (Figura 5).



**Figura 5.** Nódulos totales en plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* 242 y co-inoculadas con las cepas en estudio. Las barras de error representan el desvío estándar de los promedios de nódulos por tubo.

En el día 13 post inoculación se realizó la primera observación de la aparición de los nódulos. Los resultados mostraron que al día 13 post inoculación todos los tratamientos inoculados presentaron al menos un nódulo. De todos modos, se observó que los tratamientos co-inoculados presentaban una cantidad de nódulos por tubo comparable a la del tratamiento inoculado solo con la cepa 242.

### 7.2.5.2 Aislamiento e identificación de bacterias de nódulos y semillas de alfalfa

Con el objetivo de conocer si las bacterias endófitas inoculadas ingresaban en el nódulo, se realizaron aislamientos a partir de tres nódulos por tratamiento. Para ello se utilizó el medio YEM con Rojo Congo, donde previamente se confirmó que las cepas inoculadas podían ser identificadas por su morfología (Figura 6). En los casos en que la morfología de las colonias aisladas de los nódulos no fue concluyente, se amplificó y secuenció parte del gen 16S rRNA.



**Figura 6.** Morfología en medio de cultivo YEM con Rojo Congo de las cepas en estudio. **A.** *Pseudomonas* sp. UYSO01. **B.** *Acinetobacter* sp. UYSO03. **C.** *Kosakonia* sp. UYSO10. **D.** *Rhizobium* sp. UYSO24. **E.** *Sinorhizobium meliloti* 242.

Los resultados mostraron que en todos los nódulos correspondientes al tratamiento inoculado únicamente con la cepa *S. meliloti* 242, se recuperó solamente la cepa inoculada (Tabla 10).

Por otro lado, en todos los tratamientos co-inoculados, se identificó la cepa 242 inoculada, conjuntamente con otras colonias excepto en el tratamiento UYSO24 + 242 (Tabla 10). En este sentido en el tratamiento de co-inoculación UYSO01 + 242, se identificaron aislamientos correspondientes al género *Bacillus* y *Sinorhizobium* sin poderse aislar la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01. De forma similar, en el tratamiento

UYSO03 + 242 se aislaron cepas pertenecientes al género *Sinorhizobium* y *Bacillus* y tampoco se pudo aislar la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03. Por otro lado en los tratamientos UYSO10 + 242 y UYSO24 + 242, se identificaron aislamientos del género *Pantoea*, además de identificarse por morfología la cepa *S. meliloti* 242 en el tratamiento UYSO10 + 242. En estos casos tampoco se logró aislar las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 con la que las plantas fueron inoculadas.

Con el fin de conocer si los aislamientos recuperados que no habían sido inoculados, se encontraban como endófitos en las semillas de alfalfa, se realizaron aislamientos a partir de semillas esterilizadas en su superficie. De esta forma, se pudieron aislar tres tipos de colonias de morfología diferente, de las cuales dos pertenecieron al género *Pantoea* y el tercero al género *Pseudomonas*.

**Tabla 10.** Identificación de los aislamientos obtenidos a partir de los nódulos

Tratamiento	Tubos nodulados	Nº réplicas aisladas <sup>a</sup>	Identificación por morfología	Género
				identificado por secuenciación del gen 16S <i>rRNA</i> <sup>b</sup>
242	11/11	3	SI, 242	-
			SI, 242	-
			SI, 242	-
UYSO01+242	11/11	3	NO	<i>Bacillus</i>
			SI, 242	<i>Sinorhizobium</i>
			SI, 242	-
			SI, 242	-
			NO	<i>Bacillus</i>
			NO	<i>Bacillus</i>
UYSO03+242	11/11	2	NO	<i>Bacillus</i>
			NO	<i>Bacillus</i>
			NO	<i>Bacillus</i>
UYSO10+242	9/10	2	SI, 242	-
			NO	<i>Pantoea</i>
UYSO24+242	11/11	1	NO	<i>Pantoea</i>

Dentro de un mismo tratamiento, los colores agrupan los aislamientos obtenidos de una misma réplica biológica (tubo conteniendo dos plantas).<sup>a</sup> Cuando el número de réplicas fue menor a 3, se debió a que no se obtuvieron aislamientos de todos los nódulos cosechados. <sup>b</sup> La identificación se hizo a nivel de género.

