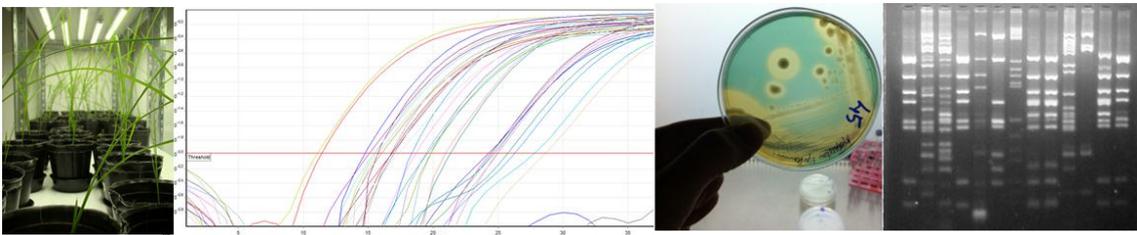




TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias, UdelaR



Monitoreo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de los géneros *Herbaspirillum* y *Azospirillum* inoculadas en *Oryza sativa*

Lic. Bioq. Gastón Rariz Mollo

Tutora: Dra. Ana Fernández Scavino

Co-Tutora: Dra. Lucía Ferrando

Tribunal: Dra. Andrea Rodríguez

Dra. Sabina Vidal

Dr. Raúl Pedraza

Montevideo, 13 de Abril de 2016

Agradecimientos

A mi esposa, Nicole, por su apoyo incondicional.

A toda mi familia y amigos porque siempre me acompañaron y apoyaron a lo largo de mi carrera.

A mis tutoras, Ana y Lucía, por su dedicación, por introducirme en la microbiología y haberme abierto las puertas del LEMM para formar parte de un grupo humano excelente.

A mis compañeros de laboratorio: Ana, Lucía, Inés, Javier, Silvana, Andre, Nadia y Laurilla, que de alguna forma me supieron apoyar y enseñar un montón de cosas

A todos los integrantes de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química por la buena onda.

A Guillermina Cantou, Enrique Deambrosi y Stella Avila por compartir sus conocimientos y experiencias en cultivo de arroz.

A Claudia Marchesi, Alvaro Roel y Jesús Castillo por asesorarnos con los suelos utilizados.

A los integrantes del tribunal por leer, evaluar y aportar a mi Tesis.

A INIA Treinta y Tres por habernos brindado las semillas de arroz y el suelo.

A CALISTER S.A. por proporcionarnos la cepa Az39.

A CSIC y a PEDECIBA por haber financiado parte del proyecto.

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_NAC_2012_1_8951.

Índice General

Índice General	1
Indice de Figuras y Tablas.....	4
RESUMEN	6
CAPÍTULO I: Monitoreo de <i>Azospirillum</i>, <i>Herbaspirillum</i> y diazótrofos totales asociados a plantas de arroz inoculadas	8
INTRODUCCIÓN	9
El cultivo de arroz.....	10
El cultivo en Uruguay.....	10
Sistema de producción.....	12
Ciclo fenológico y necesidades nutricionales de la planta de arroz.....	12
Crecimiento y desarrollo	12
Nitrógeno: Un nutriente esencial que limita el desarrollo del cultivo.....	14
Fijación biológica de Nitrógeno.....	15
Bacterias promotoras de crecimiento.....	16
<i>Azospirillum</i> y <i>Herbaspirillum</i> : promotores modelo	17
Inoculación de arroz en Uruguay	20
Herramientas para el monitoreo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal	21
PCR en Tiempo Real	22
Persistencia de BPCV en plantas inoculadas.....	24
OBJETIVOS.....	26
Objetivo General	27
Objetivos Específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Optimización de qPCR para genes 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azospirillum</i> spp.	29
Relevamiento de cebadores, análisis <i>in silico</i> de su especificidad y confirmación por PCR	29
Preparación del estándar para PCR en Tiempo Real (qPCR).....	31
Cuantificación por qPCR.....	31
Monitoreo de <i>Azospirillum</i> spp., <i>Herbaspirillum</i> spp. y diazótrofos totales asociados a suelo, semillas, plantines y raíces de plantas de arroz.....	33
Muestreo, procesamiento y análisis fisicoquímico del suelo.....	34
Semillas.....	35
Cepas bacterianas y preparación de inóculos.....	35
Inoculación y ensayo de crecimiento	36
Evaluación de parámetros de rendimiento vegetal.....	37

Recuento de bacterias diazótrofes cultivables asociadas a las raíces de plantas de arroz.	37
Detección molecular de <i>Azospirillum</i> y <i>Herbaspirillum</i> entre los diazótrofes cultivables asociados a raíces de arroz.....	38
Aislamiento de <i>Azospirillum</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. a partir de tubos positivos de NMP de diazótrofes totales	39
Cuantificación de genes 16S ARNr de <i>Azospirillum</i> spp., <i>Herbaspirillum</i> spp. y diazótrofes totales por qPCR.....	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
Optimización de qPCR para genes 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azospirillum</i> spp.	43
Evaluación <i>in silico</i> de cebadores.....	43
Evaluación experimental de los cebadores mediante PCR	45
Evaluación experimental de los cebadores en las reacciones de qPCR	46
Optimización de condiciones de qPCR.....	46
Abundancia de los genes 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azospirillum</i> spp. y análisis de interferentes en la cuantificación	46
Ensayo de crecimiento de plantas de arroz inoculadas y no inoculadas en condiciones controladas.....	50
Evaluación de rendimiento vegetal.....	51
Abundancia de bacterias diazótrofes cultivables asociadas a las raíces de plantas arroz..	52
Detección molecular de <i>Azospirillum</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. entre los diazótrofes cultivables asociados a raíces de arroz	54
Aislamiento de <i>Azospirillum</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. a partir de tubos positivos de NMP de diazótrofes totales	55
Abundancia de genes 16S ARNr de <i>Azospirillum</i> spp., <i>Herbaspirillum</i> spp. y diazótrofes totales asociados a suelo, semillas, plantines y raíces de plantas de arroz	55
DISCUSIÓN.....	59
Optimización de qPCR para genes 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azospirillum</i> spp.	61
Monitoreo molecular de <i>Azospirillum</i> spp., <i>Herbaspirillum</i> spp. y diazótrofes totales asociados a semillas, plantines y raíces de plantas de arroz	62
Abundancia de diazótrofes totales <i>in planta</i>	63
Persistencia de <i>Azospirillum</i> spp. <i>in planta</i> luego de la inoculación.....	63
Persistencia de <i>Herbaspirillum</i> spp. <i>in planta</i> luego de la inoculación	64
Relación entre rendimiento vegetal y abundancia de potenciales promotores del crecimiento	66
CAPÍTULO II: Abundancia de <i>Azospirillum</i> y <i>Herbaspirillum</i> en suelos y raíces de arroz.....	68
INTRODUCCIÓN	69
OBJETIVO.....	72

MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
Muestreo, procesamiento y análisis fisicoquímico del suelo	74
Diseño experimental y muestreo de raíces.....	74
Extracción de ADN de suelo	76
Extracción de ADN de raíces	76
Cuantificación de <i>Azospirillum</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. en suelos y raíces por Real Time PCR	77
Análisis estadístico	78
RESULTADOS	79
Abundancia de <i>Azospirillum</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. en suelos y raíces	80
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES	87
ANEXO I: Tablas y Figuras Adicionales	91
Capítulo I	92
Capítulo II	101
ANEXO II: Medios de Cultivo	104
BIBLIOGRAFÍA.....	106

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1.1. Zonas arroceras de Uruguay.....	11
Figura 1.2. Ciclo de la planta de arroz.....	13
Figura 1.3. Interacción entre bacterias y raíz	17
Figura 1.4. Esquema cronológico de muestreo.....	33
Figura 1.5. Ensayo de crecimiento de plantas de arroz en cámara de crecimiento.....	37
Figura 1.6. Crecimiento típico.....	38
Figura 1.7. Ensayo de interferencia en la optimización de qPCR para <i>Herbaspirillum</i> spp.....	47
Figura 1.8. Ensayo de interferencia en la optimización de qPCR para <i>Azospirillum</i> spp.....	49
Figura 1.9. Medidas de longitud de parte aérea a distintos tiempos.....	51
Figura 1.10. Abundancia de <i>Azospirillum</i> spp. (16SA), <i>Herbaspirillum</i> spp. (16SH) y diazótrofes totales (<i>nifH</i>).....	57
Figura AI-1. Alineamiento de las secuencias del sitio de reconocimiento de los cebadores HRS-F/R en una región del gen 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. y otros géneros.....	92
Figura AI-2. Alineamiento de las secuencias del sitio de reconocimiento de los cebadores Azo494-F/Azo756-R en una región del gen 16S ARNr de <i>Azospirillum</i> spp. y otros géneros.....	93
Figura AI-3. Curva de cuantificación por qPCR de 16S ARNr de <i>Azospirillum</i> spp. en el ensayo de interferencia	95
Figura AI-4. Curva estándar de qPCR del gen 16S ARNr de <i>Azospirillum</i> spp.....	95
Figura AI-5. Curva de melting de amplicones obtenidos en qPCR de 16S ARNr de <i>Azospirillum</i> spp.	96
Figura AI-6. Curva de cuantificación por qPCR de 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. en el ensayo de interferencia.....	96
Figura AI-7. Curva estándar de qPCR del gen 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp.....	97
Figura AI-8. Curva de melting de amplicones obtenidos en qPCR de 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp... ..	97
Figura AI-9. Diferencia en secuencias del gen 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> detectadas en el recuento de diazótrofes	100
Figura AI-10. Abundancia de <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azospirillum</i> spp.	101
Figura AI-11. Abundancia de <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azospirillum</i> spp.....	102
Figura AI-12. Análisis de correlación entre la abundancia de copias en raíz y propiedades fisicoquímicas del suelo.....	103
Figura AI-13. Análisis de correlación entre la abundancia de copias en suelo y propiedades fisicoquímicas del suelo.....	103

Tabla 1.1. Cebadores ensayados para determinar especificidad <i>in sílico</i>	29
Tabla 1.2. Estrategia de análisis para el ensayo de crecimiento de plantas de arroz inoculadas y no inoculadas, en condiciones controladas.....	34
Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas del suelo.....	35
Tabla 1.4. Resumen características cebadores específicos utilizados en diferentes reacciones de amplificación por PCR	43
Tabla 1.5. Cuantificación de <i>Herbaspirillum</i> en presencia de ADN de raíz y de Az39.....	48
Tabla 1.6. Abundancia de genes de <i>Azospirillum</i>	49
Tabla 1.7. Ensayo de interferencia: cuantificación de <i>Azospirillum</i> en presencia de z67.....	50
Tabla 1.8. Estimación del máximo número de diazótrofos cultivables durante el ciclo de.....	53
Tabla 1.9. Detección de <i>Herbaspirillum</i> y <i>Azospirillum</i> por PCR con cebadores específicos a partir de tubos positivos en la cuantificación por NMP de diazótrofos.....	54
Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas y origen de los suelos analizados.....	75
Tabla 2.2. Número de copias de los genes 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. (16SH) y <i>Azospirillum</i> spp. (16SA) en suelo cuantificados mediante qPCR.....	80
Tabla 2.3. Número de copias de los genes 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp (16SH) y <i>Azospirillum</i> spp. (16SA) en raíces.....	81
Tabla 2.4. Análisis de secuencias amplificadas en la cuantificación.....	83
Tabla AI-1. Evaluación de parámetros vegetales.....	94
Tabla AI-2. Rendimiento de la extracción de ADN.....	94
Tabla AI-3. Número de copias de los genes <i>nifH</i> (diazótrofos) y 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. (16SH) y <i>Azospirillum</i> spp. (16SA) cuantificados mediante qPCR.....	99
Tabla AI-4. Número de copias de los genes <i>nifH</i> (diazótrofos) y 16S ARNr de <i>Herbaspirillum</i> spp. (16SH) y <i>Azospirillum</i> spp. (16SA) en raíz cuantificados mediante qPCR.....	99

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los principales rubros de exportación para Uruguay, donde solamente se consume un 5% del total producido. Para satisfacer la demanda de este cereal, que crece a la par de la población, es imprescindible encontrar nuevas herramientas que potencien el desempeño del cultivo y mejoren la utilización de nutrientes de forma amigable con el ambiente.

Se ha postulado que algunas bacterias pueden asociarse a las gramíneas y tener un impacto importante en la productividad de los cultivos. Estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) se localizan en la rizósfera o en el interior de los tejidos vegetales y estimulan el crecimiento por mecanismos como la producción de hormonas, el antagonismo de patógenos o la fijación de nitrógeno. Se han desarrollado productos biotecnológicos, inoculantes comerciales para gramíneas, cuyo principal ingrediente activo son estas bacterias.

Los inoculantes utilizados para el cultivo de arroz en nuestro país están formulados en base a cepas de los géneros bacterianos *Azospirillum* y *Herbaspirillum*.

Dado que el éxito de la inoculación se encuentra estrechamente vinculado con el establecimiento de las bacterias en asociación con la planta hospedera, en el Capítulo I de esta tesis se estableció como objetivo determinar la abundancia y persistencia de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en plantas de arroz inoculadas con cepas de estos géneros.

Para cumplir con dicho objetivo, se optimizó la técnica de PCR en Tiempo Real para cuantificar las copias del gen 16S rRNA específico de cada género y se determinó su abundancia durante el crecimiento de plantas de arroz de la variedad El Paso 144. Para ello, se realizó un ensayo de crecimiento de plantas en condiciones controladas a partir de semillas no inoculadas (tratamiento control) o inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 o con *Herbaspirillum seropedicae* z67.

Se determinó que no hubo relación entre la abundancia de estas bacterias y los parámetros de rendimiento vegetal.

En el tratamiento control no se detectaron bacterias del género *Azospirillum* ni diazótrofos asociados a semilla. Sin embargo, la abundancia de *Herbaspirillum* sp. en semilla fue de 14 copias del gen en 10 ng ADN, y aumentó a 540 copias del gen 16S ARNr por ng ADN durante su germinación en condiciones asépticas. Una vez que las raíces tomaron contacto con el suelo, fueron colonizadas por bacterias del género *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, entre otros diazótrofos, indicando que el suelo es una fuente de microorganismos potencialmente promotores de crecimiento o, eventualmente, competidores de las bacterias inoculadas.

La abundancia de diazótrofos y *Azospirillum* spp. se mantuvo relativamente constante en las plantas inoculadas y no inoculadas durante todo el ensayo, mientras que *Herbaspirillum* spp. disminuyó con el tiempo y no fue detectado en raíces de plantas después de 70 días de crecimiento en suelo, que ya estaba inundado.

Dado que en Uruguay el arroz se planta principalmente en tres zonas (Este, Centro y Norte) y que una de las variedades principales es El Paso 144, en el Capítulo II de esta tesis se evaluó la abundancia de estos géneros en diferentes suelos y la capacidad de estas bacterias de colonizar raíces de plantas cultivadas en esos suelos en condiciones controladas.

En cuatro de los siete suelos analizados la abundancia de bacterias pertenecientes a los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* fue similar, en el rango de 10^3 a 10^4 copias del gen 16S rRNA respectivo por gramo de suelo.

Las raíces de plantas cultivadas en seis de los siete suelos que tienen propiedades fisicoquímicas diferentes y que son utilizados como campos naturales o para el cultivo de arroz, se enriquecieron en bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* al cabo de 25 días de crecimiento.

En suma, se pudo determinar que en diversos suelos del país existen poblaciones de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* que colonizan activamente las raíces de las plantas de arroz. Las bacterias diazótroficas y las bacterias del género *Azospirillum* endófitas permanecen asociadas a las raíces, mientras que las del género *Herbaspirillum* disminuyen significativamente durante el crecimiento de la planta.

CAPÍTULO I

**Monitoreo de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y
diazótrofos totales asociados a plantas de
arroz inoculadas**



Introducción

El cultivo de arroz

El arroz es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las gramíneas. Su cultivo es de origen milenario y proviene de las regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. En la actualidad se plantan dos especies de arroz domesticadas de especies salvajes, *Oryza sativa* (arroz asiático) y *Oryza glaberrima* (arroz africano). *Oryza sativa* es la más utilizada para consumo humano y sus variedades se agrupan principalmente en dos grandes subespecies: japónica (grano corto) e índica (grano largo) (GRiSP, 2015). El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, y es de los tres cereales más importante del mundo considerando la extensión de suelo utilizado para su cultivo y la cantidad de gente que depende de su cosecha. A nivel mundial, el arroz proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cultivo de cereales (Franquet *et al*, 2004). Es un cultivo que presenta una gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales pudiéndose desarrollar en condiciones de secano e inundación con láminas de poca altura y hasta con 500 cm de lámina de agua.

El aumento de la población mundial viene acompañado de una demanda creciente de alimentos, se estima que para el 2050 la producción agrícola tendría que aumentar un 60 % para abastecer al planeta (FAO, 2015). Este es el motivo por el cual la agricultura apunta a aumentar la producción de los cultivos mediante el uso intensivo del suelo. Para lograr altos rendimientos ha sido fundamental el uso adecuado de fertilizantes químicos. Hoy en día es imprescindible encontrar nuevas tecnologías que potencien el desempeño de los cultivos y mejoren la utilización de los nutrientes de forma amigable con el ambiente. Para eso se necesitan grandes esfuerzos de investigación y desarrollo, particularmente en el estudio del uso de microorganismos con capacidad para estimular el crecimiento de los vegetales como una alternativa viable para obtener cultivos sustentables disminuyendo el uso de agroquímicos (ACA, 2010).

El cultivo en Uruguay

En los últimos años, se ha transformado en uno de los principales rubros de exportación para Uruguay. Esto se debe a que aproximadamente el 95% de lo que se cosecha es exportado a más de 60 países, siendo los principales destinos Irak, Perú y México (Uruguay XXI, 2015). En la zafra 2010/2011 se alcanzó la mayor cosecha de la historia, donde se obtuvieron 1.650.000 toneladas de arroz cáscara, dando un rendimiento promedio de 8.400 Kg ha⁻¹ (ACA, 2015). Desde el año

2012 Uruguay se ubica en el octavo lugar como exportador de arroz a nivel mundial (USDA, 2015).

El cultivo de arroz en Uruguay se extiende sobre 170714 hectáreas (zafra 2013/2014) ocupando aproximadamente el 1% de la superficie total del país. Se cultiva principalmente en tres zonas: la Zona Este que involucra Rocha, Llavalleja, Treinta y Tres y este de Cerro Largo; la Zona Centro que representada por Rivera, Tacuarembó, oeste de Cerro Largo y norte de Durazno; y la Zona Norte que incluye Artigas y Salto (Figura 1.1). La Zona Este es la que mejor se adapta al cultivo de arroz por poseer planicies y cuencas acuíferas importantes, por lo tanto es la zona que más se siembra y representa más de la mitad del área total sembrada.



Figura 1.1. Zonas arroceras de Uruguay. Tomado de www.casarone.com.uy/uruguay

En la última década, se han plantado principalmente tres variedades de arroz en todo el territorio uruguayo. La variedad de cultivo más utilizada es “El Paso 144” y se concentra principalmente en la Zona Este. Le siguen en orden de importancia la variedad “INIA Olimar”, concentrada principalmente en la Zona Norte-Litoral Este y la variedad “INIA Tacuarí” en la Zona Este (ACA, 2012; Uruguay XXI, 2013).

Sistema de producción

El cultivo de arroz en Uruguay se basa en un sistema de producción de baja intensidad, en rotaciones con pasturas e integrado con la producción ganadera. Se inunda aproximadamente a los 40 días de sembrado y permanece inundado hasta unos días previos a la cosecha (70-110 días). El 60% del cultivo se realiza sobre campo natural o diversos tipos de retorno y sólo el 40% se siembra sobre rastrojos de arroz del año anterior. Los retornos mencionados se efectúan sobre campos con varios años de descanso sin arroz o sobre praderas, rotando en un sistema de producción donde, en la mayoría de los casos, los campos pasan por lo menos cuatro a seis años sin ser cultivados.

Este sistema de producción, sumado a una alta calidad de semilla utilizada por los productores, le otorga al cultivo de arroz una alta sustentabilidad, con un bajo uso de herbicidas, insecticidas y fertilizantes. Esta realidad productiva, prácticamente única en el mundo, es quizá una de las mayores fortalezas del sistema de producción uruguayo, frente a un escenario mundial que asigna creciente importancia a la conservación del ambiente y a la seguridad alimentaria (ACA, 2012).

Ciclo fenológico y necesidades nutricionales de la planta de arroz

Crecimiento y desarrollo

El crecimiento de la planta de arroz es un proceso fisiológico que se extiende desde la semilla al estado de madurez de la planta. Este proceso de desarrollo puede durar entre 3 a 6 meses, dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales (Fernández, 1980; IRRI, 2013).

El ciclo de vida de la planta de arroz abarca una media de entre los 110 y 150 días (Tanaka *et al*, 1964). Su desarrollo se encuentra dividido en tres etapas: vegetativa, reproductiva y maduración (Fernández, 1980) (Figura 1.2). La etapa vegetativa dura entre 50 y 55 días, se extiende desde la germinación de la semilla al macollaje. El macollaje comienza cuando la planta está establecida y generalmente termina cuando se inicia el desarrollo del primordio floral (Andrade *et al*, 2007). La etapa reproductiva, incluye el período desde la formación del primordio floral, hasta la emergencia de la panoja (floración). Esta fase dura entre 35 y 40 días, y es en la cual se determina el número de granos por panoja, que es uno de los componentes de rendimiento en la producción del cultivo de arroz. La etapa de maduración de la planta de arroz comienza con la fertilización de las flores y culmina con la maduración de los granos, en un proceso que dura de 30 a 35 días (Yoshida, 1981; Andrade *et al*, 2007).

La absorción de nutrientes y el metabolismo de la planta varían según la etapa de crecimiento en la que se encuentre. En la etapa vegetativa, los nutrientes (principalmente N, P, K y S) se absorben activamente, mientras se producen los fotoasimilados y se sintetizan las proteínas de forma de sustentar los procesos de macollaje y expansión floral.

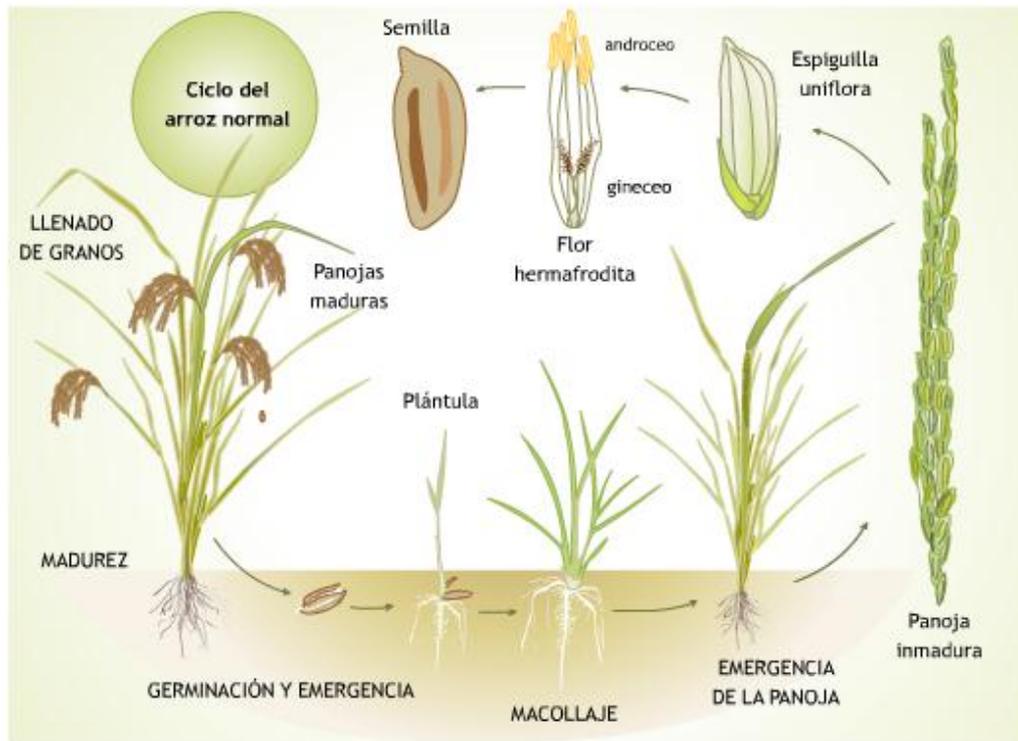


Figura 1.2. Ciclo de la planta de arroz. Tomado de <http://agr.unne.edu.ar/botanica/animaciones/ciclos/arroz/ciclo%20normal/index.htm>

Durante la etapa reproductiva, caracterizada por el desarrollo del primordio de la panoja y la elongación del tallo, los fotoasimilados son transformados en componentes de la pared celular, como lignina y celulosa y su exceso se acumula en forma de almidón. En la maduración, la morfogénesis de la planta ya se completó y el almidón se acumula en las panojas. A medida que ese proceso avanza, los carbohidratos, proteínas y minerales acumulados en las hojas se traslocan hacia las panojas, y la planta (raíz y parte aérea) se torna senescente (Olmos, 2007).