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 Caracterización fisiológica**

#### **8.1.1 Resistencia a antibióticos**

El poseer resistencia a uno o más antibióticos les confiere a las bacterias una ventaja competitiva respecto a otras para la colonización de diferentes espacios. Por otra parte, esta característica puede aprovecharse para el diseño de protocolos experimentales. En ese sentido, en este trabajo se utilizó la resistencia de los aislamientos para crecerlos en medios de cultivo con el antibiótico como agente de selección.

Los antibióticos a ensayar fueron seleccionados debido a que todos actúan sobre bacterias Gram negativas (como son los cuatro aislamientos en estudio), y pertenecen a diferentes familias: la tetraciclina a la familia de las tetraciclinas, la kanamicina, gentamicina así como la estreptomycinina a los aminoglucósidos, la espectinomicina a los glicopéptidos, y la ampicilina como miembro de los betalactámicos. Los resultados obtenidos mostraron que tres de los cuatro aislamientos en estudio son capaces de tolerar alguno de los antibióticos ensayados; excepto el aislamiento *Acinetobacter* sp. UYSO03 fue sensible a todos los antibióticos y concentraciones ensayadas.

#### **8.1.2 Compatibilidad entre cepas**

Los resultados mostraron que no hay antagonismo entre ninguna de las cepas evaluadas. Los mecanismos por los que una cepa puede inhibir el crecimiento de otra son muy diversos e incluyen la producción de antibióticos, sideróforos, proteasas, glucanasas, quitinasas etc. (Hayat et al., 2010; Schippers et al., 1987). Si bien no siempre las observaciones en condiciones *in vitro* se corresponden a lo que sucede en condiciones de

campo, en donde interaccionan más factores relevantes para la vida de las bacterias (planta hospedadora, componentes del suelo, actividad de otros microorganismos, supervivencia, capacidad de colonización, etc.), los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de poder generar un inoculante con una formulación que incluya a más de una de las cepas en estudio.

## **8.2 Estudio de la capacidad de PCV en diferentes cultivos por las cepas en estudio**

Diversos estudios han reportado la capacidad de PCV por bacterias endófitas en especies de plantas diferentes de la cual fueron aisladas (Biswas et al., 2000; Konnova et al., 1994; Rangel et al., 2014). Un ejemplo es la cepa modelo *Azospirillum brasilense* Sp7 aislada originalmente de la rizósfera de la planta *Digitaria decumbens* en Brasil y PCV de plantas de maíz y sorgo (Konnova et al., 1994; Rangel et al., 2014; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Asimismo, se ha reportado la capacidad de promover el rendimiento de plantas de arroz por cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* aisladas de distintas leguminosas (Biswas et al., 2000). Este hecho justificó la realización de este trabajo en el cual se partió de cuatro aislamientos de endófitos provenientes de caña de azúcar con características PCV, y fueron evaluados como inoculantes en diferentes tipos de cultivos de interés agronómico.

Se piensa que la especificidad de la interacción endófito-planta, radica al menos en parte en la producción de complejos lipopolisacáridos-proteína o polisacárido-lípido en la superficie bacteriana y su posible unión a las raíces (Konnova et al., 1994).

En los ensayos de PCV de sorgo y maíz, las cepas de referencia *A. brasilense* Sp7 y *H. seropedicae* Z67, respectivamente, no mostraron promover el crecimiento de las plantas. Este resultado pudo deberse al



corto tiempo en que las plantas inoculadas fueron crecidas o a que los cultivares ensayados no son compatibles con el genotipo de la bacteria. En este sentido, existen casos en los que se reportó que la cepa *A. brasilense* Sp7 no promovió el crecimiento de plantas de sorgo dulce, en ninguno de los parámetros biométricos evaluados, tal como ocurrió en el presente trabajo (Mareque et al., 2015). Este resultado muestra la importancia de la especificidad en la interacción planta-bacteria y justifica la importancia de la creación de colecciones bacterianas a partir de plantas cultivadas en el país, como la colección de la cual se seleccionaron las cepas del presente estudio (Taulé et al., 2012).