Nitrógeno: Un nutriente esencial que limita el desarrollo del cultivo

El crecimiento de los organismos depende de la disponibilidad de nutrientes inorgánicos y uno de los más importantes es el nitrógeno. Este es requerido en grandes cantidades por ser un componente esencial de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, y clorofila entre otros constituyentes celulares. Por lo tanto, acceder a un adecuado suministro de nitrógeno en alguna de sus formas es indispensable para todas las formas de vida. El N puede estar reducido como amonio (NH_4^+) u oxidado como iones nitrato (NO_3^-) para ser incorporado por las plantas. Estas formas inorgánicas son generalmente escasas en suelo y su cantidad depende del tipo de suelo. Debido a esta causa es que el nitrógeno se transforma en un nutriente limitante para el desarrollo del cultivo de arroz. Esta situación puede ser solucionada transitoriamente mediante el agregado de fertilizantes nitrogenados (Yoshida, 1981).

Generalmente, en suelos uruguayos se fertiliza con nitrógeno y fósforo a la siembra y se realizan una o dos aplicaciones de nitrógeno mediante coberturas aéreas en las etapas de macollaje y floración. Los niveles totales que se aplican se encuentran en el rango de 40-70 Kg de P_2O_5 y entre 45-70 Kg de N por hectárea (Deambrosi, 2003; ACA, 2013). Estos valores de fertilización son inferiores al promedio mundial, por lo que se cree que los altos rendimientos se deben al sistema particular de cultivo empleado (ACA, 2013).

Aunque el aporte de nitrógeno puede condicionar la productividad del arroz, los arrozales inundados tienen una baja eficiencia en la recuperación del fertilizante aplicado, siendo esta entre un 30 y un 40%. El resto del nitrógeno se pierde por desnitrificación, volatilización de NH_3 o lixiviación. La desnitrificación y volatilización de NH_3 causan polución por producción de gases con efecto invernadero mientras que la lixiviación puede causar contaminación de aguas subterráneas (Cassman *et al*, 1998).

Para controlar estos procesos de contaminación, es necesario implementar estrategias que aporten a la sustentabilidad del cultivo y a la vez sean amigables con el medio ambiente. Una alternativa para sustituir o reducir la fertilización química es el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Estos microorganismos son capaces de incrementar los rendimientos del cultivo de forma sustentable (Sturz *et al*, 2000; Cocking, 2005) mediante varios mecanismos, siendo uno de los principales la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

Fijación biológica de Nitrógeno

La FBN es la capacidad que poseen algunas especies de los dominios *Bacteria* y *Archaea* de convertir el nitrógeno atmosférico en amonio (Martínez-Romero, 2006). Estos microorganismos denominados diazótrofos (Young, 1992; Zehr *et al*, 2003), pueden ser tanto aerobios como anaerobios, tanto de vida libre como en simbiosis con plantas. La mayor parte de la fijación de nitrógeno en ecosistemas terrestres se lleva a cabo mediante bacterias simbióticas en asociación con plantas (principalmente leguminosas), sin embargo, los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre que habitan los suelos pueden contribuir significativamente en el total del nitrógeno disponible en varios ecosistemas (Hsu & Buckley, 2009).

La reducción del N₂ es catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa. Dicho complejo enzimático se encuentra conformado por dos metalo-proteínas, la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La primera se encuentra codificada por los genes *nifD* y *nifK*, mientras que la segunda por el gen *nifH*.



Al igual que las otras formas de fijación de nitrógeno, la FBN es un proceso muy costoso energéticamente, que requiere 16 moléculas de ATP y 8e⁻ por molécula de nitrógeno reducida debido a la gran estabilidad del triple enlace que une los átomos en el nitrógeno elemental.

Se sabe que la enzima nitrogenasa es sensible al oxígeno y que el proceso de FBN ocurre bajo condiciones de microaerofilia, siendo también posible en ambientes anóxicos a partir del N₂ producido por la desnitrificación del nitrato. Si bien el arroz se cultiva gran parte de su ciclo bajo condiciones de inundación, la FBN es posible por la presencia de microorganismos anaerobios y aerobios que aprovechan micronichos oxigenados (Hurek & Reinhold-Hurek, 2005). Esto es posible gracias al arénquima, un tejido vegetal encargado del intercambio gaseoso entre las raíces y la atmósfera (Bodelier, 2003). Sin embargo, la inundación provoca cambios fisicoquímicos a nivel del suelo, generando un gradiente de potencial redox que hace que la flora microbiana que habita ese ecosistema se modifique (Kögel-Knabner *et al*, 2010).

El gen *nifH* se encuentra distribuido entre miembros de los dominios Bacteria y Archea (Poly *et al*, 2001; Dixon & Kahn, 2004). Dado que es un gen muy conservado (Raymond *et al*, 2004; Sant'Anna *et al*, 2011), usualmente es utilizado en estudios de filogenia, diversidad y abundancia

de microorganismos cultivables y no cultivables que provienen de distintos ambientes (Zehr *et al*, 2003). Por esta razón, existe una amplia base de datos de secuencias de este gen que sirve de apoyo y aumenta constantemente con nuevos trabajos (Gaby & Buckley, 2014). Como gen funcional, el gen *nifH* tiene la ventaja de proporcionar evidencia del potencial de fijación de nitrógeno (Young, 1992), sin embargo la sola presencia de este gen no es concluyente respecto a su actividad y para obtener información sobre la misma es necesario estudiar el ARNm. Las variaciones que presenta el gen *nifH* a nivel de secuencia son suficientes para detectar cambios en la estructura de una comunidad cuando el ecosistema es sometido a cambios fisicoquímicos del suelo (Bagwell *et al*, 2002; Pereira-e-Silva *et al*, 2013), así como también determinar qué tipo de hábitat es compatible con los diferentes grupos de organismos fijadores de nitrógeno (Zehr *et al*, 2003). Ha sido reportado que cambios en los diferentes factores ambientales como la humedad del suelo, oxígeno, pH, conductividad, carbono, nitrógeno y azufre influyen en la fijación de nitrógeno en suelos (Hsu & Buckley, 2009). Los trabajos realizados en nuestro laboratorio mostraron que existe un cambio drástico en la composición de la comunidad diazotrofa de suelo antes y después de la inundación (Paolino, 2006) y además se vio un aumento en el número de copias *nifH* luego de la inundación en raíces de arroz (Ferrando & Fernández, 2015).

Bacterias promotoras de crecimiento

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) pertenecen a un grupo heterogéneo de microorganismos benéficos que pueden establecer diferentes tipos de interacción con plantas: simbiótica, endofítica, asociativa y de vida libre (Figura 1.3A). Estas bacterias son capaces de promover la toma de nutrientes y el crecimiento de plantas de forma directa y/o indirecta. Los mecanismos benéficos directos son: la fijación del nitrógeno atmosférico, el secuestro (mediante sideróforos) y solubilización de hierro del suelo, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas y la disminución de la síntesis de etileno mediante la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o ACC desaminasa. Mientras que los indirectos son: la degradación de compuestos tóxicos y la inducción de resistencia a enfermedades y estrés (Glick, 2012; Ali *et al*, 2014; de Souza *et al*, 2015) (Figura 1.3B).

Las raíces juegan un rol crucial en la asociación y establecimiento de bacterias benéficas debido a sus exudados. Estos exudados representan una gran cantidad de nutrientes (ácidos orgánicos, fitosideróforos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, nucleótidos y mucílago) así como también

señales que atraen microorganismos capaces de metabolizar los nutrientes. (Shukla *et al*, 2011; Drogue *et al*, 2012). Debido al alto contenido de carbono suministrado por los exudados radicales, la rizósfera alberga una variada comunidad bacteriana con más de 10^{10} bacterias por gramo de suelo (Gans *et al*, 2005; Roesch *et al*, 2007). Esta comunidad microbiana asociada a las raíces puede ser llamada rizo-microbioma (Chaparro *et al*, 2013) y se ha visto que puede cambiar de acuerdo al estadio de la planta y el genotipo de la misma (Bulgarelli *et al*, 2013; Chaparro *et al*, 2013).

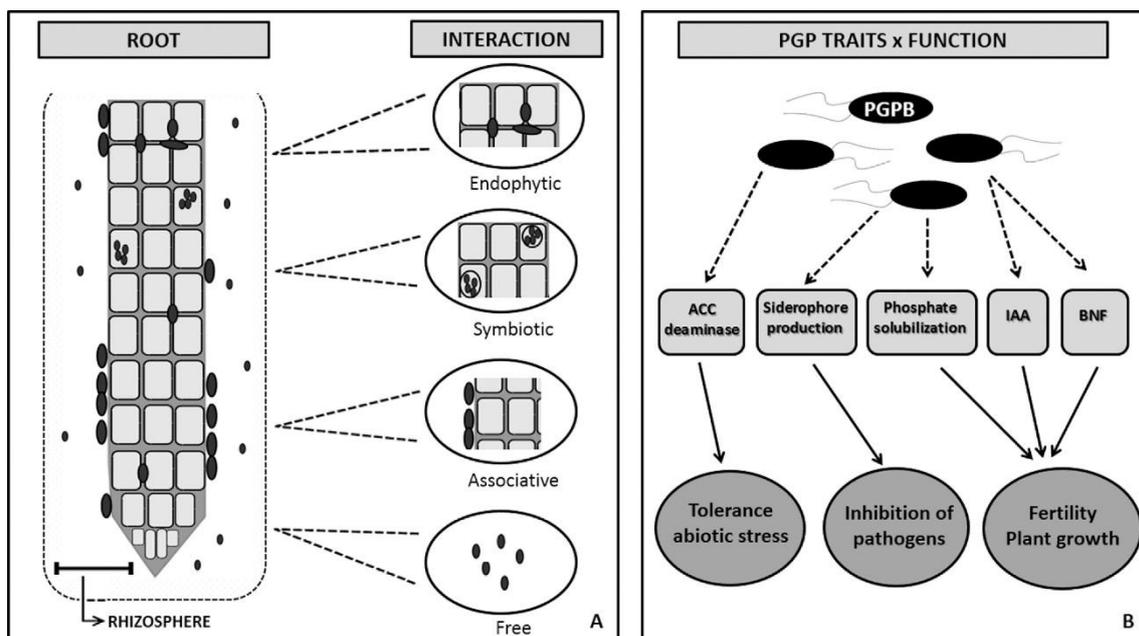


Figura 1.3. Interacción entre bacterias y raíz. Se muestran los diferentes tipos de asociación entre las raíces de las plantas y las bacterias promotoras de crecimiento (A), y los beneficios que causan las bacterias en las plantas luego de que se establecen en ellas (B). Imagen tomada de de Souza *et al* (2015).

En los últimos años, se han identificado y caracterizado como bacterias promotoras de crecimiento vegetal varias cepas de los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Gluconacetobacter* (Ambrosini *et al*, 2012; Costa *et al*, 2013; Souza *et al*, 2013; Granada *et al*, 2014).

***Azospirillum* y *Herbaspirillum*: promotores modelo**

Las bacterias del género *Herbaspirillum* pertenecen al Phylum *Proteobacteria* y a la Clase *Betaproteobacteria*. Son células Gram negativas con forma de bacilo y que a veces puede

adoptar forma espiral, tienen un diámetro de entre 0.3-0.8 μm y un largo que varía según la especie y el medio de cultivo de 1.4-5.0 μm . Son móviles, presentan de uno a cinco flagelos ubicados en uno o los dos polos. Se han encontrado en asociación con una gran variedad de plantas, particularmente con miembros de la familia *Poaceae*. Han sido aisladas de raíces de sorgo enjuagadas, raíces de arroz y maíz esterilizadas superficialmente (Baldani *et al*, 1986; Olivares *et al*, 1996), así como también de hojas de caña de azúcar (Pimentel *et al*, 1991).

De las especies presentes en el género *Herbaspirillum*, solamente *H. seropedicae*, *H. rubrisulbalbicans*, y *H. frisingense* han mostrado capacidad fijadora de nitrógeno y habilidad para asociarse a cultivos como agentes promotores de crecimiento (Monteiro *et al*, 2012a). Varios trabajos han demostrado que *H. seropedicae* y *H. frisingense* colonizan endofíticamente el xilema de raíces (Olivares *et al*, 1997; James & Olivares, 1998), así como los espacios intercelulares de la raíz y tallo de caña de azúcar (Njoloma *et al*, 2006). También se observó que colonizan espacios intercelulares de arroz (James *et al*, 2002) y que este proceso de colonización involucra estructuras como LPS (lipopolisacáridos), EPS (exopolisacáridos), adhesinas y el sistema de secreción de tipo 3 (Monteiro *et al*, 2012a). Por otro lado la especie *H. rubrisulbalbicans* también es endófito pero causa las enfermedades “mottled stripe” en caña de azúcar y “red stripe” en sorgo (Pimentel *et al.*, 1991; Tan *et al*, 2010). Además de la fijación de nitrógeno, se ha visto que cepas de estas especies producen fitohormonas como giberelinas y auxinas (Bastián *et al*, 1998; Bottini *et al*, 2004; Monteiro *et al*, 2012b) y sideróforos (Rosconi *et al*, 2013). También tienen la habilidad de solubilizar fósforo inorgánico (Estrada *et al*, 2013), utilizar la ACC deaminasa para disminuir niveles inhibitorios de etileno en raíces estresadas (Rothballer *et al*, 2008) y ejercer actividades de control biológico (Weber *et al*, 2007; Ting *et al*, 2011).

Dentro de la especie *H. seropedicae*, una de las cepas más estudiadas en asociación con la planta es *H. seropedicae* z67. Esta cepa endófito fue aislada por primera vez de raíz de arroz (Baldani *et al*, 1986), y luego de su descubrimiento ha sido utilizada por varios investigadores como modelo de estudio para comprender su asociación con arroz y otras gramíneas. Recientemente en un trabajo aún no publicado, Fabio Oliveira Pedrosa y colaboradores han secuenciado el genoma de esta cepa (Fecha de depósito: 17/06/2015; Nro de acceso de la secuencia: CP011930.1).

Estudios de inoculación con *H. seropedicae* z67 realizados en condiciones controladas mostraron que la inoculación de las variedades de arroz Guaraní e IR42 con esta cepa, provocó un aumento en el peso seco de la planta y que la FBN aportó en este caso el 30% del nitrógeno total de la planta (Baldani *et al*, 2000; James *et al*, 2002). También se observó que en condiciones axénicas, *H. seropedicae* z67 aumentó el peso seco de raíces y tallos e incrementó niveles de C y N en

variedades de arroz tolerantes al aluminio, pero no en aquellas variedades sensibles. Esto, según los autores, podría deberse a que las variedades tolerantes excretan mayor cantidad de C por sus raíces, y de esta forma se ve favorecido el crecimiento de las bacterias. Sin embargo en condiciones de invernadero se observó que ambas variedades se vieron favorecidas (Gyaneshwar *et al*, 2002).

Por otra parte, otro de los géneros relevantes de bacterias promotoras de crecimiento vegetal es *Azospirillum*, cuyos miembros son capaces de colonizar varios cultivos de importancia agronómica potenciando su crecimiento y productividad en condiciones de campo (Bashan & de Bashan, 2010; Baldani *et al*, 2014a). El género *Azospirillum* pertenece a la clase *Alfaproteobacteria*, son bacilos curvos o espirales con un diámetro de 0.6-1.5 μm y un largo que varía según la especie en medio de cultivo de 1.0-7.0 μm . Son móviles, poseen un flagelo polar y varios flagelos laterales más cortos. Las bacterias de este género habitan en la rizósfera y tejidos internos de gramíneas (Baldani & Döbereiner, 1980; Baldani *et al*, 2014a). *A. brasilense* y *A. lipoferum* fueron aisladas de raíces y tallos de arroz, siendo las primeras especies en ser descritas (Ladha *et al*, 1982).

Hay diferentes mecanismos por los cuales *Azospirillum* puede favorecer el crecimiento de plantas. Directamente por fijación de nitrógeno atmosférico, síntesis de fitohormonas y enzimas, producción de óxido nítrico y sideróforos, y solubilizando minerales; e indirectamente ejerciendo actividad antimicrobiana, potenciando la actividad de membrana celular, e induciendo resistencia sistémica. Se ha visto que una cepa de *Azospirillum* puede efectuar más de un mecanismo promotor, y se piensa que la acción simultánea de estos mecanismos explica los efectos benéficos luego de su inoculación (Bashan & de Bashan, 2010).

Azospirillum brasilense es la especie más estudiada del género. Las cepas de esta especie colonizan rizósfera y también diferentes tejidos de la planta; algunas viven en la superficie de las raíces, mientras otras colonizan espacios corticales intercelulares o incluso el tejido vascular (James & Olivares, 1998; Hartmann *et al*, 2015). Entre las gramíneas con las que se pueden asociar, se ha visto que en arroz logra buenos rendimientos. La inoculación con *A. brasilense* REC3 en arroz fertilizado con bajos niveles de nitrógeno, produce un aumento en el contenido de nitrógeno total de la semilla (Pedraza *et al*, 2009). Se ha probado en condiciones de invernadero que cuando se inocula arroz Basmati 385 y Super Basmati con *A. lipoferum* N4 o con *A. brasilense* Wb3 la FBN le aporta 20.0 y 19.9 % N para el arroz Basmati 385, mientras que para el arroz Super Basmati 58.9 y 47.1 % N respectivamente (Mirza *et al*, 2000). También se determinó que el rendimiento de semilla del arroz Super Basmati aumentó significativamente

en un 75 y 81 % (Mirza *et al*, 2000), y 52 y 32 % (Malik *et al*, 2002) cuando se inoculó con *A. brasilense* Wb3 y *A. lipoferum* N4 respectivamente. Mientras que en ensayos de campo se ha visto un aumento estimado del rendimiento de semilla que asciende al 22% (Balandreau, 2002). Ambas especies, también pueden incrementar el tamaño y cantidad de macollos de la planta de arroz. Además, la inoculación del arroz con *Azospirillum* puede incrementar la absorción de PO_4^{3-} y NH_4^+ por parte de la planta (Murty & Ladha, 1988). También se observó que la inoculación de plantines de arroz Nanatsuboshi y Nipponbare con *Azospirillum* sp. B510 aumenta el número de macollos por lo cual también se ve aumentado el rendimiento del grano (Isawa *et al*, 2010; Bao *et al*, 2013)

En Argentina el uso de cepas de *A. brasilense* como inoculantes de gramíneas se estudia hace más de 30 años. En el marco de un proyecto que buscaba seleccionar e identificar cepas de *Azospirillum* sp. con potenciales características para promover el crecimiento de cultivos como trigo y maíz, se seleccionó la cepa *A. brasilense* Az39. Esta cepa, aislada de raíces de trigo esterilizada superficialmente, mostró aumentar los rendimientos de maíz y trigo en condiciones agronómicas (Díaz-Zorita & Fernández, 2009). Considerando los antecedentes generados por este programa, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria) postuló, de común acuerdo con las empresas de inoculantes, a la cepa nativa Az39 de *Azospirillum brasilense*, como la estirpe recomendada para la fabricación de inoculantes para maíz y trigo en la República Argentina (Cassán *et al*, 2008). A pesar de esto, todavía no se han revelado los mecanismos responsables de la promoción de crecimiento en esta cepa (Rodríguez *et al*, 2008; Cassán *et al*, 2009b). Sin embargo, recientemente se ha secuenciado su genoma y se observó que contiene genes relacionados con la fijación de nitrógeno; producción de fitohormonas y biosíntesis de reguladores del crecimiento de plantas; formación de biofilms y sistema de secreción tipos I, II y VI (Rivera *et al*, 2014).

Inoculación de arroz en Uruguay

En Uruguay existen dos empresas que producen inoculantes de gramíneas. La empresa Lage y Cía S.A. produce un inoculante para gramíneas a base de *Azospirillum* spp. que se llama Graminosoil, y otro que se comercializa exclusivamente para arroz a base de *Herbaspirillum huttiense* llamado Endo-Rice (www.lageycia.com). Ambos inoculantes mostraron un aumento positivo en la producción de arroz, siendo Endo-Rice el que mostró mayor rendimiento de grano (Okon *et al*, 2015).

La empresa CALISTER S.A. solo posee un inoculante para gramíneas y es a base de *Azospirillum brasilense* Az39 (www.calister.com.uy). La fórmula se comercializa para maíz, trigo, sorgo, cebada, sudan, moha, y es aplicada sobre la semilla. Los únicos estudios que constatan mejoras en el rendimiento del cultivo son para el maíz (Martino, 2008). Hasta el momento este inoculante es recomendado para el cultivo de maíz y poco se sabe sobre su efecto en cultivos de arroz. En el marco de la falta de información sobre la eficiencia de este inoculante sobre el cultivo de arroz en Uruguay, en el año 2010 se realizó un trabajo con cultivo hidropónico donde se inocularon semillas de arroz INIA Olimar con Az39. En el mismo se detectó Az39 en tejidos internos de la planta, principalmente en la raíz. También se vio que en 10 días de crecimiento existe un pequeño aumento en la biomasa fresca del tejido aéreo y raíz, así como también en el largo de la parte aérea (Rariz, 2012).

Dados los antecedentes de trabajo, la disponibilidad de genomas completos y la capacidad demostrada para potenciar los rendimientos en sus hospederos, las cepas Az39 y z67 son un modelo valioso para el estudio de la persistencia de cepas inoculadas en asociación con plantas de arroz y en presencia de la flora nativa del suelo.

Herramientas para el monitoreo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Uno de los mayores problemas que enfrentan los inoculantes es la sobrevivencia de las cepas en la rizósfera (Bashan *et al*, 1995; Bashan, 1999) lo que afecta la performance del inoculante porque para provocar la estimulación del crecimiento es necesaria una buena colonización de las raíces (Dobbelaere *et al*, 2002).

Para el monitoreo de inoculantes se han empleado varias metodologías que incluyen su detección y cuantificación. Se han utilizado microorganismos genéticamente modificados con genes insertos en su genoma que codifican para proteínas fluorescentes o para resistencia a antibióticos (Rothballer *et al*, 2003; Jäderlund *et al*, 2008), sin embargo el uso de microorganismos genéticamente modificados se encuentra muy controlado y raramente son utilizados en el campo (Viebahn *et al*, 2003). Estos cuentan con la desventaja de que los genes exógenos insertados pueden llegar a afectar las propiedades promotoras de crecimiento, y además como es un método que depende del cultivo no tiene en cuenta microorganismos no cultivables. De forma similar, se han utilizado mutantes espontáneos con resistencia a antibióticos, lo que suma otra desventaja y es que requiere una minuciosa selección del mutante para asegurar que las propiedades de interés no sean modificadas (Mahaffee *et al*, 1997; Moënné-Loccoz *et al*, 2001; Mascher *et al*, 2003).

Otra metodología empleada es el uso de anticuerpos específicos para detectar el microorganismo de interés (Kirchhof *et al*, 1997; Mascher *et al*, 2003). Esta metodología no requiere modificaciones genéticas, pero el monitoreo es tedioso y el límite de detección es alto. Hace varios años que también se utiliza la técnica de microscopía FISH (fluorescence *in situ* hybridization) con sondas que reconocen secuencias del gen 16S y 23S del ARNr que pueden llegar a discriminar a nivel de especie (Oliveira *et al*, 2009), sin embargo esta técnica tiene la desventaja de ser engorrosa y con un límite de detección alto. Más recientemente, otras técnicas como el MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectroscopy) han sido utilizadas para detectar especies de *Azospirillum* e incluso cepas de *A. brasilense* (Sets *et al*, 2013). Sin embargo no es un método cuantitativo y requiere de cultivo, por lo que es un método laborioso y que además requiere de un tiempo de espera.

Distintos enfoques de la PCR (“polymerase chain reaction”, reacción en cadena de la polimerasa) han sido abordados con el fin de cuantificar bacterias específicas a partir de muestras ambientales complejas. Se ha utilizado NMP-PCR (Rosado *et al*, 1996; Mirza *et al*, 2006) y PCR competitiva (Gobbin *et al*, 2007) para medir abundancia en rizósfera. Sin embargo, hace unos años que se han comenzado a utilizar métodos moleculares más sofisticados que permiten la cuantificación de genes característicos de microorganismos particulares mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Real Time PCR) o PCR cuantitativa (qPCR).

PCR en Tiempo Real

La PCR en tiempo real funciona básicamente de la misma forma que la PCR convencional (o “end-point” PCR), consta de varios ciclos de amplificación donde inicialmente el molde de ADN se desnaturaliza, luego los cebadores específicos se unen a la secuencia blanco, y a continuación una ADN polimerasa termoestable sintetiza la hebra complementaria a partir de cada cebador, de esta forma se obtiene un aumento exponencial del producto de amplificación durante la PCR. A diferencia de la PCR convencional, el incremento del número de amplicones se registra en tiempo real durante la PCR mediante un reportero fluorescente que indica la acumulación de amplicones en cada ciclo. La cuantificación del número de genes (o transcritos, en la qPCR de transcriptasa inversa) se determina durante la fase exponencial de la PCR, que es cuando el número de amplicones detectados es directamente proporcional al número de secuencias blanco iniciales en la muestra problema. De esta forma es posible calcular el número de secuencias blanco en una muestra desconocida usando una curva estándar. Y esta curva estándar puede ser generada utilizando la secuencia blanco clonada en un plásmido o utilizando ADN extraído de un número conocido de células (Penna & Galluzzi, 2013).