### **8.2.1 Promoción del crecimiento en plantas de sorgo dulce**

Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las cepas en estudio promovió el crecimiento de la variedad ADV 2010 de sorgo dulce. En otros trabajos se reportan diversos aislamientos pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*, con características PCV y asociados a los tejidos internos de plantas de sorgo (Govindasamy et al., 2017; Mareque et al., 2015). A su vez, aislamientos pertenecientes al género *Rhizobium* han mostrado promover el crecimiento de plantas de sorgo dulce (var. M81E), en condiciones de invernáculo (Mareque et al., 2015). Sin embargo la ausencia de una mejora en el crecimiento vegetal, podrían ser consecuencia de una incompatibilidad genotipo bacteria-genotipo planta.

### **8.2.2 Promoción del crecimiento en plantas de arroz**

En el cultivo de arroz los resultados mostraron que las cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Rhizobium* sp. UYSO24 fueron BPCV. Aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Rhizobium*, han sido reportados como asociados a los tejidos internos de

plantas de arroz así como BPCV de este cultivo (Biswas et al., 2000; Wang et al., 2018; Yasmin et al., 2004). Estos antecedentes son concordantes con los resultados obtenidos en este trabajo para la cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Rhizobium* sp. UYSO24, pero contrarios para la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01, lo que estaría nuevamente resaltando la especificidad en este tipo de interacciones.

### **8.2.3 Promoción del crecimiento en plantas de maíz**

En relación con las plantas de maíz, las cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Kosakonia* sp. UYSO10 fueron BPCV. Estos resultados coinciden con lo previamente reportado para un aislamiento de *Acinetobacter* capaz de promover el crecimiento de plantas de maíz y el contenido de clorofila en la hoja, en condiciones de invernáculo (Rojas- Tapias et al., 2014)

Por otra parte, con respecto al género *Kosakonia*, los resultados obtenidos coinciden también con lo reportado previamente. En ese sentido se ha demostrado que una cepa de *Kosakonia radicincitans*, inoculada en plantas de maíz en condiciones de campo aumentó el rendimiento del grano (Berger et al., 2018)

En este trabajo se observó que ambas cepas promotoras afectan el crecimiento de la raíz, sin que el control nitrogenado haya causado diferencias significativas en dicho parámetro. Esto muestra la complejidad del proceso PCV, el cual involucra diversos factores más allá de la disponibilidad de nitrógeno referenciada en el control positivo. En este sentido, la capacidad de producir AIA presente en las cuatro cepas en estudio, podría ser el mecanismo que está ejerciendo un efecto sobre el crecimiento de la raíz.

#### **8.2.4 Promoción del crecimiento en plantas de rabanito**

Con respecto a la plantarabanito, se ha reportado que una cepa de *Pseudomonas fluorescens* es capaz de mejorar el crecimiento de plantas de rabanito, así como también el contenido de pigmentos fotosintéticos, contenido de prolina, aminoácidos y proteínas totales bajo condiciones de estrés salino (Mohamed & Gomaa, 2012). Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta tesina, ya que la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01, fue capaz de promover el crecimiento de este cultivo. Asimismo estudios previos demostraron que la cepa *Kosakonia radicincitans* es capaz de promover el crecimiento de esta planta en condiciones de campo. Sin embargo, en este estudio se observó que la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10, no promovió el crecimiento en condiciones *gnotobióticas* (Berger et al., 2015). Estas diferencias pueden deberse a la especificidad entre los genotipos de la planta y la bacteria.

#### **8.2.5 Efecto de la inoculación con endófitos bacterianos en plantas de alfalfa**

En el ensayo de inoculación de alfalfa se observó que ninguna de las cepas en estudio promovió el crecimiento de la planta cuando las cepas fueron inoculadas por separado o co-inoculadas con la cepa *S. meliloti* 242. A partir de los resultados obtenidos, se planteó la hipótesis de que la co-inoculación con los endófitos en estudio, podría estar afectando la nodulación de las plantas. El proceso de nodulación de las leguminosas es complejo, la abundancia y tamaño de los nódulos depende de muchos factores tanto de tipo ambientales, como genéticos de la planta y del rizobio (Pogliani & Iglesias, 2001). A su vez, varios trabajos han reportado que la co-inoculación del rizobio con BPCV o endófitos de distintos géneros, en alfalfa y otras leguminosas aceleraron la nodulación de las

plantas tanto en condiciones *gnotobióticas* como de invernáculo (Cagide, 2014; Mishra et al., 2009; Morel et al., 2011; Stajković et al., 2009).