Existen dos sistemas reporteros que son comunmente utilizados, el del agente intercalante SYBR Green (Wittwer *et al*, 1997) y el de sondas *TaqMan* (Holland *et al*, 1991; Livak *et al*, 1995). El sistema *Taqman* usa una sonda que hibrida con una secuencia conservada del ADN molde cercana a la secuencia blanco del cebador. Esta sonda posee en su extremo 5' un fluoróforo y en su extremo 3' una molécula quencher que cuando está cercano al fluoróforo no le permite fluorescer (Livak *et al*, 1995). Cuando comienza la extensión de los cebadores la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa cliva el fluoróforo, éste se aleja del quencher y comienza a emitir fluorescencia. De este modo, cuanto mayor es el número de secuencias blanco mayor es la fluorescencia producida durante su amplificación. Este sistema permite utilizar sondas con fluoróforos de diferente color y de esta forma poder cuantificar diferentes secuencias blanco (Neretin *et al*, 2003; Baldwin *et al*, 2003 y 2008).

El otro sistema utilizado es el que emplea el fluoróforo SYBR Green que se une a todo el ADN doble cadena intercalándose entre los pares de bases adyacentes. Cuando se une al ADN, se emite una señal de fluorescencia producto de la excitación por un haz de luz. De esta forma, a medida que aumenta el número de amplicones en cada ciclo de PCR, también aumenta la fluorescencia. Resulta esencial que los cebadores tengan alta especificidad por la secuencia blanco para evitar productos no específicos que contribuyan con la señal de fluorescencia y sobreestimen la cantidad de secuencia blanco. También resulta importante que los cebadores no tengan autocomplementariedad para prevenir la formación de dímeros. Luego de cada qPCR es necesario realizar una curva de disociación (melting) para confirmar que la fluorescencia obtenida es generada solamente por el amplicón de interés y no por productos inespecíficos. La curva de disociación se logra calentando gradualmente el producto de PCR, y a medida que las hebras de ADN se desnaturalizan, el SYBR Green se libera y deja de emitir fluorescencia. Dado que fragmentos diferentes de ADN doble cadena tienen distinta temperatura de melting (T_m , temperatura donde el 50% del fragmento doble hebra se encuentra desnaturalizado), se puede discriminar si el producto de qPCR es el correcto, o si hubo amplificación inespecífica (Giglio *et al*, 2003; Gonzalez-Escalona *et al*, 2006).

Esta técnica resulta muy útil por su sensibilidad, robustez y rapidez (Sørensen *et al*, 2009; Couillerot *et al*, 2010a) y hace varios años que se utiliza en ecología microbiana. Se comenzó diseñando cebadores dirigidos al gen 16S ARNr para cuantificar microorganismos procariontes en general (Takai & Horikoshi, 2000) y de los dominios *Archea* (Lueders & Friedrich, 2003), *Bacteria* (Nadkarni *et al*, 2002) y también de *Fungi* (Zhu *et al*, 2005). Además de cuantificar grupos taxonómicos, también se ha utilizado la qPCR para determinar la abundancia de distintos grupos funcionales como diazotrofos (Steunou *et al*, 2006; Ferrando & Fernández, 2015), oxidadores de

amonio (Treusch *et al*, 2005), desnitrificantes (Smith *et al*, 2007), metanogénicos (Denman *et al.*, 2007), metanótrofas (Kolb *et al*, 2003; Ferrando, 2013), sulfato-reductores (Leloup *et al*, 2007); así como también se han cuantificado grupos funcionales relacionados con la biorremediación (Baldwin *et al*, 2003 y 2008; Devers *et al*, 2004; Gonod *et al*, 2006; McKew *et al*, 2007), entre otros.

La qPCR ha sido utilizada para medir abundancia de géneros, especies y cepas bacterianas asociadas a plantas y presentes en suelo. Se ha cuantificado un grupo funcional específico de *Pseudomonas* en rizósfera (Mavrodi *et al*, 2007), el patógeno *Xylella fastidiosa* en plantas de cítricos (Pinheiro *et al*, 2002), la bacteria *Methylobacterium mesophilicum* endófito de *Catharanthus roseus* (Lacava *et al*, 2006), se ha monitoreado la abundancia de la PGPB *Enterobacter radicincitans* en *Brassica oleracea* (Ruppel *et al*, 2006).

Se ha optimizado el monitoreo de cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense* en rizósfera de maíz con cebadores específicos diseñados a partir de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y marcadores SCAR (sequence characterized amplified region) de fragmentos obtenidos por BOX, ERIC y RAPD-PCR (Couillerot *et al*, 2010a; Couillerot *et al*, 2010b). También se han diseñado cebadores específicos para medir abundancia de *A. brasilense* FP2 en plántulas de maíz con cebadores dirigidos al gen *nifA* (Faleiro *et al*, 2013) y en raíces de trigo con cebadores diseñados a partir de análisis *in silico* del genoma (Stets *et al*, 2015). En suelo se ha medido abundancia de *A. lipoferum* CRT1 con cebadores dirigidos a la región intergénica 16S-23S del ARNr (Baudoin *et al*, 2010) y de *Azospirillum spp.* con cebadores dirigidos al gen 16S ARNr (Lin *et al*, 2011). Se ha cuantificado *Herbaspirillum spp.* en raíces de *Vicia faba* L con cebadores dirigidos al gen 16S ARNr (Ofek *et al*, 2007). También se ha utilizado la PCR en tiempo real para un análisis proteómico de *H. seropedicae* SRm1 donde se midió por RT-qPCR (RT, retrotranscripción) la abundancia de genes expresados luego de estimular a las bacterias con el agregado de extracto de caña de azúcar al medio de cultivo (Cordeiro *et al*, 2013).

Persistencia de BPCV en plantas inoculadas

El éxito de la inoculación de un cultivo con bacterias promotoras de crecimiento vegetal depende tanto de factores bióticos como abióticos. Los factores bióticos como el genotipo de la planta y la cepa bacteriana son elementos muy importantes a la hora de formular inoculantes (Araújo *et al*, 2013; Sánchez *et al*, 2014; Ambrosini *et al*, 2015). Para que las bacterias inoculadas tengan efecto promotor del crecimiento vegetal se espera que se asocien con la planta hospedera y sobrevivan cierto tiempo durante el crecimiento de la misma. Sin embargo, son

escasos los trabajos que monitorean la abundancia de las BPCV inoculadas durante el crecimiento de la planta (Faleiro *et al*, 2013; Pereira *et al*, 2014).

Uno de los mayores problemas que enfrentan ciertas especies como *A. brasilense* y *H. seropedicae* es su sobrevivencia en suelo rizosférico y no rizosférico donde deben competir con la flora nativa del suelo (Bashan *et al*, 1995; Olivares *et al*. 1996; Bashan, 1999). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha visto que algunas cepas de *Pseudomonas* sp. y *Burkholderia* sp. endófitas y rizosféricas nativas de arroz pueden tener un rol antagonista *in vitro* frente a varias cepas de *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Se determinó que estas cepas antagonistas producen una mayor cantidad de sideróforos que las cepas de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* desafiadas, lo cual podría influir en la competencia por un nicho (Loaces *et al*, 2011; Rariz *et al*, 2013). A pesar de esto, se ha determinado que cepas de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* pueden asociarse de forma endófitas a raíces y tejido aéreo del arroz cultivado en suelo bajo condiciones controladas (Rariz *et al*, 2013; Ferrando, 2013).

En tanto, las cepas de *Herbaspirillum* y *Azospirillum* nativas del suelo que se asocian a la planta de arroz podrían competir eficientemente por el mismo nicho que las cepas inoculadas como promotoras de crecimiento. A su vez, podría ocurrir que las cepas nativas no sean tan buenas promotoras de crecimiento como las inoculadas. En tal caso, las cepas de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* inoculadas podrían ser desplazadas por las nativas, lo que disminuiría la eficiencia del inoculante.

Hasta el momento no se han realizado estudios sobre la abundancia y persistencia de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en asociación con la planta de arroz durante el ciclo de cultivo. Por lo tanto, resulta importante para la correcta utilización de inoculantes, estudiar si existen cambios en la dinámica de *Herbaspirillum* y *Azospirillum* naturalmente asociados a las raíces cuando las plantas son inoculadas con cepas de los mismos géneros.

Para abordar dicho objetivo, en el presente trabajo se optimizó un método de qPCR basado en cebadores específicos de género que permitió monitorear la abundancia de *Herbaspirillum* y de *Azospirillum* asociados a raíces de arroz. Además, se cuantificaron los diazótrofos totales mediante qPCR del gen *nifH*. De esta forma se pudo estudiar la dinámica de ambos géneros bacterianos y de los diazótrofos totales en cuatro momentos durante el ciclo de cultivo. Estos análisis se realizaron sobre plantas crecidas en condiciones controladas que fueron inicialmente inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 o con *Herbaspirillum seropedicae* z67 o plantas que no fueron inoculadas.



Objetivos

Objetivo General

Determinar la abundancia de bacterias diazótroficas y la persistencia de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en plantas de arroz inoculadas con cepas de estos géneros.

Objetivos Específicos

- 1) Diseñar estrategias metodológicas y optimizar herramientas moleculares para cuantificar bacterias de los géneros *Herbaspirillum* y *Azospirillum*.

- 2) Determinar la abundancia de *Herbaspirillum* y *Azospirillum* en plantas inoculadas con cepas de estos géneros durante el crecimiento de la planta y relacionarla con parámetros de crecimiento vegetal.

- 3) Determinar la abundancia de diazótrofos totales durante el crecimiento de la planta.



Materiales y Métodos

Optimización de qPCR para genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp.

Relevamiento de cebadores, análisis *in silico* de su especificidad y confirmación por PCR

Se realizó una búsqueda bibliográfica de cebadores que permitieran detectar y cuantificar bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* mediante PCR y PCR en Tiempo Real. Se encontraron en bibliografía cinco pares de cebadores dirigidos a una región del gen 16S ARNr y la región intergénica 16S-23S ARNr. Se estudió (Abril del 2013) la especificidad de los pares de cebadores encontrados, resumidos en la Tabla 1.1, con las herramientas TestPrime (Klindworth *et al*, 2012) y PrimerBlast (Ye *et al*, 2012) que utilizan las bases de datos Silva y NCBI respectivamente. Como consecuencia del análisis se eligieron los cebadores Azo494-F, Azo756-R, A2324f, A25r, HRS-F y HRS-R, y fueron sintetizados por Macrogen inc.

Tabla 1.1. Cebadores ensayados para determinar especificidad *in silico*.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Gen Blanco (pb producto)	Referencia
Azo494-F Azo756-R	GGCCYGWYAGTCAGRAGTG AAGTGCATGCACCCRRCGTCTAGC	16S ARNr <i>Azospirillum</i> spp. (≈260)	Shih-Yao Lin <i>et al</i> , 2011
A2324f A25r	GCGGTAATACGAAGGGGGGCK CTTGTCACCGGCAGTTCCACCAG	16S ARNr <i>Azospirillum</i> spp. (≈650)	Shime–Hattori <i>et al</i> , 2011.
fAZO rAZO	GGCGCATCCCTTCTCACGG GCTTGCGCCACGCGCAGG	IGS 16S-23S ARNr <i>Azospirillum</i> spp (≈500)	Baudoin <i>et al</i> , 2010
HRS-F HRS-R	GCAAGACCTCATGCTCCTG GACACACTCTAGCCGTG	16S ARNr <i>Herbaspirillum</i> spp. (≈455)	Ofek <i>et al</i> , 2007
16S rRNA- F 16S rRNA- R	TGTCAGGGAAGAAACGGTTTTG AGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCA	16S ARNr <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (≈73)	Cordeiro <i>et al</i> , 2013

Luego se realizaron ensayos de PCR donde se puso a punto la técnica para los cebadores Azo494-F, Azo756-R, HRS-F y HRS-R. En la optimización de la PCR para *Herbaspirillum* spp. se utilizó como control positivo ADN de *H. seropedicae* z67 y *H. seropedicae* 75 (Rariz *et al*, 2013), y como control negativo ADN de *A. brasilense* Az39, *A. brasilense* sp245, *A. largimobile* 5, *A. largimobile* 45, *P. graminis* G, *Burkholderia* sp. T3G (Rariz *et al*, 2013), *Pseudomonas* sp. G16 (Loaces *et al*, 2011) y agua MilliQ estéril. Mientras que para la PCR de *Azospirillum* spp. se utilizó como control positivo

ADN de *A. brasilense* Az39, *A. brasilense* sp245, *A. largimobile* 5, *A. largimobile* 45, y como control negativo ADN de *H. seropedicae* z67 y *H. seropedicae* 75, *P. graminis* G, *Burkholderia* sp. T3G, *Pseudomonas* sp. G16 y agua MilliQ estéril. Además se modificaron las reacciones variando la cantidad de ADN molde, cebadores, MgCl₂ y la enzima Taq Polimerasa. Las condiciones de reacción optimizadas se detallan a continuación.

Para la amplificación específica del gen 16S ARNr de *Azospirillum* mediante PCR se preparó una mix conteniendo los siguientes reactivos en su concentración final (modificado de Lin *et al*, 2011): buffer para la Taq polimerasa (Fermentas) 1x; MgCl₂ 1.5 mM (Fermentas); dNTPs 0.2 mM de cada uno (Fermentas); cebadores Azo494-F (5'-GGCCYGWYAGTCAGRAGTG-3') y Azo756-R (5'AAGTGCATGCACCCRRCGTCTAGC-3') 0.8 μM cada uno (Macrogen Inc., Korea); Taq DNA polimerasa 0.08 U μL⁻¹ (Fermentas) y agua milliQ estéril. En cada tubo de reacción de PCR se agregó 3 μL de ADN. Para realizar la PCR se utilizó un termociclador (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, Singapur) con el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos que comprenden: desnaturalización (94°C durante 1 min), hibridación (68°C durante 1.5 min) y extensión (72°C durante 0.5 min); y un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 min.

Para la amplificación específica del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* por PCR se preparó una mix conteniendo los siguientes reactivos en su concentración final (modificado de Ofek *et al*, 2007): buffer para la Taq polimerasa (Fermentas) 1x; MgCl₂ 1.5 mM (Fermentas); dNTPs (Fermentas) 0.2 mM de cada uno; cebadores HRS-F (5'-GCAAGACCTCATGCTCCTG-3') y HRS-R (5'-GACACACTCTAGCCGTG-3') 0.2 μM cada uno (Macrogen Inc., Korea); Taq DNA polimerasa 0.04 U μL⁻¹ (Fermentas) y agua milliQ estéril. En cada tubo de reacción de PCR se agregó 2 μL de ADN. Se utilizó un termociclador con el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización (95°C durante 0.25 min), hibridación (62°C durante 0.5 min) y extensión (72°C durante 0.5 min); y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10 min.

Luego se verificó la presencia del amplicón de interés. Para eso los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5x a 100V durante 40 minutos aproximadamente, usando como patrón de peso molecular el marcador 50bp (Fermentas). Para la visualización de los productos se utilizó el agente intercalante GoodView GV-II al 1.125x. Luego de cada corrida los geles fueron fotografiados (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak) bajo la luz de un transiluminador UV (UVP).

Preparación del estándar para PCR en Tiempo Real (qPCR)

Se cultivó *H. seropedicae* z67 y *A. brasilense* Az39 en medio TSA por 48 horas a 30°C y en oscuridad. Luego se extrajo ADN de cada cepa utilizando el Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), el producto se resuspendió en 50 µL de agua milliQ estéril.

A partir del ADN, se amplificó por triplicado el gen 16S ARNr de cada cepa mediante PCR. Para esto se preparó una mix conteniendo los siguientes reactivos en su concentración final: buffer para la Taq polimerasa 1x (Fermentas), MgCl₂ 2.5 mM (Fermentas); BSA 0.25 mg mL⁻¹ (Roche), dNTPs 0.2 mM de cada uno (Fermentas), cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') 0.48 µM cada uno (IDT), Taq DNA polimerasa 0.04 U µL⁻¹ (Fermentas) y agua milliQ estéril. En cada tubo de reacción de PCR se agregó 1 µL de ADN. Se utilizó un termociclador automático con el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización (94°C durante 1 min), hibridación (55°C durante 1 min) y extensión (72°C durante 3 min); y un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 min. Para verificar la presencia del amplicón de interés, los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 1% (Agarose I, Amresco) en buffer TBE 0.5x (Tris 44.5mM, ácido bórico 44.5 mM y EDTA 1.25 mM; pH 8.2) a 100V durante 30 minutos aproximadamente, usando como patrón de peso molecular el marcador 1Kb DNA ladder (Fermentas). Se utilizó el agente intercalante y método de revelado descriptos anteriormente.

Se mezclaron las réplicas de los productos de amplificación de cada cepa, se purificaron con columnas MICROCON 100 (Merck Millipore, Alemania) y se cuantificó la cantidad de ADN usando el kit Qubit dsDNA HS Assay mediante un fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). El número de copias fue calculado considerando el largo total del fragmento (1465 pb), el peso molecular del amplicón (966900 g mol⁻¹) y el número de Avogadro (6.02 x10²³). Los estándares fueron alicuotados por 2 µL y almacenados a -20°C para ser usado como estándar en todas las cuantificaciones por qPCR (2.54 x10¹⁰ y 2.58 x10¹⁰ copias del gen 16S ARNr.µL⁻¹ para *Herbaspirillum* y *Azospirillum* respectivamente).

Cuantificación por qPCR

Para la cuantificación de copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. (16SH) y *Azospirillum* spp. (16SA) se utilizó un equipo Rotor-Gene 6000 modelo 5-Plex (CORBETT Research, Australia). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 µL

conteniendo 1 μL de ADN diluído 10^{-1} , 2 μL (concentración final 1 μM) de cada cebador HRSF/R (16SH) y Azo494F/756R (16SA), y 5 μL de la mix Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Alemania). Para cada corrida se realizó una curva estándar con duplicados de cada punto. Dicha curva se hizo con las diluciones 10^{-5} a 10^{-10} . En cada corrida se incluyeron controles negativos con ADN (para abundancia de 16SH: *A. brasilense* Az39 y *Burkholderia* sp. T3G; para 16SA: *H. seropedicae* z67 y *Burkholderia* sp. T3G) y sin ADN, todas las muestras fueron cuantificadas por duplicado. El ciclo de temperaturas utilizado consistió de una etapa inicial de 5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos: desnaturalización a 95°C por 5 seg e hibridación-extensión a 60°C por 10 seg, según indicaciones del fabricante. La señal de fluorescencia se adquirió una vez por ciclo después de la etapa de hibridación-extensión, para lo cual se agregó una etapa adicional a 83°C de 1s, para evitar la contribución de los dímeros de cebadores. Para ambos géneros, el límite de cuantificación se determinó en 40 copias del gen 16S ARNr cada 100 ng de ADN de suelo, 14 copias del gen 16S ARNr cada 100 ng de ADN de semilla, 9 copias del gen 16S ARNr cada 100 ng de ADN de plantín y 23 copias del gen 16S ARNr cada 100 ng de ADN de raíz. Para verificar la especificidad de la reacción, al final de cada corrida se realizó una curva de melting incrementando la temperatura de 55 a 95°C a una tasa de 1°C por segundo. Se consideró como específico un producto de 16SH obtenido en el rango de 86 y 88°C y 16SA entre 85 y 88°C . Además, los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5x a 100V durante 40 minutos aproximadamente, usando como patrón de peso molecular el marcador 50bp (Fermentas). Se utilizó el agente intercalante y método de revelado descriptos anteriormente. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados (Macrogen Inc, Korea). Las secuencias fueron analizadas con la herramienta MEGA 6 (Tamura *et al*, 2013) y comparadas en la base de datos del NCBI con la herramienta BLAST.

Monitoreo de *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y diazótrofos totales asociados a suelo, semillas, plantines y raíces de plantas de arroz

A continuación se esquematiza el ensayo de crecimiento de plantas de arroz inoculadas y no inoculada en condiciones controladas (Figura 1.4)

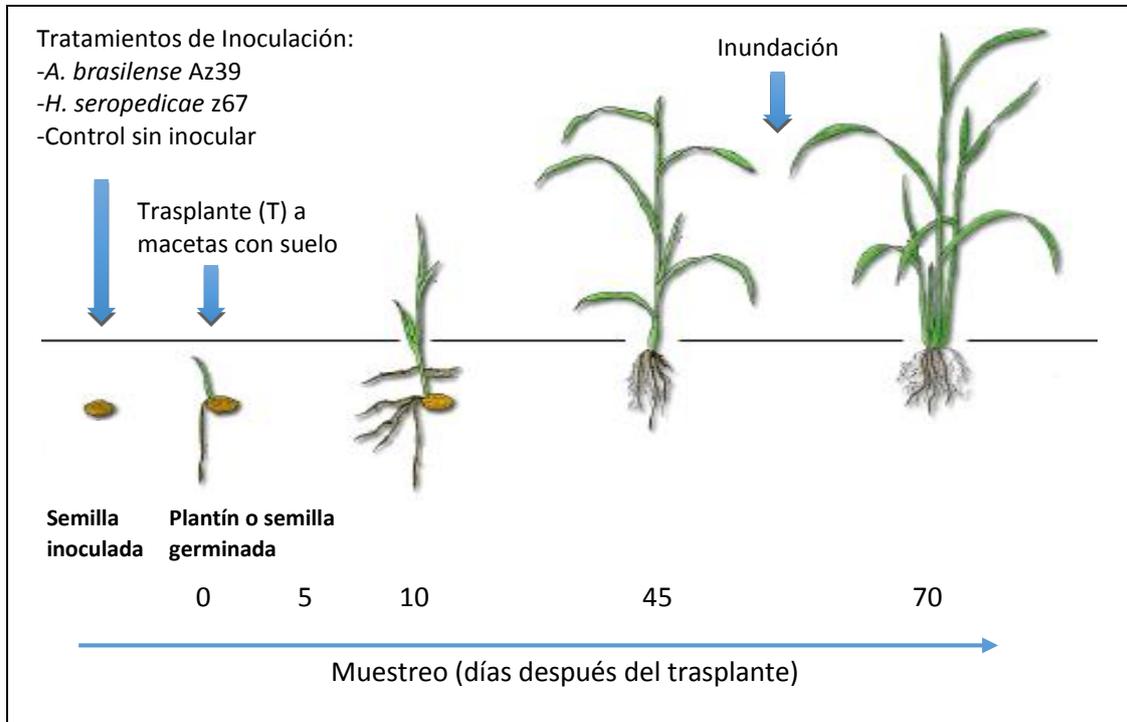


Figura 1.4. Esquema cronológico de muestreo. Se muestran los momentos de inoculación, trasplante a macetas con suelo e inundación. Por un lado se realizó un muestreo de semillas 2 horas post inoculación y un muestreo de plantines con 4 días de germinación axénica. Al mismo momento que se muestrearon los plantines, el resto de los mismos fue trasplantado a suelo (0 días después de trasplante) y se siguió muestreando a los 5, 10, 45 y 70 días después de trasplante (DDT). El cultivo fue inundado a los 45 DDT luego de tomar la muestra, y se mantuvo en condiciones de inundación hasta finalizar el ensayo (70 DDT).

En la siguiente Tabla se resumen las etapas de muestreo y los análisis realizados sobre semillas y plantas durante este experimento.

Tabla 1.2. Estrategia de análisis para el ensayo de crecimiento de plantas de arroz inoculadas y no inoculadas, en condiciones controladas.

Análisis*	Muestra					
	Semilla ** inoculada	Semilla germinada (4 días post- inoculación, 0 DDT)	Raíces de plantines transplantados a macetas con suelo (DDT)			
			5	10	45	70
qPCR <i>Azospirillum</i>	√	√	√	√	√	√
qPCR <i>Herbaspirillum</i>	√	√	√	√	√	√
qPCR diazótrofes	√	√	√	√	√	√
Recuento (NMP) de bacterias diazótrofes	√	√	√	√	Nd	√
Detección molecular de <i>Azospirillum</i> y <i>Herbaspirillum</i> en diazótrofos cuantificados	Nd	Nd	Nd	√	Nd	√
Recuperación (aislamiento) de bacterias inoculadas	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	√
Evaluación del rendimiento vegetal	-	-	√	√	√	√

* qPCR: PCR cuantitativa de los genes 16S rRNA de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* o de los genes *nifH*. Recuento de diazótrofes por NMP en medio RMR: confirmación con reducción de acetileno. Detección molecular de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en tubos positivos de NMP de diazótrofos. Recuperación de bacterias inoculadas a partir de los tubos positivos de NMP sembrados con las diluciones más concentradas.

**Inoculación con *A.brasilense* Az39, *H.seropedicae* z67 o sin inocular (Control). Germinación en condiciones axénicas.

Nd, significa no determinado. (-) No corresponde.