En este trabajo, la primera determinación del número de nódulos se realizó al día 13 post-inoculación, cuando los tratamientos ya habían nodulado, por lo tanto, no fue posible determinar si alguno de ellos noduló antes. Los resultados mostraron que la co-inoculación con las cepas en estudio no afectó el número de nódulos por planta a lo largo del tiempo.

Por otra parte, la cepa *Rhizobium* sp. UYSO24 no fue capaz de nodular las plantas de alfalfa. Este resultado puede deberse a la especificidad genotipo-genotipo y a que la bacteria no posee los genes *nod* específicos, indispensables para generar los cambios morfológicos que ocurren en la raíz durante el proceso de nodulación (Hirsch et al., 2001; Beracochea en preparación).

Por otro lado, se buscó conocer si los endófitos co-inoculados con la cepa *S. meliloti* 242, colonizaban los nódulos y podían ser recuperados a partir de ellos. Los resultados mostraron que no fue posible recuperar los endófitos inoculados de los nódulos de la planta. Sin embargo, a partir de ellos se pudieron aislar e identificar aislamientos pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pantoea* además de *S. meliloti* 242. Particularmente, el género *Bacillus* es uno de los géneros más comunes de bacterias del suelo, y es frecuentemente aislado de la rizósfera así como de los tejidos internos de diferentes de plantas (Stajković et al., 2009). Por su parte, el género *Pantoea* ha sido aislado como endófito asociado a distintas plantas y reportado como endófito de nódulos en plantas de alfalfa (Kan et al., 2007). Además otras bacterias han sido reportadas como endófitos de nódulos como *Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Serratia plymuthyca*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus pumilus* y *Burkholderia cepacia* en nódulos de *Glycine max* (soja); y en particular aislamientos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y

*Microbacterium* se han recuperado a partir de nódulos de plantas de alfalfa (Li et al., 2008; Stajković et al., 2009). Estos reportes apoyan la hipótesis de que los endófitos de semilla podrían ser la fuente de aquellos que se encontraron en los nódulos de la planta y no fueron inoculados en este trabajo.

En este sentido a partir de las semillas de la variedad de alfalfa empleada en los ensayos de PCV, se lograron aislar bacterias pertenecientes a los géneros *Pantoea* y *Pseudomonas* lo cual coincide con la bibliografía (López et al., 2017). En el mencionado trabajo se observó a su vez, una gran diversidad filogenética entre diferentes variedades de alfalfa, probablemente debido a la variación del genotipo de la planta. Asimismo el tiempo de conservación a 4°C de dichas semillas, puede haber sido un factor importante en el tipo de endófitos que se pueden recuperar de ellas. Si bien los aislamientos encontrados en el presente trabajo coinciden con lo reportado en la bibliografía, es posible que el medio de cultivo utilizado introduzca un sesgo en el aislamiento.

En lo que refiere a los resultados obtenidos en este trabajo, el hecho de encontrar endófitos de semilla del género *Pantoea* explica los tratamientos en los que se aislaron cepas de *Pantoea* de los nódulos de alfalfa. Sin embargo resulta extraño no haber podido identificar aislamientos del género *Bacillus* de las semillas de alfalfa ya que este género fue aislado de los nódulos de algunos tratamientos. Esto puede ser debido a que la población de *Bacillus* en la semilla sea muy poco abundante y aumente la concentración de esta bacteria luego de la germinación de la raíz siendo probablemente el momento indicado para poder aislarlo.

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Mediante la estrategia utilizada en este trabajo se logró determinar la capacidad de PCV en condiciones *gnotobióticas* por parte de las cepas en estudio. Los resultados obtenidos también demostraron que la promoción es genotipo específica.

Cada cepa logró promover el crecimiento de alguno de los cultivos ensayados siendo buenas candidatas para profundizar en el estudio de su interacción con los cultivos ensayados con la finalidad de poder desarrollar bioinoculantes. En este trabajo se obtuvo que en condiciones *gnotobióticas* la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO01 es BPCV de rabanito, la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 promueve el crecimiento de arroz y maíz, la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 es BPCV de maíz y la cepa *Rhizobium* sp. UYSO24 de arroz. En este sentido, este estudio sienta las bases para continuar profundizando en la capacidad de PCV de las cepas ensayadas, en condiciones de invernáculo y campo.

El desarrollo y aplicación de bioinoculantes apunta tanto a la sustentabilidad económica como ambiental del uso de fertilizantes químicos en las prácticas agronómicas tradicionales. Para que un inoculante sea efectivo, las bacterias deben infectar y colonizar activamente los tejidos de la planta y también permanecer en alto número para poder ejercer su efecto PCV. Es por esto que en futuros ensayos de invernáculo será necesario cuantificar las cepas de interés en los diferentes tejidos de la planta a diferentes tiempos post-inoculación, por ejemplo mediante la técnica de qPCR. También en dichos ensayos, sería interesante cuantificar el contenido de nitrógeno en las hojas de las plantas inoculadas en comparación con las de las plantas fertilizadas

químicamente y las no inoculadas ni fertilizadas mediante el método Kjeldahl (Bradstreet, 1954; Vincent, 1970).

## 10. ANEXO

### 10.1 Medios de cultivo

#### 10.1.1 Medios de cultivo para bacterias

*Luria- Bertani (LB)* (Sambrook et al., 1989)

Pesar y disolver los componentes de la Tabla A1 en agua destilada a excepción del agar. Ajustar el volumen a un litro con agua destilada agregar el agar. Esterilizar 20 min en autoclave.

**Tabla A1.** Composición del medio LB

Luria- Bertani (LB)	
Componente	Cantidad por litro
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g

*YEM con Rojo Congo* (Vincent, 1970)

Pesar y disolver los componentes de la Tabla A2 en agua destilada a excepción del agar. Ajustar el volumen a un litro con agua destilada y llevar el pH a 6,8 – 7,0 antes de agregar el agar. Esterilizar 20 min en autoclave.

**Tabla A2.** Composición del medio YEM con Rojo Congo

YEM	
Componente	Cantidad por litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	1,0 g
Manitol	10 g
Rojo Congo	25 mg
Agar	15 g



### 10.1. 2 Medios de cultivo para plantas

*Medio Jensen* (Vincent, 1970)

Pesar y disolver los componentes de la Tabla A3 a excepción del agar. Agregar agua destilada hasta completar el volumen y ajustar el pH a 6,8 antes de agregar el agar. Esterilizar 10 minutos en autoclave. En la Tabla A4 se detalla la composición de la solución de micronutrientes.

**Tabla A3.** Composición del medio Jensen

Medio Jensen	
Componente	Cantidad por litro
Ca <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17 g
Solución de micronutrientes	1,0 ml

**Tabla A4.** Composición de la solución de micronutrientes para el medio Jensen

Solución de Micronutrientes Jensen	
Componente	Cantidad por litro
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	2,03 g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,08 g
MoO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	0,09 g

## 10.2 Soluciones

### *Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE)*

Disolver en agua destilada los componentes de la Tabla A6 en cantidad suficiente para lograr la concentración indicada.

**Tabla A5.** Composición del buffer TAE

TAE 1X	
Componente	Concentración
Tris-acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado- Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. . (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidóforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev. Fitotec.*, 35(1).
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., ... Holmes, K. A. (2008). Antibiosis , mycoparasitism , and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24–35.
- Balsanelli, E., Serrato, R. V, Baura, V. A. De, Sasaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., ... Monteiro, R. A. (2010). *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environmental Microbiology*, 12(8), 2233–2244.
- Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., & Audran, J.-C. (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 91–95.
- Basak, B. B., & Biswas, D. R. (2008). Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant Soil*, 317, 235–255.
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., & Bottini, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24(1), 7–11.
- Battistoni, F., Platero, R., Noya, F., Arias, A., & Fabiano, E. (2002). Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* strains as inocula of alfalfa. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(5), 593–597. Battistoni, F., Platero, R., Taulé, C., Mareque, C., Hackembruch, F., & Fabiano, E. (2017). Informe Final Proyecto FPTA 331: Estudio de la interacción entre bacterias endófitas nativas promotoras del crecimiento vegetal y variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), cultivadas en Uruguay.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas. Tesina de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de la*