Muestreo, procesamiento y análisis fisicoquímico del suelo

El suelo pertenece al Gran Grupo de los Argiaquolls. Se extrajo del Este del país, de la Estación Experimental de INIA Treinta y Tres en Paso de la Laguna en el departamento de Treinta y Tres (33°16'36.2"S 54°10'11.5"W). Su último uso para el cultivo de arroz fue en la zafra 2012/13. Se tomaron tres muestras de 30 Kg, a una profundidad de 15 cm aproximadamente de sitios cercanos dentro de la Estación Experimental en agosto del 2013, se almacenó a temperatura ambiente y se comenzó a manipular en setiembre del mismo año. En el laboratorio se mezclaron las tres muestras de suelo y tamizaron, obteniendo partículas de suelos de tamaño menor o igual a 6x3 mm de lado, luego se dejaron secar durante 7 días a 30°C.

Se tomó una muestra de 200 g del suelo tamizado y seco para realizarle un análisis fisicoquímico (Tabla 1.3). El análisis fue realizado en el Laboratorio del Sur S.R.L. y consistió en las siguientes

medidas: Carbono orgánico (CO) y Materia Orgánica (MO) (método Walkley-Black, contenido de Nitrógeno (método Kjeldhal), Fósforo (método del ácido cítrico, Murphy & Riley) y Potasio (en acetato de amonio 1N pH 7.0), así como la determinación de la textura del suelo (método Bouyoucos).

Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas del suelo

CO (%)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (meq/100g)	% arena	% limo	% arcilla	Clase Textural
2,1	3.6	0.18	17	0.38	15.1	53.9	31.0	FAL

CO, Carbono Orgánico; MO, Materia Orgánica; Clase textural FAL, Franco Arcilloso Limoso.

Semillas

Se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa*) variedad INIA El Paso 144 zafra 2012/13 curadas con fungicida e insecticida, tebuconazol e imidacloprid respectivamente. Las semillas fueron proporcionadas por INIA Treinta y Tres.

Cepas bacterianas y preparación de inóculos

Las cepas utilizadas fueron *Azospirillum brasilense* Az39 proporcionada por la empresa CALISTER S.A., y *Herbaspirillum seropedicae* z67 de EMBRAPA. La identidad de estas cepas fue confirmada mediante secuenciación del gen 16S ARNr con cebadores universales (27F, 518F, 800R y 1492R) y posterior comparación de la secuencia con la base de datos NCBI.

Los inóculos fueron preparados a partir de un cultivo fresco de las cepas Az39 y z67. Las mismas se incubaron en 100 mL de caldo LB (Anexo II) durante 24 horas a 30°C y en oscuridad dentro de un matraz de 250 mL, con agitación orbital constante en shaker (Barnstead Internacional, Max Q, EUA), a una velocidad de 200 RPM. Los cultivos fueron centrifugados a 6000 RPM por 10 minutos (HermLe Z 360 K, Alemania). Luego se hicieron dos lavados sucesivos del pellet con suero fisiológico estéril (0,85 %). Se ajustaron los inóculos en suero fisiológico a una turbidez igual al estándar número 1 de la escala Mc Farland (equivalente a una Absorbancia a 600 nm igual a 0.29, medida en tubos de vidrio de diámetro 1.5 cm empleando un espectrofotómetro Milton Roy, Spectronic Genesis 5, EUA) que corresponde a una concentración bacteriana aproximada de 3.0×10^8 ufc mL⁻¹. Se confirmó el número de bacterias en suspensión mediante un recuento en placa por triplicado con medio R2A (Difco).

Inoculación y ensayo de crecimiento

Las semillas con cáscara se enjuagaron con tres lavados sucesivos de agua estéril para diluir los agentes utilizados durante el curado de las semillas. Luego se dejaron absorber el inoculante con agitación orbital a 175 RPM durante una hora en oscuridad y a 30°C, en una relación de 10 g de semilla cada 50 mL de suspensión.

Las semillas inoculadas se dejaron germinar dentro de placas de Petri, sobre gasa humedecida con suero fisiológico, en condiciones asépticas, durante 96 horas a 30°C y en oscuridad. Luego se trasplantó un plantín por maceta (9 cm diámetro mayor, 6 cm diámetro menor y 9 cm de alto) con 200 g de suelo tamizado, seco y con una fertilización basal de 20 kg N ha⁻¹ (urea), 60 Kg de P ha⁻¹ (Na₂HPO₄) y 10Kg de K ha⁻¹ (KCl), equivalente a 50:151:25 mg NPK.Kg⁻¹ suelo. El crecimiento de las plantas se llevó a cabo bajo condiciones controladas con un fotoperiodo de 16 horas con una humedad aproximada de 60% y a una temperatura de 28°C durante 70 días. A los 3 y 18 DDT (Días Después del Trasplante) se aplicó fungicida Concerto 27.5 SC (Kresoxim-metil + Tebuconazol) en una concentración equivalente a 1L ha⁻¹, y a los 21 y 38 DDT se volvió a fertilizar con 65 kg N ha⁻¹ cada vez. A partir del día 45 DDT, el cultivo fue inundado de forma individual colocando las macetas dentro de recipientes de mayor tamaño con agua hasta 5 cm por encima del suelo aproximadamente.

El diseño estadístico empleado para el experimento fue de bloques completos al azar (DBCA), se utilizaron tres bloques donde cada uno corresponde a un estante de la estantería utilizada (Figura 1.5). Se realizaron tres tratamientos según el tipo de inóculo: Az39, z67 y control sin inocular, y las plantas se evaluaron en varios momentos del cultivo: 5, 10, 45 (antes de inundar) y 70 (inundado) DDT. La posición de las macetas con los distintos tratamientos fue asignada al azar.



Figura 1.5. Ensayo de crecimiento de plantas de arroz en cámara de crecimiento, diseño de bloques completos al azar. Cada bloque corresponde a uno de los estantes que se observan en la imagen.

Evaluación de parámetros de rendimiento vegetal

A los 5, 10, 45 y 70 DDT se muestrearon 12 plantas enteras de cada uno de los tres tratamientos (4 o 6 plantas por bloque) se determinó el peso fresco, peso seco, longitud de parte aérea y longitud de raíz. Para las medidas de peso seco, las plantas se dejaron secar a 55°C durante 2 semanas, y luego se tomaron las medidas con balanza analítica (Ohaus, Adventure AR 2140).

Recuento de bacterias diazótroficas cultivables asociadas a las raíces de plantas de arroz

Se realizó un recuento por Número Más Probable (NMP, tabla de la FDA para tres replicas) en medio semisólido RMR (modificado de Elbeltagy *et al*, 2001, Anexo II) carente de nitrógeno para: semillas 2 horas post-inoculación, plantines con 4 días de germinado y para raíces de plantas con 5, 10 y 70 DDT. Las raíces se muestrearon y se enjuagaron con agua corriente para quitar el excedente de suelo adherido.

Se maceró 1 gramo de los tejidos vegetales en mortero esterilizado, luego se realizaron diluciones seriadas en suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%) y se inoculó con 1 mL de cada dilución tubos de vidrio conteniendo 9 mL de medio RMR. Las diluciones utilizadas fueron de 10^{-5} a 10^{-7} para las semillas, plantines y raíces con 5 DDT, y de 10^{-6} a 10^{-8} para raíces con 10 y 70 DDT. Los medios inoculados se incubaron durante cuatro días a 30°C en la oscuridad (Figura 1.6). Para el ensayo de reducción de acetileno (ARA, "Acetylene Reduction Assay", Tripathi & Klingmueller, 1992), se taparon los tubos con septo de butilo esterilizado y precinto de aluminio. Se inyectó

en los tubos, mediante jeringa de plástico equipada con válvula gas-tight (VICI Valco Instrument Co., Inc.), la cantidad necesaria de acetileno (AGA, 99.95% de pureza) para obtener una concentración final aproximada de 10% v/v en el headspace. Se incubó nuevamente a 30°C y se evaluó la producción de etileno a los tres días de incubación mediante cromatografía gaseosa. Se inyectaron 0.5 mL de cada muestra en un cromatógrafo SRI 8610 (EUA) equipado con detector de ionización de llama (con flujo de Hidrógeno entre 15-16 mL min⁻¹) y una columna Porapak R (80/100 mesh, 6 feet x 1/8 inch, Supelco, EUA), utilizando N₂ como gas carrier (con un flujo de 54 mL min⁻¹), con 45°C de temperatura de horno y temperatura ambiente en el inyector. Los cromatogramas se analizaron con el software Peaksimple2 (SRI Instruments, California), se registraron las áreas y se compararon con una curva estándar de etileno. Como control positivo se usaron las cepas Az39 y z67. Se tomaron como tubos positivos aquellos que tuvieran crecimiento microaerofílico y un área de etileno 10% mayor al nivel basal del medio de cultivo control con acetileno, no inoculado. El recuento de diazótrofes se evaluó mediante un análisis no estadístico, donde se compararon los intervalos de confianza para los valores de NMP calculados.

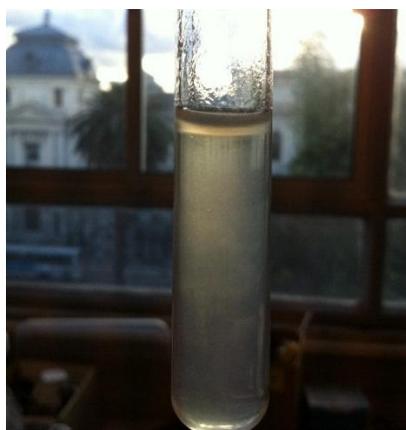


Figura 1.6. Crecimiento típico (película en la zona microaerofílica) obtenido en recuento de fijadoras de nitrógeno (medio RMR, 4 días de incubación en oscuridad y a 30°C) confirmado por el ensayo de ARA.

Detección molecular de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* entre los diazótrofes cultivables asociados a raíces de arroz

Se extrajo ADN a partir del medio de cultivo utilizado para el recuento por NMP de diazótrofes realizado en raíces de plantas con 10 y 70 DDT. La extracción se realizó sobre un tubo de cada bloque (3 tubos por tratamiento), de aquellos tubos positivos de las diluciones menores. Se utilizó el kit PowerSoil (MO BIO) según recomendaciones del fabricante y luego se corrió un gel

de agarosa al 1% (Agarose I, Amresco) en buffer TBE 0.5x (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM y EDTA 1.25 mM; pH 8.2) a 100 V durante 30 minutos aproximadamente para corroborar la presencia de ADN extraído. Como patrón de peso molecular se usó el marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas). Se utilizó el agente intercalante y método de revelado descritos anteriormente.

Para la amplificación específica del gen 16S ARNr de *Azospirillum* spp. y de *Herbaspirillum* spp. se procedió según las condiciones detalladas anteriormente. Para verificar la presencia del amplicón de interés, los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5x a 100V durante 40 minutos aproximadamente, usando como patrón de peso molecular el marcador 50bp (Fermentas). Se utilizó el agente intercalante y método de revelado descritos anteriormente. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados (Macrogen Inc, Korea). Las secuencias fueron analizadas con la herramienta MEGA 6 y comparadas en la base de datos del NCBI con la herramienta BLAST.

Aislamiento de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. a partir de tubos positivos de NMP de diazótrofos totales

Se subcultivaron los tubos del NMP de los 70 DDT a medio de cultivo semisólido sin nitrógeno Nfb y jNfb diseñados para el enriquecimiento de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. respectivamente (Döbereiner, 1995). En Nfb se repicaron tubos de tratamiento inoculado con *Azospirillum* y del tratamiento control no inoculado, mientras que en jNfb se repicaron tubos de tratamiento inoculado con *Herbaspirillum* y tratamiento control no inoculado. Se realizaron 3 repiques sucesivos en el mismo medio de cultivo cada 10 días. Al último repique se le realizó ARA y se consideraron tubos positivos aquellos que dieron ARA positivo (área $\geq 10\%$ del control positivo, Az39 y z67), crecimiento microaerofílico y además viraje de color en el medio de cultivo al azul. Luego, de los tubos positivos se aislaron cepas utilizando el mismo medio de cultivo sólido suplementado con fuente de nitrógeno. Se aislaron bacterias cuya morfología era macroscópicamente similar a la de aquellas inoculadas. Se extrajo ADN con Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) y se confirmó su identidad mediante secuenciación completa del gen 16S ARNr con dos pares de cebadores universales (27F - 800R y 518F -1492R) y posterior comparación con la base de datos del NCBI.

Cuantificación de genes 16S ARNr de *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y diazótrofos totales por qPCR

Se realizó la extracción de ADN del suelo utilizado en las macetas mediante el kit PowerSoil (MOBIO), partiendo de 0.5 g de suelo seco, y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La extracción de ADN de semillas después de 2 horas de inoculadas, de plantines con 4 días de germinados antes de trasplantar a macetas (0 DDT) y de raíces (enjuagadas con agua corriente) de plantas con 5, 10, 45 y 70 DDT se realizó según el protocolo para extracción de ADN vegetal de Doyle & Doyle (1987). Para eso se pulverizó el tejido vegetal con nitrógeno líquido en morteros previamente enfriados. La muestra se almacenó en microtubo de 2 mL esterilizados y se congeló con nitrógeno líquido antes de ser almacenado en freezer -80 °C. Brevemente, siguiendo el protocolo de extracción, 20 a 200 mg de material molido (según momento de muestreo) fue tratado con buffer CTAB 2x, se incubó a 65 °C por 45 min. Posteriormente se hizo una extracción cloroformo/alcohol isoamílico y el ADN se precipitó con isopropanol. Se centrifugó, se resuspendió en buffer TE, y por último se realizó un tratamiento con ARNasa 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 37°C durante 30 min. El extracto obtenido en todos los casos se corrió en gel de agarosa 1% para corroborar la presencia y calidad del ADN. La cantidad de ADN se cuantificó kit Qubit dsDNA HS Assay mediante un fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

Para cuantificar las copias del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* (16SH) y *Azospirillum* (16SA) se procedió según lo detallado anteriormente en la sección Cuantificación por qPCR.

Para la cuantificación de copias del gen *nifH* se utilizó un equipo Rotor-Gene 6000, modelo 5-Plex. La amplificación se realizó en un volumen final de 10 μL conteniendo 1 μL de ADN diluido 10^{-1} , 2 μL (concentración final 1 μM) de cada cebador PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') diseñados por Poly *et al* (2001), y 5 μL de la mix Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit. Para cada corrida se realizó una curva estándar con duplicados de cada punto. Dicha curva, se hizo con las diluciones 10^{-5} a 10^{-10} del estándar cuya concentración era de 3.38×10^{10} copias *nifH*. μL^{-1} . El estándar fue preparado anteriormente por Ferrando *et al* (2015) a partir del producto de PCR *nifH* de *Methylogaea oryzae* (EU672874). El fragmento parcial del gen *nifH* fue clonado y amplificado con los cebadores universales T3 y T7, para ser utilizado como estándar. En cada corrida las muestras y el control negativo sin ADN fueron analizados por duplicado. El ciclo de temperaturas utilizado consistió de una etapa inicial de 5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos: desnaturalización a 95°C por 5 seg e hibridación-extensión a 60°C por 10 seg, según indicaciones del fabricante. La señal de fluorescencia se adquirió una vez por ciclo después de la etapa de hibridación-extensión, para lo cual se agregó una etapa

adicional a 82°C de 1s, para evitar la contribución de los dímeros de cebadores. Para verificar la especificidad de la reacción, al final de cada corrida se realizó una curva de melting incrementando la temperatura de 55 a 95°C a una tasa de 1°C por segundo. Se consideró como específico un producto obtenido en el rango de 90 y 92°C. El límite de cuantificación se estableció en 47 copias de *nifH* cada 100 ng ADN de suelo, 17 copias de *nifH* cada 100 ng ADN de semilla, 11 copias de *nifH* cada 100 ng de plantín y 28 copias de *nifH* cada 100 ng ADN de raíz.

Para verificar la presencia del amplicón de interés en las distintas cuantificaciones por qPCR, los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5x a 100V durante 40 minutos aproximadamente, usando como patrón de peso molecular el marcador 50bp (Fermentas). Se utilizó el agente intercalante y método de revelado descritos anteriormente. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados (Macrogen Inc, Korea). Las secuencias fueron analizadas con la herramienta MEGA 6 y comparadas en la base de datos del NCBI con la herramienta BLAST.

Los resultados de la cuantificación para cada determinación (duplicados técnicos) se promediaron y corrigieron por la dilución realizada. Los mismos se expresaron por ng de ADN total extraído para poder comparar la concentración en distintos tejidos ya que se observaron diferencias en la eficiencia de extracción de ADN y/o en la cantidad de material genético de las muestras de semilla, plantines y raíces.

Análisis estadístico

El diseño estadístico planteado para este trabajo experimental fue de bloques completos al azar. A partir de los datos recopilados del desarrollo vegetal (peso seco, peso fresco, longitud de tejido aéreo y radicular) y de las medidas de abundancia (copias de genes *nifH* y 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp.) de los tres bloques de cada tratamiento se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias obtenidas mediante el test de Tukey con $\alpha = 0.05$. Para esto se utilizó la plataforma RStudio versión 0.97.336 (Racine, 2012), del software R versión 2.15.3 (R Core Team, 2013).



Resultados

Optimización de qPCR para genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp.

Evaluación *in silico* de cebadores

Se realizó la búsqueda bibliográfica de cebadores específicos para los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* y se encontraron cinco pares de cebadores cuyas principales características se resumen en la Tabla 1.4. Se evaluó la especificidad *in silico* de estos cebadores usando las herramientas online TestPrime y PrimerBlast (ver Anexo I) que permitieron descartar aquellos que potencialmente podrían reconocer secuencias de géneros bacterianos.

Tabla 1.4. Resumen características cebadores específicos utilizados en diferentes reacciones de amplificación por PCR. Se resaltan en negrita los cebadores seleccionados para utilizar en este trabajo.

Nombre del par	Gen Blanco (pb producto)	Uso	Referencia	Evaluación <i>in silico</i> (este trabajo)
16S rRNA-F 16S rRNA-R	16S ARNr <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (≈73)	Expresión de genes.	Cordeiro <i>et al</i> , 2013	Amplifica especies de <i>Herbaspirillum</i> con 1 mismatch en últimas 3 posiciones del extremo 3'
HRS-F HRS-R	16S ARNr <i>Herbaspirillum</i> spp. (≈455)	Abundancia en raíces de <i>Vicia faba</i> L.	Ofek <i>et al</i> , 2007	Amplifica otros géneros con un mismatch en extremo 3'
fAZO rAZO	IGS 16S-23S ARNr <i>Azospirillum</i> spp (≈500)	Detección en rizósfera de maíz.	Baudoin <i>et al</i> , 2010	Produce varios amplicones de distinto tamaño en algunas especies de <i>Azospirillum</i>
A2324f A25r	16S ARNr <i>Azospirillum</i> spp. (≈650)	Detección en cepas aisladas.	Shime–Hattori <i>et al</i> , 2011.	Amplifica <i>Azospirillum</i> y cepas de <i>Rhodospirillum</i> . (con 0 mismatch)
Azo494-F Azo756-R	16S ARNr <i>Azospirillum</i> spp. (≈260)	Detección en suelo.	Lin <i>et al</i> , 2011	Amplifica solamente <i>Azospirillum</i> con 0,1 y 2 mismatches

El análisis *in silico* realizado permitió seleccionar los pares de cebadores a utilizar para la cuantificación de los géneros *Herbaspirillum* y *Azospirillum*.

Dentro de los cebadores reportados en bibliografía para *Herbaspirillum*, los cebadores 16S rRNA-F/R, diseñados para evaluar la expresión génica de la cepa *H. seropedicae* SRm1 (Cordeiro *et al*,

2013), mostraron complementariedad sin mismatches para esa cepa y también para otras especies de *Herbaspirillum*. Se vio que había secuencias de otras especies de *Herbaspirillum* que presentaron 1 mismatch en el extremo 3' del cebador forward. Dado que algunas especies de *Herbaspirillum* presentaron 1 mismatch en la región de anclaje de la ADN polimerasa (extremo 3') y que hay secuencias de otros géneros bacterianos que son 99% complementarias a los cebadores, se optó por no trabajar con estos cebadores.

Por otra parte, los cebadores HRS-F/R (Ofek *et al*, 2007) diseñados para detectar y medir abundancia de *Herbaspirillum* spp. en raíces de *Vicia faba* L. por qPCR, presentaron complementariedad sin mismatches con especies del género *Herbaspirillum*, y tienen 1 a 2 mismatches en el extremo 3' de cada cebador para algunas especies de otros géneros relacionados (Figura AI-1). Se consideró que al tener mismatches en los extremos 3', la probabilidad de que la ADN polimerasa utilice dicho sitio como cebador es baja, por lo tanto también sería poco probable obtener amplificación inespecífica. Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas fue que se decidió trabajar con este set de cebadores para el género *Herbaspirillum*.

De forma similar, se realizó la evaluación de los diferentes pares de cebadores reportados en la literatura para *Azospirillum*.

Los cebadores fAZO/rAZO (Baudoin *et al*, 2010), dirigidos a *Azospirillum*, no presentaron complementariedad con otros géneros cuando se filtró la búsqueda con 0 y 1 mismatch. En cambio, otros autores observaron mediante PCR, la presencia de varios amplicones de diferente tamaño tanto en *Azospirillum* como en otros géneros (Baudoin *et al*, 2010; Shime–Hattori *et al*, 2011; Jijón *et al*, 2015). Por lo tanto estos cebadores no serían adecuados para medir abundancia de *Azospirillum* spp. por qPCR.

Los cebadores A2324f/A25r fueron diseñados y utilizados por Shime–Hattori *et al* (2011) para detectar *Azospirillum* spp. en aislamientos bacterianos de raíces y rizósfera de diversos cereales y pasturas forrajeras. Si bien determinaron que éstos cebadores son específicos para *Azospirillum* spp., también resultaron ser complementarios para *Rhodocista centenaria*. El análisis *in silico* de estos cebadores mostró un reconocimiento sin mismatches para secuencias de *Azospirillum* spp., así como también para algunas cepas de *Rhodospirillum* sp. Al filtrar la búsqueda por 1 mismatch se observó complementariedad con *Azospirillum* spp. y con especies que no pertenecen a la familia de *Rhodospirillaceae*.

En cambio, los cebadores Azo494-F/Azo756-R (Lin *et al*, 2011) mostraron reconocer *in silico*, solamente secuencias del género *Azospirillum* cuando se filtró la búsqueda con 0, 1 y 2

mismatches y con 0 mismatch en las primeras 3 bases del extremo 3'. También se observó que especies de otros generos relacionados poseen 3 o más mismatches (Figura AI-2). Dada la especificidad de estos cebadores por *Azospirillum* spp. y que es poco probable la amplificación inespecífica, se decidió trabajar con este set de cebadores para el género *Azospirillum*.

Evaluación experimental de los cebadores mediante PCR

Los cebadores seleccionados en el análisis *in silico* fueron probados experimentalmente mediante PCR convencional.

En el caso de *Azospirillum*, se evaluaron dos pares de cebadores. El par A2324f/A25r para *Azospirillum* spp. se utilizó en las condiciones establecidas por los autores y se observó amplificación inespecífica del tamaño esperado a partir del ADN de *Herbaspirillum seropedicae* 75 y *Paenibacillus graminis* G utilizado como control negativo. Además no se obtuvo producto de amplificación con la cepa *A. brasilense* 42M. Por esta razón se decidió no utilizar dichos cebadores para este trabajo.

El segundo par de cebadores probado para *Azospirillum* spp. fue el par Azo494-F/Azo756-R obteniéndose un amplicón del tamaño esperado para ADN de las cepas *A. brasilense* sp245, *A. brasilense* 42M, y las cepas 5 y 45 de *A. largimobile* en las condiciones reportadas por los autores. Sin embargo, a pesar que no se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado para los controles negativos *Herbaspirillum seropedicae* 75 y *Paenibacillus graminis* G, fue necesario ajustar la concentración de MgCl₂ de 2 a 1.5 mM para eliminar la amplificación de una banda inespecífica de menor tamaño.

En el caso de la detección de *Herbaspirillum* spp. por PCR se evaluaron los cebadores HRS-F/R y se observó que el ADN de *Azospirillum brasilense* Az39 utilizado como control negativo amplificó inespecíficamente. Sin embargo, esta inespecificidad fue eliminada disminuyendo la concentración de MgCl₂ de 2 a 1.5 mM (condiciones finales detalladas en sección Materiales y Métodos).

Evaluación experimental de los cebadores en las reacciones de qPCR

Optimización de condiciones de qPCR

Basados en la evaluación positiva de los pares de cebadores Azo494-F/Azo756-R y HRS-F/R para *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp., respectivamente, se realizó la optimización de la PCR en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de ambos géneros.

Para la reacción de cuantificación se utilizó ADN diluido 10^{-1} y $1 \mu\text{M}$ de cada cebador, se realizaron 40 ciclos de amplificación, y la adquisición de la fluorescencia fue tomada a los 83°C para evitar la contribución de dímeros de cebadores. La curva estándar para la cuantificación del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. (16SH) y de *Azospirillum* (16SA) se realizó por duplicado y se obtuvo un coeficiente de correlación lineal cuadrado de $0.995 - 0.997$ y una eficiencia de $82 - 101 \%$ para un rango dinámico de $14 - 1.4 \times 10^6$, $9 - 9 \times 10^5$, $23 - 2.3 \times 10^6$ copias del gen 16S ARNr cada 100 ng de ADN de semilla, plantín y raíz respectivamente.

Abundancia de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. y análisis de interferentes en la cuantificación

Durante la optimización de los métodos de cuantificación, tanto para *Herbaspirillum* como para *Azospirillum*, se observó amplificación inespecífica cuando se utilizaban como controles negativos ADN de *A. brasilense* Az39 y de *H. seropedicae* z67, respectivamente.

Por ejemplo, en el caso de la cuantificación de *Herbaspirillum*, al utilizar 2.58×10^6 copias del gen 16S ARNr de Az39. μL^{-1} de ADN como control negativo, se cuantificaron inespecíficamente 1.0×10^1 copias de 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. μL^{-1} de ADN, es decir se detectó una copia inespecífica cada 2.58×10^5 copias de 16SA.

Para determinar si esta amplificación inespecífica era relevante y/o si interfería en la cuantificación del número de copias de 16S ARNr de ambos géneros, se planteó realizar un ensayo de desafío, enfrentando diferentes concentraciones de copias de 16S ARNr de estándares de *H. seropedicae* z67 y *A. brasilense* Az39, con diferentes concentraciones de interferente (*A. brasilense* Az39 y *H. seropedicae* z67, respectivamente). Además, se utilizó como matriz ADN de raíces de arroz.

En particular, el ensayo de interferencia realizado para la cuantificación de 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. (16SH), consistió en cuantificar diferentes mezclas de cantidades conocidas del gen 16S de z67 (16S z67) y 16S de Az39 (16S Az39) en una matriz compuesta por $0.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

ADN, proveniente de raíces de plantas en las que previamente se había verificado que las copias del 16SH estaban por debajo del límite de detección (Figura 1.7 y Tabla 1.5).

ESQUEMA ENSAYO INTERFERENCIA PARA CUANTIFICACIÓN DE *Herbaspirillum* spp.

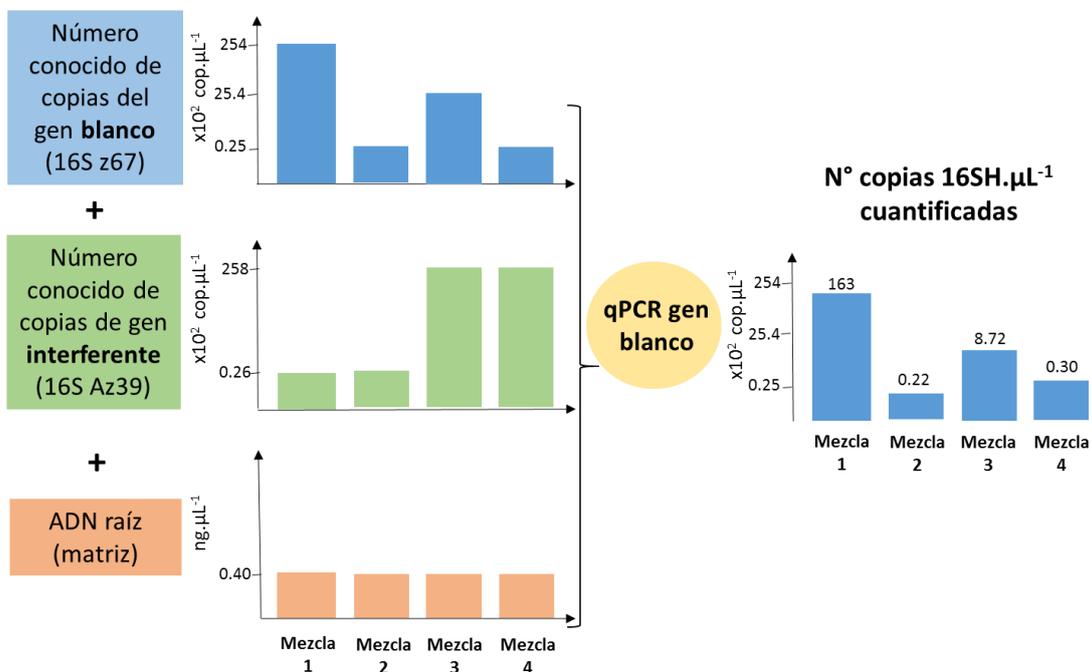


Figura 1.7. Ensayo de interferencia en la optimización de qPCR para *Herbaspirillum* spp. A la izquierda se muestra las cantidades de ADN mezclado y a la derecha el resultado de la cuantificación por qPCR. Donde 16S z67, 16S Az39 y 16SH se refiere al gen 16S ARNr de *H. seropedicae* z67, *A. brasilense* Az39 y *Herbaspirillum* spp. respectivamente.

Previo al ensayo de interferencia, se realizaron corridas de qPCR de prueba para los genes 16SA y 16SH en las muestras, y no se obtuvieron abundancias mayores a 10^4 copias μL^{-1} de ADN (con excepción del N° copias de 16SA en el tratamiento inoculado con Az39). Por lo tanto se decidió utilizar ese número de copias como la máxima de interferente en la reacción de qPCR y mezclarla con cantidades inferiores de secuencia blanco.

Tabla 1.5. Cuantificación de *Herbaspirillum* en presencia de ADN de raíz y de Az39. Se indica el número de copias del gen 16S ARNr por microlitro de ADN, correspondiente a cada especie adicionado a la mezcla de reacción así como el resultado de la cuantificación de genes de *Herbaspirillum*.

Copias del gen 16S rRNA agregadas		Copias del gen 16S rRNA de <i>Herbaspirillum</i> cuantificadas
z67	Az39	
2.54 x10 ⁴	2.58 x10 ¹	1.63 ± 0.06 x10 ⁴
2.54 x10 ¹	2.58 x10 ¹	2.19 ± 0.08 x10 ¹
2.54 x10 ³	2.58 x10 ⁴	8.72 ± 0.76 x10 ²
2.54 x10 ¹	2.58 x10 ⁴	3.03 ± 0.56 x10 ¹

La curva estándar se realizó con diluciones seriadas (10⁻⁵ a 10⁻¹⁰) del estándar 16SH y presentó un coeficiente de correlación lineal cuadrado (R²) de 0.995 y una eficiencia de 101%.

Se observó que la abundancia de 16SH se mantuvo en el mismo orden de magnitud que la cantidad de 16S z67 agregada en presencia de 2.58 x10¹ copias de 16S Az39.μL⁻¹ de ADN. Al aumentar el número de copias de 16S Az39 se observó un resultado similar aún frente al máximo desafío, mayor número de copias interferente (16S Az39) y menor número de copias de blanco (16S z67) (Tabla 1.5).

En el caso de la cuantificación del gen 16S ARNr de *Azospirillum* spp. (16SA), se realizó la cuantificación de mezclas de cantidades conocidas de los genes 16SA y 16S z67 (Tabla 1.7). Dado que las muestras poseían 16SA en cantidades detectables, se utilizó ADN extraído de raíz como matriz y fuente de genes 16SA.

La abundancia de 16SA fue previamente determinada por qPCR en la muestra de ADN de raíz utilizada como matriz y fuente de 16SA. Para corroborar que el número de copias cuantificado fuera solamente de *Azospirillum* spp., se mezclaron cantidades conocidas de 16S Az39 con ADN de raíces con cantidades presuntamente conocidas de 16SA. Se observó que al mezclar 3.06 x10² copias de 16SA del ADN de raíz, con cantidades inferiores y superiores de 16S Az39, el resultado de la cuantificación fue del mismo orden de magnitud que el de la muestra con más copias (Tabla 1.6). Teniendo en cuenta este resultado y el obtenido por las curvas de melting, donde los amplicones mostraron la T_m esperada (85-88°C), se puede inferir que las copias de 16SA cuantificadas en la muestra de ADN correspondían a *Azospirillum* spp.

Tabla 1.6. Abundancia de genes de *Azospirillum*. Se indica el número de copias del gen 16S ARNr de Az39 agregadas y la cantidad de ADN de raíz (fuente de *Azospirillum* spp.) adicionados a la mezcla, y además el resultado de la cuantificación de genes 16S ARNr de *Azospirillum* spp.

Copias 16S Az39.µL ⁻¹	ADN de raíz (ng.µL ⁻¹)	Copias 16SA cuantificadas.µL ⁻¹
0	2.46	3.06 ± 0.19 x10 ²
2.58 x10 ⁰	2.46	3.48 ± 0.03 x10 ²
2.58 x10 ¹	2.46	4.46 ± 0.06 x10 ²
2.58 x10 ³	2.46	3.04 ± 0.02 x10 ³

La curva estándar se realizó con diluciones seriadas (10⁻⁵ a 10⁻⁹) del estándar 16SA y presentó un R² de 0.997 y una eficiencia de 82%.

Luego se analizó si la presencia 16S z67 influía en la cuantificación de 16SA cuando ambos genes están presentes en la misma muestra (Figura 1.8 y Tabla 1.7). Para eso se tomó una muestra de ADN de raíz con una cantidad conocida de 16SA y se le agregó 16S z67 en una cantidad 100 veces mayor. El resultado mostró que el número de copias de 16SA en esta mezcla fue muy similar al de la muestra sola, por lo tanto la cuantificación de este gen no se vio afectada por la presencia de 16SH.

ESQUEMA ENSAYO INTERFERENCIA PARA CUANTIFICACIÓN DE *Azospirillum* spp.

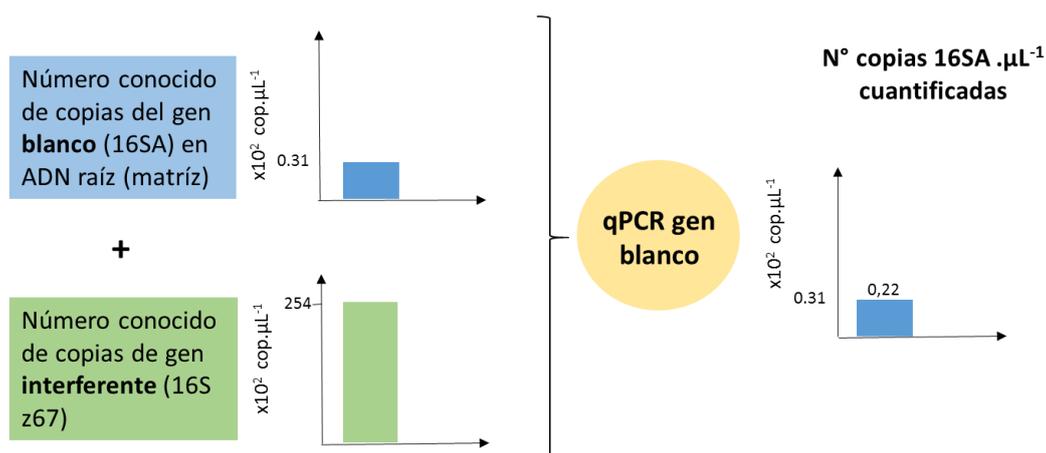


Figura 1.8. Ensayo de interferencia en la optimización de qPCR para *Azospirillum* spp. A la izquierda se muestra las cantidades de ADN mezclado y a la derecha el resultado de la cuantificación por qPCR. Donde 16SA y 16S z67 se refiere al gen 16S ARNr de *Azospirillum* spp. y *H. seropedicae* z67 respectivamente.

Tabla 1.7. Ensayo de interferencia: cuantificación de *Azospirillum* en presencia de z67. Se indica la cantidad de copias de 16S ARNr de z67 y la cantidad de ADN de raíz en la mezcla, y el resultado de la cuantificación de genes de *Azospirillum* spp.

Copias 16S ARNr z67.µL ⁻¹	ADN raíz (ng.µL ⁻¹)	Copias 16SA cuantificadas.µL ⁻¹
2.54 x10 ⁴	0	4.15 ± 1.22 x10 ⁰
0	2.46	3.06 ± 0.19 x10 ²
2.54 x10 ⁴	2.46	2.15 ± 0.33 x10 ²

La curva estándar se realizó con diluciones seriadas (10⁻⁵ a 10⁻¹⁰) del estándar 16SA y presentó un R² de 0.997 y una eficiencia de 82%.

Estos resultados indican que la cuantificación de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. no se vio afectada por amplificaciones inespecíficas en mezclas complejas.

En las optimizaciones se utilizaron los controles positivos y negativos detallados anteriormente en Materiales y Métodos. A su vez se varió la temperatura de adquisición de la fluorescencia de 60 a 83°C para evitar la contribución de dímeros de cebadores (ver Anexo I). En ambos casos se confirmó que los amplicones obtenidos de la cuantificación fueron los esperados porque la T_m, y el tamaño del fragmento obtenido (electroforesis en gel de agarosa) se correspondían con los controles positivos. Además se secuenciaron y analizaron los amplicones cuantificados en el análisis de interferencia y se obtuvo una similitud del 98-100% con secuencias de *Azospirillum* spp. o *Herbaspirillum* spp. según el amplicón analizado.

Ensayo de crecimiento de plantas de arroz inoculadas y no inoculadas en condiciones controladas

Se tomaron semillas de arroz enjuagadas con agua estéril y se realizaron dos tratamientos de inoculación con *Azospirillum brasilense* Az39 y *Herbaspirillum seropedicae* z67, y un control sin inocular. Las semillas se hicieron germinar en condiciones axénicas durante cuatro días y luego se trasplantaron a suelo donde permanecieron hasta 70 días después del trasplante (DDT). Durante ese periodo se tomó muestra de suelo, semillas, plantines con 4 días de germinado (sin contacto con suelo), y raíces de plantas a los 5, 10, 45 y 70 DDT. Con las muestras obtenidas se analizó el desarrollo vegetal, se midió la abundancia de diazotófos totales, y se realizó la detección, aislamiento y cuantificación de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. A continuación se detallan los resultados obtenidos en los análisis realizados.

Evaluación de rendimiento vegetal

La información obtenida de peso fresco, peso seco y longitud de raíz y parte aérea de las muestras a los 5, 10, 45 y 70 DDT se analizó estadísticamente (Tabla AI-1). Solamente se encontraron diferencias significativas en la longitud de parte aérea de plantas con 10 DDT donde para el tratamiento inoculado con z67, el largo de parte aérea fue 12% superior al del control sin inocular (Figura 1.9).

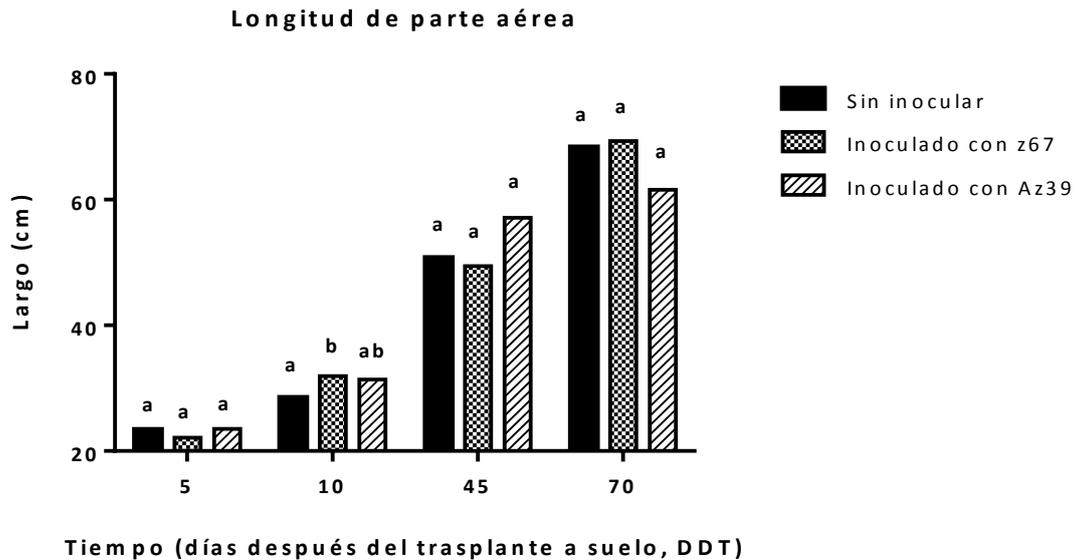


Figura 1.9. Medidas de longitud de parte aérea a distintos tiempos. Las columnas con letras iguales, en cada tiempo de muestreo, indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos para $p=0,05$ (Test de Tukey).

Se observó un crecimiento vigoroso de las plantas que se mantuvo hasta aproximadamente 15 DDT, luego de ese período se vio que los extremos de algunas hojas comenzaron a marchitarse. Las plantas afectadas fueron examinadas superficialmente y no se detectó la presencia de insectos. Si bien las plantas no murieron, se observó un debilitamiento de la zona foliar que se mantuvo hasta el día 70.

A pesar del aumento de la longitud de la parte aérea obtenido en el tratamiento inoculado con z67 en plantas con 10 DDT, se observó que las cepas inoculadas no afectaron el desarrollo del cultivo en las condiciones empleadas.

Abundancia de bacterias diazótrofes cultivables asociadas a las raíces de plantas arroz

En los recuentos de diazótrofes, solo se observó crecimiento característico (película en zona microaerofílica) en viales que contenían muestras que tuvieron contacto con el suelo y muestras que no tuvieron contacto con el suelo pero fueron inoculados con Az39 o z67. Tanto en la semilla como en el plantín del tratamiento sin inocular el NMP de diazótrofes fue menor a 3.0×10^4 .g⁻¹ de tejido (ningún tubo positivo). En los tratamientos inoculados con Az39 y z67 se obtuvo un NMP de 4.5×10^5 y 2.4×10^6 .g⁻¹ de semilla respectivamente, y un NMP mayor o igual a 2.4×10^7 .g⁻¹ de plantín en ambos tratamientos. Esto indica que las bacterias diazótrofes nativas asociadas a la semilla se encuentran en cantidades inferiores a 3.0×10^4 g⁻¹ tejido y por otro lado, que las bacterias inoculadas crecieron durante la germinación de la semilla.

En los recuentos de bacterias diazótrofes asociadas a la raíz no se encontraron diferencias entre los tratamientos de los tres tiempos analizados (5, 10 y 70 DDT) dado que los intervalos de confianza (95% de probabilidad) se superponen. Resulta interesante destacar que el NMP del tratamiento sin inocular se vio incrementado a 10^6 g⁻¹ raíz luego de tomar contacto con el suelo. Esto indica que las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo se asocian a la planta de arroz rápidamente. Se observó también que a los 70 DDT, luego de 25 días de inundación, el NMP de diazótrofes asociados a raíz tiende a estabilizarse en valores de entre 10^6 - 10^7 .g⁻¹ raíz en los tres tratamientos (Tabla 1.8).

Los resultados muestran que las semillas del Paso 144 no tienen o tienen un número diazótrofes nativos cultivables por debajo del límite de cuantificación. Sin embargo, cuando las raíces de las plantas tomaron contacto con el suelo, bastaron 5 días para que las diazótrofes del suelo se asociaran a éstas en cantidades del mismo orden que las plantas inoculadas. Además se pudo determinar que la abundancia de diazótrofes se mantuvo relativamente estable desde 5 DDT hasta 70 DDT independientemente del tratamiento.

Tabla 1.8. Estimación del máximo número de diazótrofos cultivables durante el ciclo de cultivo. Se muestran los resultados de NMP obtenidos por gramo de tejido fresco con su correspondiente límite de confianza (LDC, 95%). Los resultados de semilla y plantín corresponden al mayor valor obtenido para dos replicados técnicos, mientras que para las raíces es el mayor valor de tres réplicas biológicas (bloques).

Trat.	Número Más Probable de diazótrofos por gramo de tejido (LDC)				
	Semilla 2h	Plantín 0 DDT	Raíz 5 DDT	Raíz 10 DDT	Raíz 70 DDT
C	$<3.0 \times 10^4$ (-)	$<3.0 \times 10^4$ (-)	1.1×10^7 (0.2-4.8 $\times 10^7$)	$\geq 2.4 \times 10^5$ (-)	4.3×10^6 (0.7-21 $\times 10^6$)
Az39	7.5×10^5 (1.4-23 $\times 10^5$)	$\geq 2.4 \times 10^7$ (-)	1.1×10^7 (0.2-4.8 $\times 10^7$)	1.1×10^8 (0.2-4.8 $\times 10^8$)	1.5×10^7 (0.3-4.4 $\times 10^7$)
z67	4.5×10^5 (0.4-13 $\times 10^6$)	$\geq 2.4 \times 10^7$ (-)	2.9×10^7 (0.9-10 $\times 10^7$)	1.1×10^8 (0.2-4.8 $\times 10^8$)	4.6×10^7 (0.7-24 $\times 10^7$)

Se emplearon los tratamientos (Trat.) sin inocular (SI), inoculado con z67 (z67) e inoculado Az39 (Az39). Se analizaron semillas con 2 horas de inoculada (2h), plantines con 4 días de inoculados y germinados sin contacto con suelo (al momento antes de trasplantar, 0 DDT), y raíces con 5, 10 y 70 DDT (Días Después de Trasplantar).

Detección molecular de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. entre los diazótrofos cultivables asociados a raíces de arroz

En los tubos de NMP con medio RMR en los que se observó crecimiento se realizó la detección molecular de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* a los días 10 y 70 después del trasplante. El resultado de este análisis muestra que en el medio para diazótrofos se recuperó mayoritariamente *Herbaspirillum* en los primeros días de cultivo (en los 3 bloques de las plantas inoculadas con z67 y de plantas no inoculadas, y en 2 bloques de plantas inoculadas con Az39) pero fue menos frecuentemente detectado en plantas de 70 días (Tabla 1.9). Contrariamente, *Azospirillum* se detectó en un sólo bloque de las plantas inoculadas con Az39 a los 10 DDT, pero fue detectado en los tres tratamientos después de la inundación. Resulta interesante destacar que entre las bacterias diazótrofas asociadas a las plantas sin inocular se detectó la presencia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. y, al igual que en las plantas inoculadas, *Herbaspirillum* se encontraba en plantas pequeñas (10 DDT) mientras que *Azospirillum* estaba en altas densidades en plantas grandes después de la inundación (70 DDT).

Tabla 1.9. Detección de *Herbaspirillum* y *Azospirillum* por PCR con cebadores específicos a partir de tubos positivos en la cuantificación por NMP de diazótrofos. El resultado muestra la cantidad de tubos con amplificación positiva en un total de 3 tubos analizados por tratamiento.

Inóculo*	Número de tubos con amplificación positiva para los cebadores específicos			
	10 DDT		70 DDT	
	16SA**	16SH**	16SA	16SH
Control	0	3	3	1
<i>H. seropedicae</i> z67	0	3	2	0
<i>A. brasilense</i> Az39	1	2	3	1

*Se analizaron tubos de la dilución 10^{-3} del tratamiento control de 10 DDT, 10^{-6} del tratamiento control de 70 DDT y 10^{-6} de los tratamientos inoculados de ambos tiempos de muestreo.

**16SA y 16SH corresponden al amplicón del gen 16S ARNr de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. respectivamente.

En la mayoría de los casos la secuencia de los amplicones 16SA y 16SH (aproximadamente 200 y 350 pb respectivamente) fue de buena calidad y se observó una similitud de 98-100% con *Azospirillum* spp. o *Herbaspirillum* spp. depositados en la base de datos. Se observó que las secuencias de 16SH a los 10 DDT de los tres tubos del Control y de dos tubos del tratamiento inoculado con Az39 dieron 99% similar a *H. huttiense* y sólo 97.4% similar a *H. seropedicae*.

Aislamiento de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. a partir de tubos positivos de NMP de diazótrofos totales

De los tubos de NMP del tratamiento inoculado con Az39 muestreado a los 70 DDT se logró aislar dos cepas con características macro y microscópicas similares a la inoculada. Para confirmar la identidad de las cepas aisladas, se secuenció el gen 16S ARNr (aproximadamente 1300 pb) y se observó para ambas una similitud de 100% con la secuencia de *A. brasilense* Az39 depositada en la base de datos del NCBI (JQ844453.1). Esto indicaría que las cepas aisladas son de la misma especie que la inoculada. Por otra parte, no se recuperaron cepas de los géneros *Herbaspirillum* y *Azospirillum* de los tratamientos inoculado con z67 y sin inocular en ese momento del cultivo (70 DDT)

Abundancia de genes 16S ARNr de *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y diazótrofos totales asociados a suelo, semillas, plantines y raíces de plantas de arroz

A partir del ADN extraído del suelo y tejido vegetal (semillas, plantines y raíces de plantas), se cuantificaron las copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp., y del gen *nifH* como marcador de la abundancia de bacterias diazótroficas (Tablas AI-3 y AI-4). Para realizar el análisis estadístico se calculó la cantidad de copias por ng de ADN extraído para estandarizar los valores y poder compararlos debido a que la eficiencia de extracción de ADN en las muestras fue diferente (Tabla AI-2). Se evaluó cada tratamiento de inoculación por separado, y se comparó la abundancia de cada gen en los diferentes tiempos de muestreo (Figura 1.10).

Se observó que el suelo utilizado en macetas para crecer las plantas poseía una abundancia de de 8.5×10^2 copias de 16SH y 9.2×10^1 copias de *nifH* por nanogramo de ADN de suelo, mientras que 16SA estuvo por debajo del límite de cuantificación (4 copias 16SA.10ng ADN de suelo).