*República.*

- Berger, B., Patz, S., Ruppel, S., Dietel, K., Faetke, S., Junge, H., & Becker, M. (2018). Successful Formulation and Application of Plant Growth-Promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. *BioMed Research International*. Berger, B., Wiesner, M., Brock, A. K., Schreiner, M., & Ruppel, S. (2015). *K. radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agron. Sustain. Dev.*, 35, 1521–1528.
- 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), 199–209.
- Bhore, S. J., Nithya, R., & Loh, C. Y. (2010). Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung Nyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation*, 5(5), 191–197.
- Bhore, S. J., & Sathisha, G. (2010). Screening of Endophytic Colonizing Bacteria for Cytokinin-Like Compounds: Crude Cell-Free Broth of Endophytic Colonizing Bacteria Is Unsuitable in Cucumber Cotyledon Bioassay. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(4), 345–352.
- Biswas, J. C., Ladha, J. K., & Dazzo, F. B. (2000). Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake and Growth of Lowland Rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64, 1644–1650.
- Borda-Molina, D., Juan Manuel Pardo-García, M. M. & Montaña-Lara, J. S. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert.
- Borges Baldotto, L., Lopes Olivares, F., & Bressan-Smith, R. (2011). Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 114–125.
- Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. *Analytical Chemistry*, 26(1), 185–187.
- Cagide, C. (2014). *Evaluación de la co-inoculación Delftia-Sinorhizobium y el agregado de rizodeposiciones como biofertilizantes mejorados para el cultivo de alfalfa. Tesina de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.*
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., & Luna, V. (2011). Basic and Technological aspects of Phytohormone Production by Microorganisms. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management* (pp. 141–183). Berlin: Springer- Verlag.

- Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., ... Yaver, D. (2002). Munumbicins , wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562 , endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*, 148(1), 2675–2685.
- Checucci, A., Azzarello, E., Bazzicalupo, M., Carlo, A. De, Emiliani, G., Mancuso, S., ... Mengoni, A. (2017). Role and Regulation of ACC Deaminase Gene in *Sinorhizobium meliloti*: Is It a Symbiotic , Rhizospheric or Endophytic Gene ? *Frontiers in Genetics*, 8(6), 1–13.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E.(2005a). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects MINIREVIEW Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005b). Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L . by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp . Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1685–1693.
- Cuadrado, B., Rubio, G., & Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 38(1), 78–104.
- De los Santos, M. C., Taulé, C., Mareque, C., Beracochea, M., & Battistoni, F. (2015). 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), 329–342.
- De Weger, L. A., Van der Vlugt, C. I., Wijfjes, A. ., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B., & Lugtenberg, B. (1987). Flagella of a Plant-Growth-Stimulating *Pseudomonas fluorescens* Strain Are Required for Colonization of Potato Roots. *Journal of Bacteriology*, 169(6), 2769–2773.
- Del Saz Navarro, D. . (2016). *Efecto del cadmio en la simbiosis de Ensifer meliloti y E. medicae con Medicago sativa*. Tesina de grado. Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
- Dörr, J., Hurek, T., & Reinhold- Hurek, B. (1998). Type IV pili are involved in plant – microbe and fungus – microbe interactions. *Molecular Microbiology*, 30(1), 7–17.
- Esquivel-cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-ortega, R., & Huante, P.

- (2013). IMPORTANCIA AGROBIOTECNOLÓGICA DE LA ENZIMA ACC DESAMINASA EN RIZOBACTERIAS , UNA REVISIÓN AGROBIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE OF THE ACC DEAMINASE IN RHIZOBACTERIA , A REVIEW. *Rev. Fitotec. Mex*, 36(3), 251–258.
- Fernández- Pascual, M., de María, N., & de Felipe, M. . (2002). Fijación Biológica de nitrógeno: Factores limitantes. *Ciencia y Medio Ambiente*, 195–202.
- Galleguillos, C., Miguel, J., & Azco, R. (2000). Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science*, 159, 57–63.
- García–Olivares, J. G., Moreno- Medina, V.R., Rodríguez- Luna, I. C., Mendoza- Herrera, A., & Mayek–Pérez, N. (2006). Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agric. Téc. Méx*, 32(2).
- Gasser, I., Cardinale, M., Müller, H., Heller, S., Eberl, L., Lindenkamp, N., ... Berg, G. (2011). Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant Soil*, 347, 125–136.
- Glick, B. R., Karaturovic, D. M., & Newell, P. C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can. J. Microbiol.*, 41, 533–536.
- Govindasamy, V., Kumar, S., George, P., Kumar, M., & Rane, J. (2017). Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [ *Sorghum bicolor* ( L .) Moench ]. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion : a review. *Ann Microbiol*, 60, 579–598.
- Hernández, I., & Nápoles, M. C. (2017). RIZOBIOS RESIDENTES EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE ARROZ ( *Oryza sativa* L .) CULTIVAR INCA LP-5 Residents rhizobia in the rhizosphere of rice plants (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 39–49.