En plantines del tratamiento sin inocular (Figura 1.10A), a los 0 DDT, se cuantificaron 5.5×10^2 copias del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* por ng de ADN de tejido, mientras que para *Azospirillum* y otros diazótrofos la abundancia fue menor a 1 copia del gen por ng ADN. A partir del trasplante a macetas, en estas plantas no inoculadas solamente se encontraron diferencias significativas para la abundancia de *Herbaspirillum* entre los primeros dos muestreos (5 y 10 DDT) y los últimos (45 y 70 DDT). Se observó que el número de copias disminuye gradualmente desde el día 5 DDT hasta los 45 DDT y luego de la inundación cae abruptamente a menos de 1 copia.ng⁻¹ ADN (70 DDT). Por otra parte no se observaron diferencias significativas para la abundancia de *Azospirillum* y diazótrofos en los distintos tiempos de muestreo. Además, a

diferencia de lo que ocurrió con *Herbaspirillum* luego de la inundación, la abundancia de copias de los genes 16SA y *nifH* se mantuvo relativamente constante durante el ensayo.

En el tratamiento inoculado con *H. seropedicae* z67 (Figura 1.10B) se observó que la abundancia de diazótrofos en semilla y plantín se corresponde con la abundancia de genes 16SH. A partir del trasplante en suelo, solamente se encontraron diferencias significativas en la abundancia de *Herbaspirillum* entre los primeros dos muestreos (5 y 10 DDT) y los últimos (45 y 70 DDT). Se pudo observar que la inoculación con z67 no impidió la colonización de las raíces por *Azospirillum* proveniente del suelo, que además persistió por más tiempo que *Herbaspirillum*. Lo mismo se observó con los genes *nifH* cuantificados, una parte de los cuales podrían corresponder a *Azospirillum*.

En este tratamiento se observó que a los 5 y 10 DDT la cantidad de copias de 16SH es mayor que para el tratamiento sin inocular. Esta diferencia posiblemente esté dada por el aporte del inóculo. Luego, a los 45 DDT se vio una disminución del número de copias más drástica que en el tratamiento sin inocular, que terminó siendo, a los 70 DDT, menos de 1 copia.ng⁻¹ ADN. En general se observó que la abundancia de *Herbaspirillum* tiende a disminuir a medida que la planta crece, tanto en el tratamiento control como en el inoculado con z67.

En el tratamiento inoculado con *A. brasilense* Az39 (Figura 1.10C) se observó que la abundancia de copias de 16SA y *nifH* en semilla y plantín está dada por el inóculo empleado. A partir del trasplante en suelo se obtuvieron diferencias significativas en la abundancia de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* entre el primer muestreo (5 DDT) y los últimos dos (45 y 70 DDT). El número de copias de 16SA y 16SH disminuyó con el tiempo hasta obtener, a los 70 DDT, menos de 10 y 1 copias .ng⁻¹ de ADN de raíz respectivamente. A su vez, la abundancia de genes *nifH* se mantuvo en el tiempo, lo que indicaría que hubo colonización de las raíces por otras diazótrofes cuya abundancia se mantiene en el orden de 10² copias.ng⁻¹ ADN aún después de la inundación.

Se observó que la inoculación con Az39 modificó la tendencia del número de copias de 16SA observada en los otros tratamientos. También se determinó que a 0 DDT la abundancia de 16SH parece ser menor que en el tratamiento sin inocular, sin embargo la tendencia durante el cultivo fue la misma.

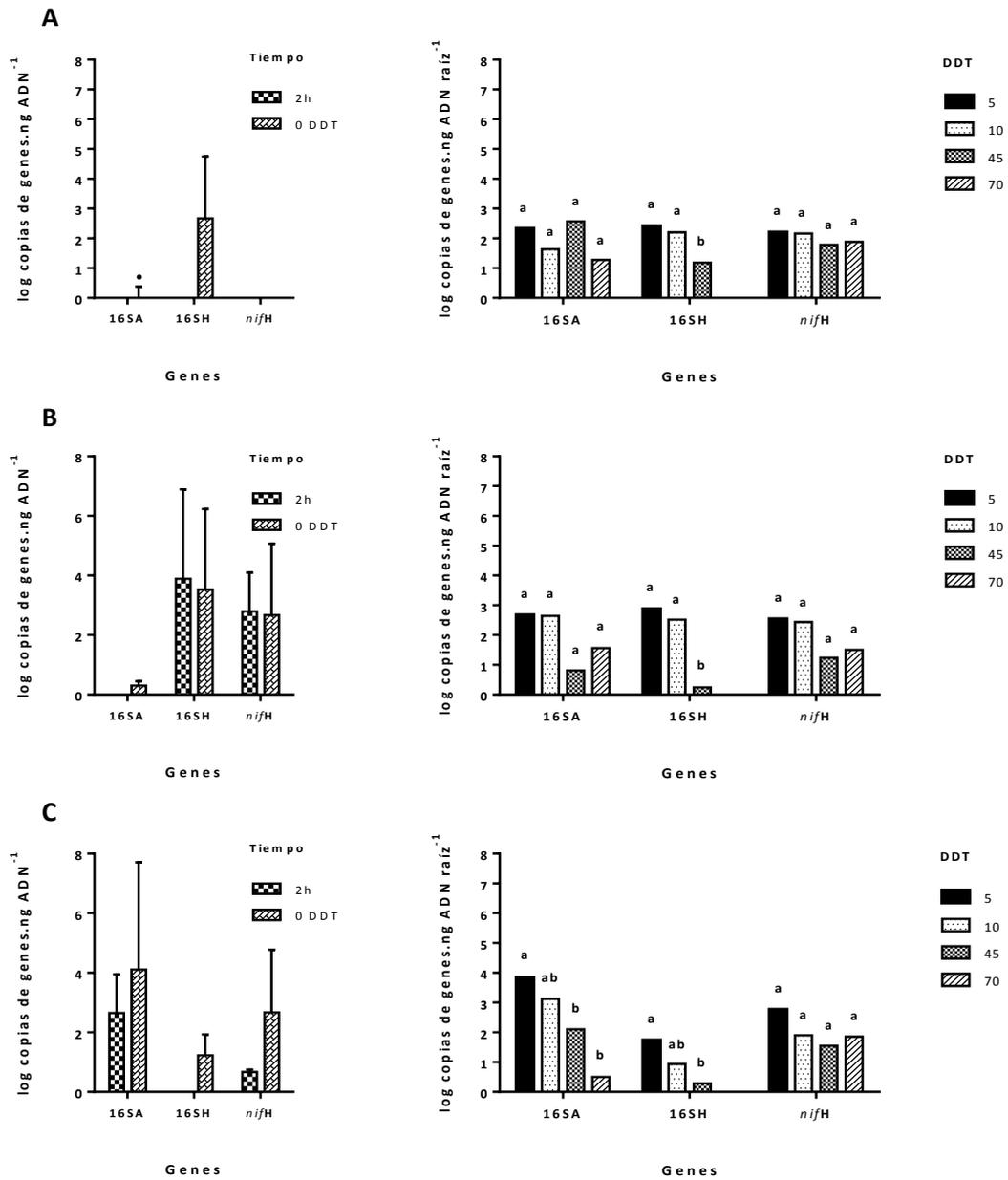


Figura 1.10. Abundancia de *Azospirillum* spp (16SA), *Herbaspirillum* spp (16SH) y diazótrofos totales (*nifH*) en el tratamiento control (A), inoculado con z67 (B) e inoculado con Az39 (C). Se cuantificó el número de copias del gen *nifH* y de los genes 16S ARNr de *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, en semillas con dos horas de inoculadas (2h), en plantín con 4 días de germinados antes del trasplante a macetas con suelo (0 DDT), y raíz de las plantas con 5, 10, 45 y 70 DDT. El (•) indica que la abundancia fue menor a 1 copia.ng⁻¹ de ADN y la abundancia cero indica que fue menor al límite de cuantificación. Los datos recogidos de semilla y plantín (gráficos de la izquierda) no poseen tratamiento estadístico, son el promedio de replicados técnicos y las barras de error corresponden a su desviación. El análisis estadístico corresponde a las raíces de las plantas transplantadas en suelo (gráficos de la derecha). Las columnas con letras iguales para el análisis de cada gen, indican que no hay diferencias significativas a cada tiempo de muestreo para p=0.05 (Test de Tukey).

Se confirmó que los amplicones obtenidos eran del género *Azospirillum* o *Herbaspirillum* porque su tamaño y Tm se correspondían con los controles positivos. Además, se secuenciaron y analizaron los amplicones de las muestras en las que se obtuvo mayor número de copias en cada tratamiento, y se obtuvo una similitud del 98-100 % con secuencias de *Azospirillum* spp. o *Herbaspirillum* spp. según el amplicón analizado.

El análisis de la secuencia de *Herbaspirillum* spp. obtenida del plantín del tratamiento control, mostró que en 350 pb hay una similitud de 99% con *H. huttiense* y solamente una similitud de 97.4% con *H. seropedicae*.

En el caso de la cuantificación de genes *nifH*, los resultados obtenidos de la secuenciación del producto obtenido mostraron que los amplicones de los tiempos 5, 10, 45 y 70 días resultaron ser una mezcla de secuencias de diferentes géneros. Sin embargo, cuando se analizaron los amplicones de semilla y plantín (etapas sin contacto con suelo) en los tratamientos inoculados, se confirmó que las secuencias *nifH* correspondían a *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. según el tratamiento de inoculación.

En esta instancia se demostró que las semillas de arroz el Paso 144 tenían una bacteria del género *Herbaspirillum* no diazótrofa que parece haberse multiplicado a medida que la planta se desarrollaba. Mediante este método molecular de cuantificación también se observó que los diazótrofos del suelo se asocian a las raíces de arroz ni bien toman contacto con el suelo. *Herbaspirillum* spp. es un género que mostró persistencia a una densidad relativamente estable en etapas de desarrollo temprano de la planta, mientras que la densidad de *Azospirillum* spp. nativo asociado a raíz se mantuvo hasta fines del ensayo. A pesar de esto la densidad de *Azospirillum* spp, se vió afectada negativamente en el tiempo cuando se inoculó con *A. brasilense* Az39. El análisis de Tm, tamaño de amplicón y secuenciación de los mismos permitió corroborar que la cuantificación corresponde a *Azospirillum* spp. o *Herbaspirillum* spp.



Discusión

La raíz de la planta y su entorno conforman un ambiente donde ocurre gran parte de las interacciones positivas microorganismo-planta (Badri *et al*, 2009). Se ha visto que la colonización de las raíces tanto de forma asociativa como endofítica es una condición necesaria para que las bacterias benéficas establezcan la cooperación (Suslow, 1982; Islam *et al*, 2005 y 2007). Además, se sabe que este mutualismo depende fuertemente de factores bióticos y abióticos (García de Salamone & Döbereiner, 1996; Olivares *et al*, 1996; Azevedo *et al*, 2005; Marschner *et al*, 2005). Por esta razón resulta imprescindible estudiar cómo afectan dichos factores a los microorganismos promotores de crecimiento vegetal con potencial para elaborar inoculantes comerciales. Esto es de particular interés si se quiere lograr la persistencia de estos microorganismos en gramíneas como el arroz, cuyo ciclo de cultivo incluye etapas óxicas y anóxicas. La inundación del cultivo de arroz es uno de los factores abióticos que influyen en la composición de la flora microbiana asociada (Paolino, 2006; Ferrando & Fernández, 2015). A pesar de esto, las plantas de arroz poseen arénquima, que lleva el oxígeno desde tejidos aéreos hasta las raíces, por lo cual, las bacterias aerobias asociadas a las raíces de plantas inundadas podrían respirar. Actualmente los inoculantes para arroz poseen bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Se conoce que la mayoría de las especies que integran estos géneros son aerobias, y al fijar nitrógeno pueden crecer en condiciones microaerofílicas (Baldani *et al*, 2014b; Reis *et al*, 2015). Por lo tanto sería de mucho interés conocer si estos géneros son capaces de persistir durante el ciclo de cultivo de arroz.

Con el fin de monitorear la colonización y persistencia de BPCV en plantas, se han utilizado exitosamente técnicas basadas en PCR para el seguimiento e identificación de *Azospirillum* spp. (Shime-Hattori *et al*, 2011) y *A. lipoferum* CRT1 utilizado como inoculante (Baudoin *et al*, 2010). Además, se ha utilizado qPCR para medir la abundancia de *A. lipoferum* CRT1 (Couillerot *et al*, 2010a) y *A. brasilense* FP2 (Faleiro *et al*, 2013) en maíz, *H. seropedicae* SmR1 (Pereira *et al*, 2014) en maíz, *P. fluorescens* (von Felten *et al*, 2010), y diazótrofes en general (Yousuf *et al*, 2014; Ferrando & Fernández, 2015).

El uso de qPCR como una herramienta para el monitoreo molecular de microorganismos inoculados proporciona de forma sencilla, rápida y confiable información sobre la dinámica que adquiere la asociación bacteria-planta huésped. Este tipo de estudios permite obtener resultados de abundancia en tiempo real y relacionarlos con los rendimientos del cultivo, así como obtener información sobre el momento en que las bacterias inoculadas son relevantes para el desarrollo de la planta. Considerando que el éxito de un inoculante varía según la cepa bacteriana, variedad vegetal (huésped), el tipo de suelo, entre otros factores, son escasos los trabajos publicados que abordan este tipo de estudios en cultivos de gramíneas. Por esta razón

se consideró que la optimización de una técnica de qPCR para determinar la dinámica de bacterias con propiedades promotoras de crecimiento en el cultivo de arroz era de interés para el uso de inoculantes en Uruguay.

En el presente trabajo se realizó la optimización de un método por qPCR que permitió monitorear la abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. asociados a la raíz de *Oryza sativa*, variedad El Paso 144, en distintos momentos del cultivo. En base a estos resultados, también se estudió la relación entre la abundancia de estas bacterias y el desarrollo de las plantas. Para este ensayo se realizaron tratamientos de inoculación sobre semillas con *A. brasilense* Az39 y *H. seropedicae* z67, y también se realizó un control sin inocular. La cepa Az39, endófito aislada de raíces de trigo en Argentina, es muy utilizada en investigación y en formulaciones de inoculantes comerciales para gramíneas tanto en Argentina (Perrig *et al*, 2007) como en Uruguay. Se ha observado que en condiciones controladas y en medio de cultivo hidropónico, esta cepa se asocia de forma endofítica al arroz y se localiza principalmente en raíces (Rariz, 2012). Además, otros autores han observado que en condiciones de hidroponía Az39 promueve el desarrollo de raíces y ayuda a mitigar el estrés osmótico en plantas de arroz El Paso 144 (Cassán *et al*, 2009a). Por otro lado, z67 es una cepa endofítica aislada de raíces de arroz en Brasil (Baldani *et al*, 1986), muy estudiada a nivel molecular, fisiológico y microscópico tanto en vida libre como en asociación con plantas. Se ha demostrado que promueve el crecimiento de plantas de arroz de diferentes variedades en condiciones controladas de laboratorio (Baldani *et al*, 2000; James *et al*, 2002) y en invernadero (Gyaneshwar *et al*, 2002; Wagh *et al*, 2014).

Optimización de qPCR para genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp.

Dado que se encontró evidencia bibliográfica sobre la cuantificación de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en suelo y algunas gramíneas, se optimizó un método de qPCR para medir abundancia de los mismos en *Oryza sativa*. Se realizaron análisis *in silico* de varios pares de cebadores, se buscó que fueran específicos para género y también se analizó la posibilidad de amplificación inespecífica de bacterias relacionadas y no relacionadas. En este estudio se determinó la abundancia de los géneros *Herbaspirillum* y *Azospirillum* en arroz utilizando los cebadores diseñados por Ofek *et al* (2007) (*Herbaspirillum* spp.) y Lin *et al* (2011) (*Azospirillum* spp.) utilizados en *Vicia faba* L y suelo, respectivamente.

Durante la optimización de la qPCR se observó que z67 amplificó inespecíficamente cuando fue utilizado como control negativo en la cuantificación de *Azospirillum* spp. y además Az39 amplificó inespecíficamente cuando fue utilizado como control negativo en la cuantificación de *Herbaspirillum* spp. Se vio que al agregar 10^6 copias del gen 16S ARNr de Az39 (16S Az39) como control negativo amplificaron 10^1 copias de 16SH, y al agregar 10^4 copias del gen 16S ARNr de z67 (16S z67) como control negativo amplificaron 4 copias de 16SA. Para evaluar si esta inespecificidad de los cebadores afectaba la cuantificación de genes en las muestras se realizaron ensayos de interferencia. Si bien los autores que diseñaron estos cebadores no probaron inespecificidad cruzada entre *Azospirillum* y *Herbaspirillum* mediante PCR, sí verificaron *in silico* y por PCR que no se generan amplicones inespecíficos a partir de ADN de géneros relacionados.

En el ensayo de interferencia, el máximo desafío en la reacción de qPCR consistió en mezclar 16S z67 con 16SA en relación de 100:1 copias (10^4 y 10^2 copias respectivamente) para la cuantificación de 16SA y 1:1000 copias (10^1 copias 16S z67 y 10^4 copias 16S Az39) respectivamente para la cuantificación de 16SH. Como resultado de este análisis se determinó que la cuantificación de la secuencia blanco no estuvo afectada por la presencia de ADN de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* nativos del suelo que colonizan naturalmente las raíces de *O. sativa* (Tablas 1.5 y 1.6). Además las secuencias de los amplicones cuantificados mostraron una alta similitud con *Azospirillum* spp. o *Herbaspirillum* spp. Por lo tanto se consideró esta metodología una herramienta confiable que permite monitorear en tiempo real la abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en el cultivo de arroz, en un rango de entre 2×10^0 y 4×10^4 copias del gen 16S ARNr. 10 ng^{-1} de ADN de raíz.

Monitoreo molecular de *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y diazótrofos totales asociados a semillas, plantines y raíces de plantas de arroz

Hemos observado previamente que *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y otros diazótrofos presentes en suelos del Norte y Este del país se asocian de forma endofítica a las raíces de *O. sativa* variedad INIA El Paso 144 (Rariz *et al*, 2013; Ferrando, 2013). En el ensayo realizado de este trabajo también se observó que, aún habiendo bajo número de *Azospirillum* spp. en suelo, cepas de este género y otras diazótroficas, se asocian a raíces del tratamiento control cuando las mismas toman contacto con el suelo. En cambio, *Herbaspirillum* spp. parece estar presente en semillas de arroz y su población aumenta durante la germinación (Figura 1.10A y Tabla 1.8). Esto

no descarta que también cepas del género *Herbaspirillum* del suelo puedan colonizar las raíces de arroz y contribuir a la población de endófitas presentes durante el crecimiento de la planta.

Abundancia de diazótrofos totales *in planta*

De forma similar a la tendencia observada en la cuantificación de diazótrofos viables por NMP, se observó que la abundancia de diazótrofos medida por qPCR no cambió significativamente durante el tiempo de cultivo en los tres tratamientos (Figura 1.10A). Sin embargo, Ferrando & Fernández (2015) observaron que en raíces de arroz INIA Olimar la abundancia de genes *nifH* en raíces desinfectadas superficialmente aumentó un orden (10^2 a 10^3 copias. ng^{-1} ADN) desde el día 34 hasta el día 76 después de la siembra, 42 días luego de inundar. Al comparar los métodos utilizados para medir abundancia, se observó que el NMP de diazótrofos estuvo entre 10^5 - 10^8 g^{-1} de tejido y el número de copias del gen *nifH* estuvo entre 10^4 - 10^6 g^{-1} de tejido (Figura 1.10A y Tabla 1.8). Quizás, la diferencia entre estos resultados ocurre porque los cebadores utilizados no reconocieron la totalidad de las secuencias *nifH*. Lo que coincide con otros trabajos donde se determinó que estos cebadores abarcan un pequeño porcentaje de la amplia diversidad de genes *nifH* (Diallo *et al*, 2008; Gaby *et al*, 2012). Si bien Poly *et al* (2001) probaron la especificidad de los cebadores (PolF/R) con el gen *nifH* de un grupo acotado de *Alfa*, *Beta* y *Gammaproteobacterias*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, es posible que genes *nifH* de otras clases bacterianas no hayan sido detectados.

Persistencia de *Azospirillum* spp. *in planta* luego de la inoculación

Se determinó que bacterias del género *Azospirillum* provenientes del suelo se asociaron a las raíces de plantas tanto sin inocular como inoculadas con *H. seropedicae* z67, se duplicaron y permanecieron en asociación relativamente estable durante gran parte del ciclo de cultivo, incluso luego de la inundación (Figuras 1.10 A y B). En cambio, en el tratamiento inoculado con *A. brasilense* Az39, la abundancia de *Azospirillum* spp. decayó progresivamente desde los 5 DDT (4×10^7 copias 16SA.g^{-1} de raíz), llegando a un valor significativamente menor a los 70 DDT (4×10^4 copias de 16SA.g^{-1} de raíz) (Figura 1.10C). Otros autores han observado que al inocular plantines de arroz y de trigo con *A. brasilense* FP2, estas bacterias alcanzan una densidad de 10^8 UFC. g^{-1} de raíz, que se mantiene por 20 y 13 DPI (Days Post Inoculation) respectivamente (Valdameri *et al*, 2015; Sets *et al*, 2015).

Por otro lado, se detectó mediante PCR con cebadores específicos a partir de las diazótrofias cultivadas, que a los 70 DDT bacterias del género *Azospirillum* estaban asociadas a las raíces en todos los tratamientos. En el tratamiento control e inoculado con Az39 el NMP de *Azospirillum* spp. fue de, al menos, 3×10^2 y 3×10^4 .g⁻¹ raíz respectivamente (estimado por el recuento por NMP) (Tabla 1.9). Además, a los 70 DDT se recuperaron dos aislamientos cuya secuencia es similar a la de la cepa inoculada (Az39) en dos de los tres bloques del tratamiento. Pareciera que el número de copias de 16SA fue menor en el tratamiento inoculado con Az39 respecto a los otros dos, por lo que se podría pensar que Az39 desplazó de las raíces y rizósfera a otras especies de *Azospirillum* nativas del suelo que podrían estar más adaptadas a las condiciones de inundación. A diferencia de estos resultados, Bao *et al* (2013) determinaron mediante pirosecuenciación que la inoculación con *Azospirillum* sp. B510 en plantas de arroz no modificó la proporción relativa de *Azospirillum* spp. en plantas con 70 días de crecimiento.

Persistencia de *Herbaspirillum* spp. in planta luego de la inoculación

Se ha demostrado por microscopía electrónica e inmunoensayo que las bacterias del género *Herbaspirillum* están en el interior de semillas de arroz (Baldani *et al*, 1992). En el tratamiento control de este trabajo se determinó que la abundancia de *Herbaspirillum* spp. en semilla era menor que el límite de cuantificación (menos de 14 copias de 16SH.10 ng⁻¹ ADN de semilla). Sin embargo, se cuantificaron 5.5×10^2 copias de 16SH.ng⁻¹ ADN asociado a plantines con 4 días de germinación sin contacto con el suelo (0 DDT). Por lo tanto, y al igual que lo observado por Olivares *et al* (1996), los resultados sugieren que *Herbaspirillum* está presente en semillas y comienza a duplicarse a medida que la semilla germina. A su vez, la abundancia de genes *nifH* en semilla y plantín se mantuvo por debajo del límite de detección, lo que indicaría que estos *Herbaspirillum* spp. no son diazótrofos.

En todos los tratamientos, cuando la raíz tomó contacto con el suelo, la abundancia de *Herbaspirillum* spp. comenzó a descender hasta niveles por debajo del límite de cuantificación luego de 25 días de inundación (70 DDT, Figura 1.10). A los 10 DDT se pudo detectar *Herbaspirillum* spp. como diazótrofo cultivable en todos los tratamientos, obteniéndose en el tratamiento control y el inoculado con z67 un NMP de diazótrofos de, al menos, 3×10^2 y 3×10^4 .g raíz⁻¹, respectivamente. En el tratamiento inoculado con z67 se observó que la abundancia de *Herbaspirillum* spp. descendió dos órdenes de magnitud entre los 10 y 45 DDT (10^6 - 10^4 copias 16SH. g⁻¹ raíz). De forma similar, James *et al* (2002) inocularon plantines de arroz variedad IR42 e IR72 con *H. seropedicae* z67-GUS y observaron que desde los 2-7 a los 28 DPI la abundancia de

z67-GUS disminuyó como mínimo dos órdenes de magnitud (10^6 - 10^8 a 10^3 - 10^4 ufc.g⁻¹ de peso fresco) en rizósfera y tejido aéreo desinfectado superficialmente de ambas variedades de arroz. En otro trabajo realizado por Olivares *et al* (1996) estudiaron la supervivencia de *Herbaspirillum* en suelo, rizósfera y raíces. Estos estudios mostraron que en suelos con una concentración inicial de *H. seropedicae* z67 de 10^8 células .g⁻¹ suelo, el total de *Herbaspirillum* spp. detectados disminuyó a menos de 1 .g⁻¹ suelo luego de 32 días. Estos autores reportan que a los 64 días el NMP de *Herbaspirillum* spp. en rizósfera fue menor a 1 .g⁻¹ , y en raíz fue sensiblemente mayor (10^4 .g⁻¹). Se ha descrito que las bacterias del género *Herbaspirillum* son generalmente endófitos (Döbereiner, 1992) y se ha demostrado que *H. seropedicae* coloniza *O. sativa* y otras gramíneas a través de sus raíces laterales (James & Olivares, 1998; James *et al*, 2002; Gyaneshwar *et al*, 2002; Monteiro *et al*, 2012a). Rápidamente colonizan el arénquima y xilema, por el cual se movilizan hacia tallos y hojas (Monteiro *et al*, 2012a; Turner *et al*, 2014). A pesar de ello, Boddey *et al* (1995), observaron mayor densidad de *Herbaspirillum* spp. en raíz que en tallos y hojas de arroz IR42 durante el ciclo de cultivo.