- Hirsch, A. M., Lum, M. R., Downie, J. A., Fred, E. W., & Baldwin, I. L. (2001). What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special ? 1. *Plant Physiology*, *127*, 1484–1492.
- Hu, X., Chen, J., & Guo, J. (2006). Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain ,. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *22*, 983–990.
- Ji, X., Lu, G., Gai, Y., Zheng, C., & Mu, Z. (2008). Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiol Ecol*, *65*, 565–573.
- Kan, F. L., Chen, Z. Y., Wang, E. T., Tian, C. F., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2007). Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai – Tibet plateau and in other zones of China. *Arch Microbiol*, *188*, 103–115.
- Kang, S., Joo, G., Hamayun, M., Na, C., Shin, D., Kim, H., ... Lee, I. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol Lett*, *31*, 277–281.
- Kloepper, J. W., & Ryu, C. (2006). Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Soil Biology*, *9*, 33–52.
- Konnova, S. A., Makarov, O. E., Skvortsov, I. M., & Ignatov, V. V. (1994). Isolation , fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions. *FEMS Microbiology Letters*, *118*, 93–100.
- Lane, D. D. . (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175). New York: John Wiley and Sons.
- Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (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*, 238–246.
- Liu, L., Kloepper, W., & Tuzun, S. (1995). Induction of Systemic Resistance in Cucumber Against Bacterial Angular Leaf Spot by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biological Control*, *85*(8), 843–847.
- Lloret, L., & Martínez-romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *47*(1), 43–60.
- López, J. L., Alvarez, F., Príncipe, A., Salas, E., Lozano, M. J., Draghi, W. O., ... Lagares, A. (2017). Isolation, taxonomic analysis, and

phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *Journal of Biotechnology*.

- Lugtenberg, B., Malfaova, N., Kamilova, F., & Berg, G. (2013). Microbial Control of plant root diseases. In F. J. de Bruijn (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (First Edit, p. 575). John Wiley and Sons.
- Malfanova, N., Lugtenberg, B., & Berg, G. (2013). Bacterial endophytes : who and where , and what are they doing there? In F. J. de Bruijn (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (pp. 15–38). Wiley-Blackwell.
- Mareque, C. (2014). *Caracterización de la población endófito bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce*. Tesis de Maestría. PEDECIBA Biología subárea Microbiología.
- Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M., & Battistoni, F. (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), 1057–1067.
- Mei, C., & Flinn, B. (2010). The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(1), 81–95.
- Mishra, P. K., Mishra, S., Selvakumar, G., Bisht, J. K., Kundu, S., & Gupta, S. (2009). Coinoculation of *Bacillus thuringiensis* -KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 753–761.
- Mohamed, H. I., & Gomaa, E. Z. (2012). Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, 50(2), 263–264.
- Morel, M. A., Ubalde, M. C., Braña, V., & Castro- Sowinski, S. (2011). *Delftia* sp . JD2 : a potential Cr ( VI ) -reducing agent with plant growth-promoting activity. *Arch Microbiol*, 193, 63–68.
- Mus, F., Alleman, A. ., Pence, N., Seefeldt, L. ., & Peters, J. . (2018). Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. *Metallomics*.
- Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoam.*, 28(1).
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., & Penna, C. (2007). Plant-



growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 1143–1150.

Peters, J. W., Fisher, K., & Dean, D. R. (1995). NITROGENASE STRUCTURE AND FUNCTION: A Biochemical-Genetic Perspective. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 335–366.

Pogliani, G., & Iglesias, M. (2001). Inoculantes para Soja. Su formulación y la infectividad en siembra directa y con labranza convencional. *Cátedra de Microbiología Agrícola- Facultad de Ciencias Agraria- UNNE*.

Punshke, K., & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19–26.

Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Bodman, S. B. Von, & A., C. F. (2004). Biofilm formation in plant – microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*, 7(1), 602–609.

Rangel, J. A., Ramírez, R. M., Cervantes, F., Mendoza, M., García, E., & Rivera, G. (2014). Biofertilización de *Azospirillum* spp. y rendimiento de grano de maíz, sorgo y trigo. *Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo*, 46(2).

Reinhold-hurek, B., & Hurek, T. (1998). Interactions of Gramineous Plants with *Azoarcus* spp. and Other Diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study their Function Interactions of Gramineous Plants with *Azoarcus* spp. and Other Diazotrophs: Identification, Localizat. *Plant Sciences*, 17(1), 29–54.

Reinhold-hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 435–443.

Reinhold-hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., & Hurek, T. (2006). An Endoglucanase Is Involved in Infection of Rice Roots by the Not-Cellulose-Metabolizing Endophyte *Azoarcus* Sp. Strain BH72. *MPMI*, 19(2), 181–188.

Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology*, 156(3), 989–996.

Roca, N., Pazos, M. S., & Bech, J. (2007). Disponibilidad de cobre, hierro, manganeso, zinc en suelos del NO argentino. *Ci. Suelo*, 25(1), 31–42.

Rojas- Tapias, D. F., Bonilla, R., & Dussán, J. (2014). Effect of Inoculation

and Co-inoculation of *Acinetobacter* sp . RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on Growth , Fitness , and Copper Accumulation of Maize (*Zea mays*). *Water Air Soil Pollut*, 225, 2232.

- Rojas-solís, D., Contreras- Pérez, M., & Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*, 15(2), 36–41.
- Rosconi, F., Trovero, M. F., de Souza, E. M., & Fabiano, E. (2016). Serobactins-mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. *Environmental Microbiology*.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827–837.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes : recent developments and applications. *FEMS*, 278, 1–9.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Saeed, A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 635–648.
- Sambrook, E., Fritsch, F., & Maniatis, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1283–1292.
- Schippers, B., Bakker, A. W., & Bakker, P. A. H. M. (1987). INTERACTIONS OF DELETERIOUS AND BENEFICIAL RHIZOSPHERE MICROORGANISMS AND THE EFFECT OF CROPPING PRACTICES. *Ann. Rev. Phytopatol.*, 25, 339–358.
- Somasegaran, P., Hoben, H. (1994). Collecting Nodules and Isolating *Rhizobia*. In *Handbook for Rhizobia* (pp. 8–10). New York: Springer-Verlag.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS*, 31(4), 425–448.
- Stajković, O., De Meyer, S., Miličić, B., Willems, A., & Delić, D. (2009). Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria

- from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botanica SERBICA*, 33(1), 107–114.
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 487–506.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502.
- Sugumaran, P., & Janarthanam, B. (2007). Solubilization of Potassium containing minerals by bacteria and their effect of plant growth. *World J. of Agric. Sci.*, 3(3), 350–355.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Abscisic Acid: A Seed Maturation and Antistress Signal. In *Plant Physiology* (pp. 540–557).
- 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(1–2), 403–418.
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., & Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, 356(1–2), 35–49.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. H. (1979). Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.) t. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 1016–1024.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED. *Annu. Rev. Phytopathol*, 36, 453–483.
- 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, 423–447.
- Vega-celedón, P., Martínez, H. C., González, M., & Seeger, M. (2016). BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS POR BACTERIAS Review Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39.

- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571–586.
- Vincent, J. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacterial* Blackwell Scientific Publications. Oxford. Blackwell Scientific.
- Wang, B. X., Wang, X. D., & Duan, G. L. (2018). Screening and Identification of Arsenic-resistant Endophytic Bacteria from Different Rice Tissues (*Oryza sativa* L.) in Different Growth Stages. *Huan Jing Ke Xue*, 39(5), 2464–2471.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., & Vangronsveld, J. (2009). Exploiting plant – microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology*, 27(10), 591–598.
- Yasmin, S., Rahman Bakar, M. A., Malik, K. A., & Hafeez, F. Y. (2004). Isolation , characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils. *J. Basic Microbiol*, 44(3), 241–252.
- Young, J. P. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacey, R. H. Burris, & H. . Evans (Eds.), *Biol Nitrogen Fixat* (pp. 43–86). New York: Chapman and Hall inc.