Resulta interesante destacar que el alto número de *Herbaspirillum* spp. y el bajo número de copias de *nifH* en plantines del tratamiento control, sugieren la presencia de una cepa de *Herbaspirillum* nativa de semilla que no es diazótrofa (Figura 1.10A). Estos resultados concuerdan con los datos del NMP donde tampoco se detectaron bacterias diazótroficas cultivables (NMP < 3.0×10^4 g⁻¹ de tejido) en semilla y plantín (Tabla 1.8). Las secuencias del gen 16S rRNA de los productos de qPCR de los tratamientos control e inoculado con Az39 en las semillas germinadas (0 DDT) tienen una similitud de 99% con *H. huttiense* NBRC 102521 en el fragmento amplificado de aproximadamente 350pb, que a su vez se diferencia en 9 pb (2.6%) de *Herbaspirillum seropedicae* (Figura AI-9). Hasta el momento, se han reportado dos subespecies de *H. huttiense*: la subsp. *huttiense* aislada a partir de agua destilada por Leifson (1962), y la subsp. *putei* aislada por Ding & Yakota (2004) a partir de agua de pozo. Ninguna de ellas presenta actividad diazotrófica ni los genes que intervienen en la fijación de nitrógeno (Dobritsa *et al*, 2010). A pesar de esto, en la base de datos del NCBI se depositó (Abril del 2015) una secuencia del gen *nifH* de *H. huttiense* R5-408 (KR075960.1). Esta secuencia es 99% similar a la secuencia *nifH* de *H. seropedicae* z67 (CP011930.1). A su vez la secuencia del gen 16S ARNr de *H. huttiense* R5-408 (JQ659769.1) es 99% similar a la de *H. huttiense* ATCC 14670 que no tiene gen *nifH* (Dobritsa *et al*, 2010). Recientemente, de Souza *et al* (2013) ha secuenciado el genoma completo de *H. huttiense* subsp. *putei* y se confirmó que no posee genes *nif*. Además, se determinó la presencia del gen que codifica para la ACC desaminasa, enzima que contribuye al desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés (Pedrosa *et al*, 2011). Aunque se encontró

que tiene los sistemas de secreción de tipo I, II, y V, no tiene el sistema de tipo III que parece estar implicado en la interacción bacteria-planta. También se observó la presencia de un cluster de genes implicados en la biosíntesis y degradación de celulosa, que anteriormente había sido reportado en *H. rubrisubalbicans* M1 y parece estar implicado en la colonización del maíz (Monteiro *et al*, 2012a). Si bien no hay estudios de interacción *H. huttiense*-planta, la presencia de estos genes y sus posibles funciones, sugieren que esta bacteria tiene la capacidad de ingresar a la planta y además mitigar el estrés causado por diversos factores. En Uruguay, Punschke & Mayans (2011) aislaron una cepa de *Herbaspirillum* sp. endófito de la parte aérea de *Oryza sativa* variedad INIA Olimar sembrado en Treinta y Tres, que cuando se probó en ensayos de campo aumentó el rendimiento de kg granos.ha⁻¹. Esta cepa fue identificada como *H. huttiense* por Lage y Cía. y actualmente es el ingrediente activo del inoculante comercial Endo-Rice (www.lageycia.com/productos.php/8).

Las secuencias de *Herbaspirillum* spp. obtenidas por PCR de los tubos de NMP a los 10 DDT del tratamiento control y del inoculado con Az39 fueron, al igual que el amplicón de qPCR en las semillas germinadas, 99% similares a *H. huttiense* NBRC 102521. Por lo tanto la actividad diazotrófica observada en los tubos pudo deberse a otras especies o cepas fijadoras de nitrógeno que se asociaron a las raíces. Si bien Ding & Yakota (2004) observaron que *H. huttiense* no crece en medio de cultivo sin nitrógeno, en el trabajo de Punschke & Mayans (2011) esta especie fue aislada de jNFb y en el presente trabajo fue detectado en medio RMR. La explicación de haber detectado *Herbaspirillum* no diazótrofo en medio de cultivo para fijadoras de N₂ puede ser que la dilución de la muestra aún contenía una cantidad de nitrógeno que le permite crecer, que la cantidad de extracto de levadura en el medio de cultivo (0.1 g.L⁻¹) le proporciona el nitrógeno necesario ó que *Herbaspirillum* no diazótrofo forma algún tipo de asociación con bacterias diazótrofas capaces de proporcionarle el nitrógeno bajo una forma asimilable.

Relación entre rendimiento vegetal y abundancia de potenciales promotores del crecimiento

La planta de arroz depende de la reserva energética proveniente de la semilla en los primeros diez días aproximadamente a partir de su germinación (Nishizawa, 1995). Teniendo en cuenta esto, no se esperaría ver diferencias significativas entre los tratamientos a los 5 DDT pero sí en los tiempos posteriores. Se observaron diferencias significativas solamente a los 10 DDT, donde el largo de la parte aérea del tratamiento z67 fue mayor que el control sin inocular (Figura 1.9). A pesar de haber encontrado diferencias significativas en el desarrollo de la parte aérea, la

abundancia del gen *nifH* y 16SH en el tratamiento control y el inoculado con z67 fue del mismo orden (10^2 copias del gen $\cdot\text{ng}^{-1}$ ADN). Por lo tanto, esta diferencia significativa en el desarrollo vegetal no se le puede atribuir a la abundancia de *Herbaspirillum* spp. ni a la de fijadores de nitrógeno asociados a la raíz. De forma similar, Mirza *et al* (2006) tampoco observaron correlación entre el número de bacterias diazótrofes y los rendimientos de arroz. Es posible que si la cepa de *Herbaspirillum* inoculada persistiera podría aportar fitohormonas (Bastián *et al*, 1998; Lambrecht *et al*, 2000) que los otros tratamientos no recibieron y por eso se observe esa diferencia.

Dado que se obtuvieron datos de crecimiento muy variables entre bloques, no fue posible encontrar diferencias significativas entre tratamientos (Tabla AI-1), lo cual puede tener diversas causas. Se ha visto que para obtener mejoras en el rendimiento de gramíneas por el efecto de las fitohormonas de *Azospirillum*, se requiere al menos 10^5 ufc $\cdot\text{planta}^{-1}$ (Kapulnik *et al*, 1985; Okon & Itzigsohn, 1995). En el presente trabajo se obtuvieron más de 10^5 copias de 16SA $\cdot\text{g}^{-1}$ raíz, por lo tanto, en el total de la planta se espera un número mayor, aun considerando que en general hay 5 copias del gen 16S ARNr en las bacterias de este género. Una de las causas pudo ser que la fertilización excedió las necesidades de la planta y no permitió detectar diferencias entre los tratamientos porque el aporte de las bacterias no fue necesario, o que la afección foliar pudo enmascarar los resultados.

CAPÍTULO II

**Abundancia de *Azospirillum* y
Herbaspirillum en suelos y raíces
de arroz**



Introducción

En las últimas dos décadas el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en la agricultura ha sido una práctica que pretende potenciar el rendimiento de los cultivos de forma sustentable y además aumentar la fertilidad del suelo de forma amigable con el medio ambiente. Esto transforma esta tecnología en una estrategia con gran potencial para reducir o reemplazar fertilizantes, pesticidas y suplementos químicos (Freitas *et al*, 2007).

Las BPCV son capaces de promover el desarrollo mediante procesos como la producción de fitohormonas y sideróforos, la inducción de resistencia a enfermedades y a situaciones de estrés, solubilización de fósforo, actividad ACC deaminasa, y fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Glick, 2012; Souza *et al*, 2015). Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal pueden establecer diferentes tipos de interacción con las plantas: simbiótica, asociativa y endófitas. Las endófitas son usualmente definidas como aquellas que residen en tejidos internos de plantas, que no causan efectos negativos en su desarrollo y que pueden ser aisladas de la misma luego de una desinfección superficial (Hallmann *et al*, 1997). Sin embargo, estudios más recientes indican que hay microorganismos endófitos no cultivables que fueron secuenciados pero no aislados (Hurek *et al*, 2002), así como también se han visto hongos endófitos que presentan formas de vida parásita y mutualista (Schulz, 2006). Por lo tanto una definición más conservadora para bacterias endófitas sería simplemente aquellas que se alojan en tejidos internos de las plantas.

Las bacterias endófitas pueden ser clasificadas de acuerdo a su forma de vida en obligadas o facultativas. Las obligadas son aquellas incapaces de proliferar fuera de la planta y son transmitidas vía semilla, mientras que las facultativas tienen un estilo de vida bifásico que alternan entre la planta y el suelo. Estos endófitos provenientes del suelo encuentran su huésped mediante quimiotaxis, electrotaxis o accidentalmente, y pueden infectar atravesando la rizodermis por fisuras entre raíces laterales o heridas, y así extenderse hacia los espacios intercelulares de la raíz. Además algunos endófitos competentes son capaces de invadir tejidos vegetales específicos, como los vasculares, y así extenderse por toda la planta (Hardoim *et al*, 2008).

Si bien varias especies de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* son conocidas por sus propiedades promotoras de crecimiento vegetal, se ha visto que poseen baja sobrevivencia en suelos sin cultivo (Baldani *et al*, 1992; Bashan *et al*, 1995). Sin embargo, en suelos con cultivo pueden asociarse a las raíces, incluso colonizar tejidos internos y establecerse por largos periodos (Bao *et al*, 2013; Rariz *et al*, 2013). Esta asociación depende de varios factores como la comunidad bacteriana competente, el genotipo de la planta y las propiedades de suelo (Hungria *et al*, 2010; Bulgarelli *et al*, 2012). Si bien son varias las gramíneas con las que bacterias de estos

géneros pueden asociarse (Olivares *et al*, 1996; Baldani *et al*, 2014a; Baldani *et al*, 2014b), la interacción con arroz ha sido de los modelos más estudiados (Brusamarello *et al*, 2012; Monteiro *et al*, 2012a; Vargas *et al*, 2012).

El uso de técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (qPCR) permite, a partir de diferentes tipos de muestra, medir la abundancia de genes específicos de bacterias de forma rápida, precisa y específica. Es una técnica independiente del cultivo que evita los sesgos de la selección que se realiza mediante medios y condiciones particulares de crecimiento. Por lo tanto, este método resulta útil para evaluar la abundancia de todas las bacterias: las cultivables, las viables no cultivables y las no viables. Mediante el uso de esta técnica, se ha visto cómo influyen las propiedades del suelo en la abundancia de ciertos grupos bacterianos caracterizados por genes marcadores como el *nifH* para las diazótrofas en suelo y el interior de raíces de arroz (Yousuf *et al*, 2014; Ferrando, 2013). También es una técnica que se ha implementado para cuantificar cepas específicas de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* asociado a gramíneas y otras plantas (Ofek *et al*, 2007; Faleiro *et al*, 2013; Stets *et al*, 2015).

Sin embargo, hasta ahora no se conocen trabajos que hayan utilizado este método para medir abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. nativos en suelos naturales no rizosféricos. Por otra parte, en el Capítulo I de esta Tesis se observó que la abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. nativos en raíces de arroz variedad El Paso 144 en plantas no inoculadas fue similar a la de las plantas inoculadas con cepas de estos géneros.

Por tal razón, en este trabajo se utilizó la metodología de qPCR puesta a punto en el Capítulo I para conocer la abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en suelos de distintas regiones arroceras del país y para cuantificar la abundancia de estos géneros en el interior de las raíces cultivadas en esos suelos. Se analizó además si las propiedades fisicoquímicas del suelo se correlacionan con la abundancia de estas bacterias.

Objetivo

Comparar la abundancia de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en suelos y raíces de arroz.



Materiales y Métodos

Muestreo, procesamiento y análisis fisicoquímico del suelo

Se tomaron muestras de 7 suelos almacenados a temperatura ambiente que provenían de las tres principales zonas de cultivo de arroz en Uruguay. Para la selección se tuvieron en cuenta diferentes características como propiedades fisicoquímicas, ubicación geográfica y uso previo del suelo (Tabla 2.1).

Los suelos del 2 al 8 (S2-S8) fueron muestreados en el año 2011 por personal del INIA en los distintos sitios experimentales de dicho instituto, y utilizados en ensayos previos a éste por Ferrando (2013). En ese muestreo se tomaron al menos tres muestras integradas de cada tipo de suelo. Cada muestra integrada se conformó a partir de muestras de suelo provenientes de 6 puntos distribuidos al azar. Los suelos se tamizaron obteniendo partículas de tamaño menor o igual a 6x3 mm de lado, luego se dejaron secar durante 5-7 días a 30°C.

Las determinaciones fisicoquímicas se realizaron sobre 200 g de suelo de cada tipo, resultantes de la mezcla de las tres muestras obtenidas (Tabla 2.1). Los análisis fisicoquímicos fueron realizados en el Laboratorio del Sur S.R.L. y consistieron en las siguientes medidas: Carbono orgánico (CO) y Materia Orgánica (MO) (método Walkley-Black), contenido de Nitrógeno (método Kjeldhal), Fósforo (método del ácido cítrico, Murphy & Riley) y Potasio (en acetato de amonio 1N pH 7.0), así como la determinación de la textura del suelo (método Bouyoucos).

Diseño experimental y muestreo de raíces

Se trabajó con raíces de un experimento realizado previamente (Ferrando, 2013) en el cual se cultivaron plantas de arroz en los suelos descritos en la sección anterior. Brevemente, en ese trabajo se desinfectaron superficialmente semillas (con cáscara) de arroz (*Oryza Sativa*) var. El Paso 144 con hipoclorito de Sodio 2 %, se germinaron asépticamente en oscuridad a 30°C por 5 días y luego se trasplantaron a macetines con los diferentes suelos. El diseño del ensayo fue completamente al azar (DCA), empleando 7 tratamientos con dos repeticiones cada uno. Cada tratamiento correspondió a un suelo diferente y cada unidad experimental consistió en 10 macetines de 4x4 cm conteniendo aproximadamente 50 g de suelo y 2 plantas de arroz cada uno. Antes de transferir los plantines se agregó fertilizante (20 Kg N (urea), 60 Kg de P (Na_2HPO_4) y 10 Kg de K (KCl) ha^{-1}) al suelo y se distribuyó en macetas.

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas y origen de los suelos analizados.

Suelo	Fecha de muestreo	Departamento	Localidad	Uso previo del suelo	CO (%)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (meq/100g)	% arena	% limo	% arcilla	Clase textural*	Taxonomía (Gran Grupo)
2	08/2011	Rocha	India muerta	Campo natural	3,5	6,1	0,27	28	0,36	17,6	55,9	26,5	FL	Histosols
3	08/2011	Treinta y Tres	Rincón	Arroz	1,5	2,5	0,11	30	0,3	38,3	40,4	21,3	F	Albaqualfs
4	08/2011	Treinta y Tres	Rincón	Campo natural	1,6	2,8	0,14	17	0,18	36,2	40,7	23,1	F	Albaqualfs
5	08/2011	Tacuarembó	Cinco Sauces	Arroz	1,3	2,2	0,13	15	0,09	59,7	27,5	12,8	FA	Argialbolls
6	08/2011	Tacuarembó	Cinco sauces	Raigrás	1	1,7	0,10	26	0,11	63,5	26,5	10,0	FA	Argialbolls
7	08/2011	Artigas	Paso Farías	Arroz	2,5	4,3	0,22	17	0,27	18,1	45,5	36,4	FAL	Argiudolls
8	08/2011	Artigas	Paso Farías	Campo natural	3,1	5,4	0,25	10	0,33	16,2	44,5	39,3	FAL	Argiudolls

CO, Carbono Orgánico; MO, Materia Orgánica; *Clase textural a la que pertenece cada uno de los suelos: FL: Franco limoso; F: Franco; FA: franco arcilloso; FAL franco arcilloso limoso (Modificado de Ferrando, 2013).

Asimismo, cuando las plantas tuvieron dos hojas, se aplicó fungicida Concerto (Kresoxim-metil + Tebuconazol) en una concentración equivalente a 1 L ha⁻¹ de acuerdo a las indicaciones del producto. Las plantas se incubaron en fitotrón (Yiheng Technical CO., LTD., Blue pard) a 25°C y 80 % de humedad, con un fotoperíodo de 16 hs y se regaron diariamente (Ferrando, 2013). Luego de 25 días de crecimiento las plantas fueron cosechadas y agrupadas por tratamiento. Las raíces se separaron y desinfectaron de la forma mencionada anteriormente, se secaron con papel tissue esterilizado y se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C.

Extracción de ADN de suelo

Se realizó la extracción de ADN de cada uno de los suelos mediante el kit PowerSoil de MOBIO, partiendo de 0.5 g de suelo seco, siguiendo el protocolo de extracción sugerido por el fabricante. El ADN extraído fue resuspendido en 50 µL de agua milliQ esterilizada y conservado a -20°C. La calidad del ADN se verificó en gel de agarosa al 1% (Agarose I, Amresco) con buffer TBE 0.5x (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM y EDTA 1.25 mM; pH 8.2) a 100 V durante 30 minutos. Como patrón de peso molecular se usó el marcador 1Kb DNA Ladder (Fermentas). Para la visualización de los productos se utilizó el agente intercalante GoodView GV-II al 1.125x. Luego de cada corrida los gels fueron fotografiados (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak) bajo la luz de un transiluminador UV (UVP). La cantidad de ADN se cuantificó kit Qubit dsDNA HS Assay mediante un fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

Extracción de ADN de raíces

La extracción de ADN de las raíces se realizó según Ferrando (2013). Brevemente, las raíces R2 al R8 obtenidas y congeladas se sometieron al protocolo para extracción de ADN vegetal de Doyle & Doyle (1987). Para eso se tomó el tejido vegetal congelado y se maceró con nitrógeno líquido en morteros previamente enfriados hasta conseguir pulverizar la muestra. La muestra se almacenó en microtubos de 2 mL esterilizados y se mantuvo en nitrógeno líquido antes de ser almacenada en freezer -80°C. El material molido (100-200 mg) fue tratado con buffer CTAB 2x, se incubó a 65°C por 45 min. Posteriormente se hizo una extracción cloroformo/alcohol isoamílico y el ADN se precipitó con isopropanol. Se centrifugó, se resuspendió en buffer TE, y por último se realizó un tratamiento con ARNasa 10 µg.mL⁻¹ a 37°C durante 30 min. Se corroboró la presencia y calidad del ADN extraído, así como la cantidad según procedimiento detallado en sección anterior.

Cuantificación de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en suelos y raíces por Real Time PCR

Para la cuantificación de copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. (16SH) y *Azospirillum* spp. (16SA) se utilizó un equipo Rotor-Gene 6000 modelo 5-Plex (CORBETT Research, Australia). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 μ L conteniendo 1 μ L de ADN diluido al décimo, 2 μ L (concentración final 1 μ M) de cada cebador HRSF/R (16SH) o Azo494F/756R (16SA), y 5 μ L de la mix Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Alemania). Para cada corrida se realizó una curva estándar con duplicados de cada punto. Dicha curva se hizo con las diluciones 10^{-5} a 10^{-10} del estándar cuya concentración era de 2.54×10^{10} y 2.58×10^{10} copias de genes 16SH o 16SA, respectivamente, por microlitro. En cada corrida se incluyeron controles negativos sin ADN y todas las muestras fueron cuantificadas por duplicado. El ciclo de temperaturas utilizado consistió de una etapa inicial de 5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos: desnaturalización a 95°C por 5 seg e hibridación-extensión a 60°C por 10 seg, según indicaciones del fabricante. La señal de fluorescencia se adquirió una vez por ciclo después de la etapa de hibridación-extensión, para lo cual se agregó una etapa adicional a 83°C durante 1s para 16SH y 16SA, para evitar la contribución de los dímeros de cebadores. Para verificar la especificidad de la reacción, al final de cada corrida se realizó una curva de melting incrementando la temperatura de 55 a 95°C a una tasa de 1°C por segundo. Se consideró como específico un producto de 16SH obtenido en el rango de 86 - 88°C, y para 16SA entre 85 y 88°C. El límite de cuantificación establecido para ambos genes fue de 26 copias del gen 16S ARNr cada 100 ng^{-1} de ADN de suelo y 2 copias del gen 16S ARNr. ng^{-1} de ADN de raíz.

La optimización de la técnica así como la preparación del estándar para los genes 16S ARNr de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. se detallan en el Capítulo I de esta Tesis.

Para verificar la presencia del amplicón de interés en las distintas cuantificaciones, los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5x a 100V durante 40 minutos aproximadamente, usando como patrón de peso molecular el marcador 50bp (Fermentas). Se utilizó el agente intercalante y método de revelado descritos anteriormente. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados (Macrogen Inc, Korea). Las secuencias fueron analizadas con la herramienta MEGA 6 y comparadas en la base de datos del NCBI con la herramienta BLAST.

Los resultados de la cuantificación para cada muestra fueron promediados y corregidos por la dilución realizada. Los mismos se expresaron por gramo de muestra para comparar la abundancia en el mismo material de partida y por ng de ADN total extraído para comparar entre

distintos materiales, ya que se observaron diferencias en el contenido y/o la eficiencia de extracción de ADN en las muestras de suelo y raíz.

Análisis estadístico

A partir de los datos de abundancia (dos determinaciones de copias de genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. sobre cada muestra) en S2-S8 y R2-R8, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias obtenidas mediante el test de Tukey con $\alpha = 0.05$. Para esto se utilizó la plataforma RStudio versión 0.97.336 (Racine, 2012), del software R versión 2.15.3 (R Core Team, 2013). Luego se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre las medidas de abundancia y las propiedades fisicoquímicas del suelo, utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al*, 2015).



Resultados

Abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en suelos y raíces

A partir del ADN extraído de suelo y raíz desinfectada superficialmente, se cuantificaron las copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. (16SH) y *Azospirillum* spp. (16SA). Para uniformizar los valores en la comparación de los datos de abundancia en los diferentes suelos (S2-S8) y en las raíces de plantas cultivadas en ellos (R2-R8) se calculó el número de copias por ng de ADN extraído.

En cuatro de los siete suelos se pudo cuantificar *Herbaspirillum* y *Azospirillum*, obteniéndose valores del orden de 10^3 a 10^4 copias por gramo de suelo para ambos géneros. En S2 la abundancia de ambos géneros estuvo por debajo de 26 copias del gen 16S ARNr .100 ng⁻¹ de ADN de suelo (límite de cuantificación). De forma similar, se observó que la abundancia de 16SH en S5 y 16SA en S4 tampoco alcanzó el límite de cuantificación, y además solamente uno de los replicados técnicos alcanzó valores superiores al límite de cuantificación para 16SH en S4 y para 16SA en S5 (Tabla 2.2).

No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de 16SA por gramo de suelo entre los cuatro suelos donde fue posible cuantificar estos genes (Tabla 2.2). En cambio, la abundancia de 16SH en S3 (4.2×10^4 copias.g⁻¹ suelo) fue significativamente mayor que en S6, S7 y S8 (Figuras AI-10A y AI-11B).

Tabla 2.2. Número de copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. (16SH) y *Azospirillum* spp. (16SA) en suelo cuantificados mediante qPCR. Se muestran los resultados en diferentes unidades de cuantificación con su respectiva desviación estándar de las dos determinaciones realizadas por suelo.

Suelos	<i>Herbaspirillum</i> spp.		<i>Azospirillum</i> spp.	
	16SH.g ⁻¹ suelo	16SH.ng ⁻¹ ADN	16SA.g ⁻¹ suelo	16SA.ng ⁻¹ ADN
2	*	*	*	*
3	$4.2 \pm 0.2 \times 10^4$ a	$1.5 \pm 0.1 \times 10^1$	$1.6 \pm 1.6 \times 10^4$ a	$5.5 \pm 5.4 \times 10^0$
4	3.2×10^3 *	2.2×10^0 *	*	*
5	*	*	2.7×10^3 *	2.3×10^0 *
6	$1.8 \pm 0.0 \times 10^4$ b	$7.4 \pm 0.0 \times 10^0$	$1.3 \pm 0.7 \times 10^4$ a	$5.6 \pm 3.0 \times 10^0$
7	$6.3 \pm 6.6 \times 10^3$ b	$7.0 \pm 7.3 \times 10^0$	$9.1 \pm 3.9 \times 10^3$ a	$1.0 \pm 0.4 \times 10^1$
8	$8.5 \pm 0.6 \times 10^3$ b	$4.8 \pm 0.3 \times 10^0$	$1.7 \pm 1.2 \times 10^4$ a	$9.7 \pm 6.9 \times 10^0$

*Valores de abundancia menor que el límite de cuantificación (26 copias del gen 16S ARNr cada 100 ng⁻¹ de ADN de suelo) para uno o ambos duplicados. Estos valores no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico. Las letras iguales para el análisis de cada gen, indican que no hay diferencias significativas entre los distintos suelos para p= 0.05 (Test de Tukey).

En todas las raíces (R2-R8) se pudo cuantificar *Herbaspirillum* y en seis de las siete raíces se pudo cuantificar *Azospirillum*. Siendo en R3 donde la abundancia de 16SA estuvo por debajo de 2 copias de 16SA.ng⁻¹ de ADN de raíz (límite de cuantificación). Excepto en R3, se obtuvieron valores del rango de 10⁴ a 10⁶ copias de 16SH y 16SA por gramo de raíz (Tabla 2.3). Se observó que el número de copias de 16SA en R8 (7.0 x10⁶ copias. g⁻¹ de raíz) fue significativamente mayor que en el resto de las raíces (Tabla 2.3, Figuras AI-10B y AI-11A). Por otro lado, en R6 se observó el máximo número de copias 16SH (1.5 x10⁶ copias.g⁻¹ de raíz) que fue significativamente mayor que los valores determinados para R2, R3 y R7.

Tabla 2.3. Número de copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp (16SH) y *Azospirillum* spp (16SA) en raíces. Se muestran los resultados en diferentes unidades de cuantificación con su respectiva desviación estándar de las dos determinaciones realizadas para las raíces de plantas cultivadas en los diferentes suelos (2-8) durante 25 días.

Raíces	<i>Herbaspirillum</i> spp.		<i>Azospirillum</i> spp	
	16SH.g ⁻¹ raíz	16SH.ng ⁻¹ ADN	16SA.g ⁻¹ raíz	16SA.ng ⁻¹ ADN
2	8.3 ± 1.8 x10 ⁴ b	4.0 ± 0.9 x10 ⁻¹	1.1 ± 0.1 x10 ⁵ cd	5.4 ± 0.4 x10 ¹
3	2.0 ± 2.5 x10 ⁴ b	0.8 ± 1.0 x10 ⁻¹	*	*
4	8.5 ± 4.6 x10 ⁵ ab	7.5 ± 4.1 x10 ⁻¹	2.5 ± 0.8 x10 ⁶ b	2.2 ± 1.0 x10 ²
5	8.8 ± 7.0 x10 ⁵ ab	2.4 ± 1.9 x10 ²	2.0 ± 0.4 x10 ⁴ d	5.6 ± 1.0 x10 ⁰
6	1.5 ± 0.2 x10 ⁶ a	3.2 ± 0.5 x10 ²	1.1 ± 1.1 x10 ⁴ d	2.4 ± 2.5 x10 ⁰
7	0.9 ± 1.1 x10 ⁵ b	2.0 ± 2.6 x10 ²	6.2 ± 0.4 x10 ⁵ c	1.4 ± 0.1 x10 ³
8	7.6 ± 1.3 x10 ⁵ ab	9.9 ± 1.8 x10 ⁻¹	7.0 ± 0.6 x10 ⁶ a	9.2 ± 0.8 x10 ²

*Valor de abundancia menor que el límite de cuantificación (2 copias del gen 16S ARNr.ng⁻¹ de ADN de raíz). Estos valores no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico. Las letras iguales para el análisis de cada gen, indican que no hay diferencias significativas entre las distintas raíces para p= 0.05 (Test de Tukey).

Cuando se comparó la densidad de las bacterias estudiadas por nanogramo de ADN en suelos y en las raíces de plantas crecidas en ellos, se observó que 16SA siempre fue más abundante en raíces que en suelo, excepto para R6 (Tablas 2.2 y 2.3). Los valores máximos de este gen para cada tejido fueron: 1.4 x10³ (R7) y 1.0 x10¹ (S7) copias por ng ADN. Para el gen 16SH también se vio una abundancia mayor en raíces que en los suelos respectivos, excepto para R3. El valor máximo para este gen en suelo se obtuvo en S3 (1.5 x10¹ copias por ng ADN), mientras que en las raíces los máximos fueron en R5, R6 y R7 con valores entre 2.0 y 3.2 x10² copias. ng ADN⁻¹.

Se realizó un análisis de correlación (Figura AI-12) entre la abundancia de genes de estas bacterias y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Se observó que hay una correlación positiva (0.64) entre la densidad de 16SA en raíces y el contenido de arcilla en el suelo, mientras que la abundancia de 16SH en raíces correlacionó positivamente (0.69) con el contenido de arena.

Los nutrientes del suelo parecen afectar la densidad de bacterias del género *Herbaspirillum* en suelo ya que se observó una correlación positiva (0.83) con la concentración de Fósforo y negativa (-0.75) con la de Nitrógeno (Figura AI-13).

Los genes cuantificados corresponden a los géneros mencionados según se confirmó por secuenciación de algunos de los productos de qPCR obtenidos de las raíces analizadas (Tabla 2.4). Se analizaron las muestras R2, R4, R5 y R8 para el producto de la amplificación de 16SH y las muestras R4 y R8 para el producto de 16SA.

Las secuencias del amplicón de 16SH analizadas tenían un tamaño de 390 pb aproximadamente y se observó una alta similitud (99-100%) con secuencias pertenecientes al género *Herbaspirillum* depositadas en la base de datos del NCBI. En R2 y R5 las secuencias mostraron una alta similitud (igual o superior al 99%) con la secuencia de la cepa *H. seropedicae* z67 (la misma que se utilizó en el experimento descrito en el Cap. I para inocular plantas) y con secuencias de las cepas 16 y 75 de *Herbaspirillum*, obtenidas anteriormente en nuestro país (Rariz *et al*, 2013). Estos resultados confirman que, al menos en algunos casos, las bacterias del género *Herbaspirillum* presentes en las raíces no sólo provienen de la semilla (*H. huttense*) sino también del suelo.

Por otra parte, las secuencias de 16SA analizadas tenían aproximadamente 205 pb y mostraron tener un 100% de similitud con varias especies del género *Azospirillum* (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Análisis de secuencias amplificadas en la cuantificación. Se reportan las secuencias más cercanas para los amplicones obtenidos por qPCR con los diferentes cebadores a partir de muestras de raíz (R).

Muestra	Cebadores	Secuencias más cercanas (N° acceso)	% Similitud
R2	HRSF/R	<i>H. seropedicae</i> z67 (CP011930.1)	99
R4	HRSF/R	<i>H. frisingense</i> R19G (JN869241.1), <i>H. seropedicae</i> ICB568 (HM013846.1), <i>H. huttiense</i> subsp. putei IAC/BECa-153 (JX155404.1), <i>H. lusitanum</i> IPR-Pv583 (JN208894.1).	99
R5	HRSF/R	<i>H. seropedicae</i> z67 (CP011930.1)	100
R8	HRSF/R	<i>H. huttiense</i> LJ19 (KF515669.1)	100
R4	Azo494F/756R	<i>A. lipoferum</i> NBRC 102290 (NR_114058.1), <i>A. humicireducens</i> ZqZ5 (NR_109675.1), <i>A. canadense</i> LMG 23617 (NR_117877.1), <i>A. brasilense</i> Az39 (CP007793.1), <i>A. zeae</i> U31 (KT345631.1), <i>A. thiophilum</i> BV-S (CP012405.1), <i>A. picis</i> IMMIB TAR-3 (NR_042682.1), <i>A. rugosum</i> IMMIB AFH-6 (NR_042582.1), <i>A. oryzae</i> COC8 (NR_041233.1).	100
R8	Azo494F/756R	<i>Azospirillum</i> spp. (Idem R4)	100



Discusión

Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* son conocidas por producir mejoras en los rendimientos de varios cultivos de gramíneas (Okon, 1985; Baldani *et al*, 1987; Bashan *et al*, 2004; Cassán & García de Salamone, 2008; Monteiro *et al*, 2012a; Wagh *et al*, 2014). Se ha visto que varias cepas de estos géneros habitan en suelos (Bashan 1999; Lin *et al*, 2011; Baldani *et al*, 2014a; Breidenbach *et al*, 2016) y tienen la capacidad de asociarse endofíticamente con arroz (Rariz *et al*, 2013; Ferrando & Fernández, 2015). Debido a que el suelo puede actuar como fuente de bacterias promotoras de crecimiento, resulta importante conocer la abundancia de bacterias como *Azospirillum* y *Herbaspirillum* que habitan naturalmente el suelo, así como también su capacidad de colonizar endofíticamente las raíces de arroz. A su vez, las bacterias de estos géneros que son capaces de colonizar raíces pueden competir eficientemente y desplazar a las cepas de *Azospirillum* o *Herbaspirillum* utilizadas en inoculantes comerciales. En tal caso, si las bacterias del suelo no tienen capacidades similares de promoción del crecimiento vegetal que las bacterias inoculadas, la tecnología de inoculación puede fracasar con el consecuente descenso del rendimiento del cultivo.

En el presente trabajo se utilizó un método de PCR en tiempo real para relevar la abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en suelos con propiedades diferentes y en raíces de plantas de arroz cultivadas por 25 días en esos suelos.

En general, la densidad de genes 16S ARNr de *Azospirillum* spp. (16SA) y *Herbaspirillum* spp. (16SH) por ng de ADN fue mayor en el interior de raíces que en el suelo donde se cultivaron las plantas. Los únicos casos donde no se registró esta tendencia fueron en S3-R3 para ambos genes y en S6-R6 para el gen 16SA (Figuras AI-10 y AI-11). Resulta interesante destacar que la cuantificación de estos genes en suelo corresponde a bacterias viables y no viables, mientras que en la raíz se puede asumir que se cuantifican las colonizadoras activas. Una mayor abundancia en raíz indicaría que las bacterias se reproducen mejor en su interior o que las mismas son capaces de atraer bacterias del suelo. Según varios autores, las bacterias pueden verse atraídas hacia las raíces de las plantas porque estas exudan grandes cantidades de sustancias quimiotácticas (Hardoim *et al*, 2008; Sourjik & Wingreen, 2012; Alexandre, 2015). Si bien no todas las bacterias son capaces de ingresar al interior de la planta, aquellas que lo hacen tienen al alcance una gran cantidad de nutrientes que pueden adquirir a un “costo” más bajo que en suelo. Por lo tanto, el interior de las raíces es, para aquellos endófitos, un hábitat donde pueden multiplicarse hasta alcanzar altas densidades. Si bien es conocido que varias especies del género *Herbaspirillum* son endófitas de gramíneas (Baldani *et al*, 2014b), también se ha visto

que algunas cepas de *Azospirillum* pueden colonizar el interior de las plantas de arroz (Kaneko *et al*, 2010; Rariz, 2012; Rariz *et al*, 2013; Baldani *et al*, 2014a). En este trabajo se pudo determinar que algunas especies del género *Azospirillum* pueden ser tan buenas colonizadoras como las del género *Herbaspirillum* porque alcanzaron densidades significativamente mayores en raíces como se observa para R2 y R7 (Figura AI-10 B).

El estudio de la sobrevivencia de *A. brasilense* Cd y sp245 en 23 tipos de suelos mostró que el porcentaje de arcilla, nitrógeno, materia orgánica y la capacidad de retención de agua son factores que correlacionan positivamente con la sobrevivencia de las bacterias (Bashan *et al*, 1995). Por otro lado, altos porcentajes de CaCO_3 y arena parecen tener un efecto negativo en la viabilidad, mientras que el limo, fósforo o potasio, conductividad y relación C/N parecen no influir. En este trabajo, la abundancia de *Azospirillum* spp. en los suelos que pudo cuantificarse (S3, S6, S7 y S8) no fue significativamente diferente, por tanto no pudo establecerse diferenciación debido a las propiedades del suelo (Figura AI-10A). Sin embargo, la abundancia de *Herbaspirillum* spp. en esos suelos mostró correlación positiva con la cantidad de Fósforo, siendo el suelo 3 (zona Este, con previo uso para cultivo de arroz) el que contenía mayor cantidad de copias de 16SH por gramo.

En todas las raíces, excepto en las del suelo 3, la abundancia de copias de los genes 16S ARNr tuvo como mínimo 10^4 por gramo y un máximo de 10^5 y 10^6 copias de 16SH y 16SA por gramo de raíz respectivamente. En las raíces de plantas cultivadas en suelos del centro del país (R5 y R6) *Herbaspirillum* spp. fue significativamente más abundante que *Azospirillum* spp. (Figura AI-10B)

El análisis de correlación mostró una tendencia que indica que en raíces de plantas cultivadas en suelos más arenosos hubo mayor abundancia de *Herbaspirillum* spp. endófito, mientras que en aquellas cultivadas en suelos más arcillosos hubo mayor abundancia de *Azospirillum* spp. endófito. Se ha visto que la arcilla es uno de los factores que se correlaciona positivamente con la sobrevivencia de *A. brasilense* en suelo (Bashan *et al*, 1995), por lo tanto se podría pensar que en los suelos arcillosos hay mas bacterias activas y capaces de colonizar raíces.



Conclusiones y Perspectivas Generales

En esta tesis se utilizó una estrategia molecular para monitorear bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* capaces de colonizar y permanecer asociadas a raíces de arroz (*Oryza sativa*).

En el Capítulo I se describe la optimización de la técnica de PCR cuantitativa que permitió monitorear la abundancia de *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. en arroz, la cual puede aplicarse también a suelos y a otros cultivos.

Las semillas de *O. sativa* variedad El Paso 144 no mostraron cantidades detectables de *Azospirillum* spp. ni de otros diazótrofos asociados. Sin embargo, bacterias del género *Herbaspirillum* no diazótroficas, probablemente pertenecientes a la especie *H. huttienne*, estaban asociadas a estas semillas y crecieron durante su germinación. Estas bacterias endófitas de semilla podrían tener un rol importante en el desarrollo de la planta, por lo que sería interesante aislarlas y caracterizarlas. Una cepa endófitas de esta especie es el ingrediente activo del inoculante comercial para arroz Endo-Rice, cuya aplicación ha mostrado rendimientos favorables en nuestro país. Por lo tanto, la caracterización de cepas de esta especie podría contribuir a entender los mecanismos bacterianos de colonización y promoción del crecimiento vegetal.

Una vez en contacto con el suelo, las bacterias del género *Azospirillum*, así como las bacterias diazótroficas totales, aumentaron su número en las raíces de las plantas. Esto sugiere que el suelo utilizado en este experimento es fuente de bacterias potencialmente promotoras del crecimiento vegetal.

Las bacterias del género *Azospirillum* nativas del suelo se mantuvieron en altas densidades asociadas a las raíces de arroz durante todo el experimento (70 días después del trasplante a suelo). En cambio, la abundancia de las bacterias del género *Herbaspirillum* disminuyó significativamente entre los días 10 y 45 y no fueron detectadas en las raíces cuando las plantas estaban inundadas. Las bacterias diazótroficas del suelo colonizaron las raíces de las plantas no inoculadas y se mantuvieron en densidades relativamente constantes (entre 10^2 y 10^3 copias de genes *nifH* por ng de ADN) durante todo el período del ensayo.

La inoculación con *Azospirillum brasilense* Az39 afectó la persistencia de las bacterias del género *Azospirillum* en raíces, ya que se observó que las copias de genes 16SA decayeron con el tiempo sólo en las plantas inoculadas con esta cepa.

Las bacterias diazótroficas asociadas a raíces se comportaron en forma similar en todas las plantas, ya fueran inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39, con *Herbaspirillum seropedicae*

z67 o no inoculadas: su abundancia no varió significativamente durante los 70 días del experimento. Este resultado se obtuvo tanto por una aproximación molecular (cuantificación de genes *nifH*) como mediante el cultivo (recuento por NMP en medio específico para diazótrofos). Asimismo, se confirmó que entre los diazótrofos recuperados en este medio de cultivo, las bacterias del género *Herbaspirillum* predominaron en los tres tratamientos en etapas tempranas del cultivo (10 días) y que, por el contrario, las bacterias del género *Azospirillum* fueron mayoritarias en todos los tratamientos luego de la inundación (70 días). Sería interesante complementar estos resultados con técnicas que permitan el estudio del microbioma asociado a la raíz para conocer cuáles son las especies presentes, cuál es su dinámica y si poseen la misma capacidad de fijar nitrógeno *in situ*.

El desarrollo vegetal no estuvo influenciado por la inoculación con *A. brasilense* Az39 o con *H. seropedicae* z67 en las condiciones del ensayo de esta tesis. La abundancia de *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y diazótrofos nativos asociados a las raíces tampoco afectó el rendimiento vegetal. Resultaría interesante estudiar el efecto de estas bacterias en plantas creciendo en condiciones de stress abiótico, como por ejemplo con menores dosis de fertilizantes, donde la capacidad de promoción de crecimiento puede tener mayor influencia sobre el desarrollo vegetal.

En el Capítulo II de esta tesis se estudiaron otros suelos y se determinó su capacidad de albergar bacterias colonizadoras de raíces de *O. sativa* variedad El Paso 144.

Se determinó que en siete suelos (S2 a S8) de distintas regiones del país (Este, Centro y Norte), con diferente uso (campo natural, pastura o cultivo de arroz) y con diferentes propiedades fisicoquímicas, había bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* capaces de colonizar raíces de arroz. La detección de *Herbaspirillum seropedicae* en algunos productos de amplificación, confirma que la población de bacterias del género *Herbaspirillum* cuantificadas en raíces estaba compuesta por bacterias del suelo, además de las bacterias de *H. huttiense* presentes en semilla.

En suelos del Este (S3), Centro (S6) y Norte (S7 y S8), ya sea utilizados para el cultivo de arroz o utilizados como campos naturales, la abundancia de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. fue del orden de 10^3 - 10^4 copias por gramo de suelo.

Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* estaban en densidades por debajo del límite de detección algunos suelos (S2, S4 y S5). Sin embargo, al cabo de 25 días de trasplantadas,

las raíces de plantas cultivadas en estos suelos estaban colonizadas por *Azospirillum* y *Herbaspirillum* alcanzando densidades superiores a 10^4 copias del gen 16S rRNA respectivo por gramo de raíz.

En los suelos del Norte (S7 y S8), más arcillosos, las raíces presentaron mayor abundancia de *Azospirillum* spp., mientras que en los suelos de la zona Centro (S5 y S6), más arenosos, las raíces cultivadas en ellos tuvieron mayor abundancia de *Herbaspirillum* spp.

En general, hemos podido confirmar que las raíces de arroz capturan del suelo y propician el crecimiento de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Es posible que se trate de más de una especie o cepa con diferente capacidad para promover el crecimiento vegetal. En tal caso, es importante considerar que las buenas colonizadoras y pobres promotoras del crecimiento vegetal podrían estar compitiendo y por tanto podrían desplazar a las cepas PCV de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* que provienen de los inoculantes comerciales. Estos resultados sugieren que la población natural de suelo capaz de colonizar raíces de arroz es un factor biótico importante para considerar el éxito de la aplicación de un inoculante comercial.



ANEXO I

Tablas y Figuras Adicionales

CAPÍTULO I

Evaluación *in silico* de cebadores utilizados

Es	Fragmento esperado de 455 pb																																								
	207		Secuencia HRS-F														226		645		Secuencia HRS-R										661										
	5'	G	C	A	A	G	A	C	C	T	C	A	T	G	C	T	C	C	T	G	3'	5'	C	A	C	G	G	C	T	A	G	A	G	T	G	T	G	T	C	3'	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	A	.
8	A	.	
9	A	A	
10	G	.	
11	A	.	
12	A	T	

Figura AI-1. Alineamiento de las secuencias del sitio de reconocimiento de los cebadores HRS-F/R en una región del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. y otros géneros. Se probó la especificidad de los cebadores con la herramienta Primer-BLAST. Las posiciones (207 a 661) corresponden a la del gen 16S ARNr de *E. coli*. El (.) indica que el nucleótido blanco es igual al del cebador. Las especies (Es) que mostraron 0.3 mismatches fueron 1-*Herbaspirillum seropedicae* (CP011930), 2-*Herbaspirillum rubrisubalbicans* (CP013737), 3-*Herbaspirillum aquaticum* (KM272811), 4-*Herbaspirillum huttiense* (NR_114139), 5-*Herbaspirillum frisingense* (JN869241), 6-*Herbaspirillum lusitanum* (JN208894), 7-*Herminimonas arsenicoxydans* (NR_125502), 8-*Herminimonas glaciei* (JX971554), 9-*Collimonas fungivorans* (NR_074756), 10-*Noviherbaspirillum aurantiacum* (NR_118040), 11-*Undibacterium jejuense* (NR_125671), 12-*Paucimonas lemoignei* (GU826589).

Evaluación de parámetros vegetales

Tabla AI-1. Evaluación de parámetros vegetales. Se muestran los promedios obtenidos para cada tratamiento con su correspondiente desviación estándar.

Tiempo* (DDT)	Trat.**	Peso	Peso	Largo	Largo
		Fresco planta (g)	Seco planta (g)	Aéreo (cm)	Raíz (cm)
5	C	0.111 ± 0.009	0.024 ± 0.001	23.4 ± 1.3	6.4 ± 1.5
	Az39	0.114 ± 0.006	0.024 ± 0.002	23.6 ± 0.8	7.2 ± 0.7
	Z67	0.095 ± 0.015	0.025 ± 0.002	22.1 ± 1.6	6.3 ± 1.7
10	C	0.134 ± 0.003	0.034 ± 0.001	28.5 ± 1.1	5.8 ± 0.5
	Az39	0.147 ± 0.005	0.039 ± 0.003	31.4 ± 0.6	6.5 ± 1.8
	Z67	0.151 ± 0.009	0.038 ± 0.003	31.9 ± 1.0	7.4 ± 1.4
45	C	0.701 ± 0.158	0.236 ± 0.047	50.8 ± 2.4	12.0 ± 1.9
	Az39	0.913 ± 0.213	0.320 ± 0.053	57.1 ± 3.3	12.7 ± 2.0
	Z67	0.710 ± 0.219	0.234 ± 0.073	49.4 ± 7.1	11.5 ± 1.1
70	C	2.469 ± 0.827	0.683 ± 0.224	68.3 ± 9.8	15.4 ± 4.0
	Az39	2.588 ± 0.436	0.703 ± 0.146	69.3 ± 7.9	14.4 ± 2.3
	Z67	1.928 ± 0.411	0.560 ± 0.179	61.6 ± 3.7	13.6 ± 1.0

*Tiempo de muestreo en Días Después de Trasplante (DDT).

**Tratamientos (Trat.) Control sin inocular (C), inoculado con *A. brasilense* Az39 (Az39) e inoculado con *H. seropedicae* z67 (z67).

Extracción de ADN de tejido vegetal

Tabla AI-2. Rendimiento de la extracción de ADN. Se muestra el rango de concentración de ADN extraído en cada tiempo de muestreo a partir semilla o de tejido vegetal (peso fresco)

Muestreo (DDT*)	µg ADN.g ⁻¹ tejido
Semilla	5.5-6.9
0	9.9-23.5
5	2.3-9.4
10	2.9-45.3
45	5.7-19.6
70	6.7-16.8

*DDT: Días Después del Trasplante. Se analizaron semillas con dos horas de inoculadas (2h), plantín con 4 días de germinada (0 DDT) y raíces con 5, 10, 45 y 70 DDT.

Optimización de la qPCR para el gen 16S ARNr de *Azospirillum* spp.

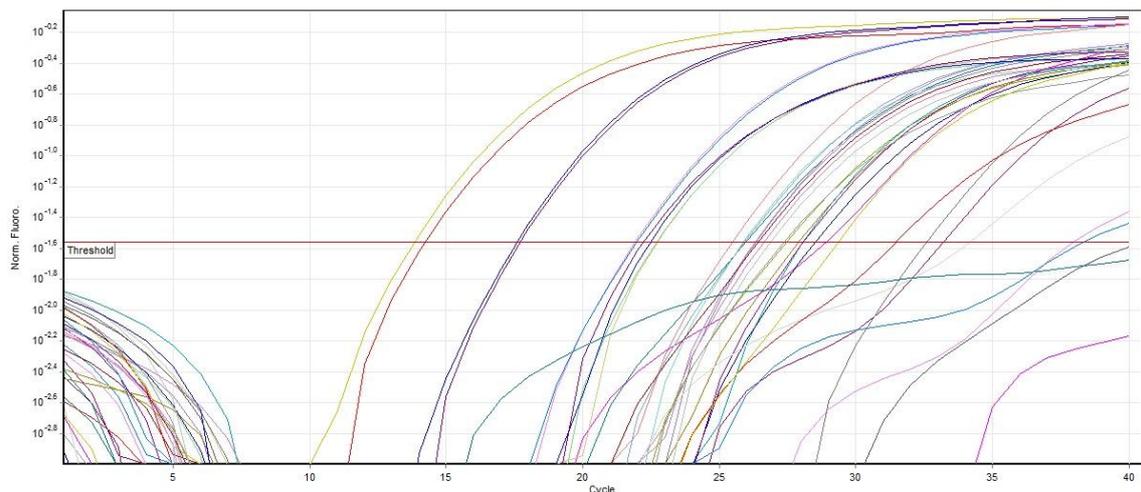


Figura AI-3. Curva de cuantificación por qPCR de 16S ARNr de *Azospirillum* spp. en el ensayo de interferencia. Se representa en escala logarítmica la cuantificación de la curva estándar, las muestras y los controles negativos. La línea roja indica el umbral establecido.

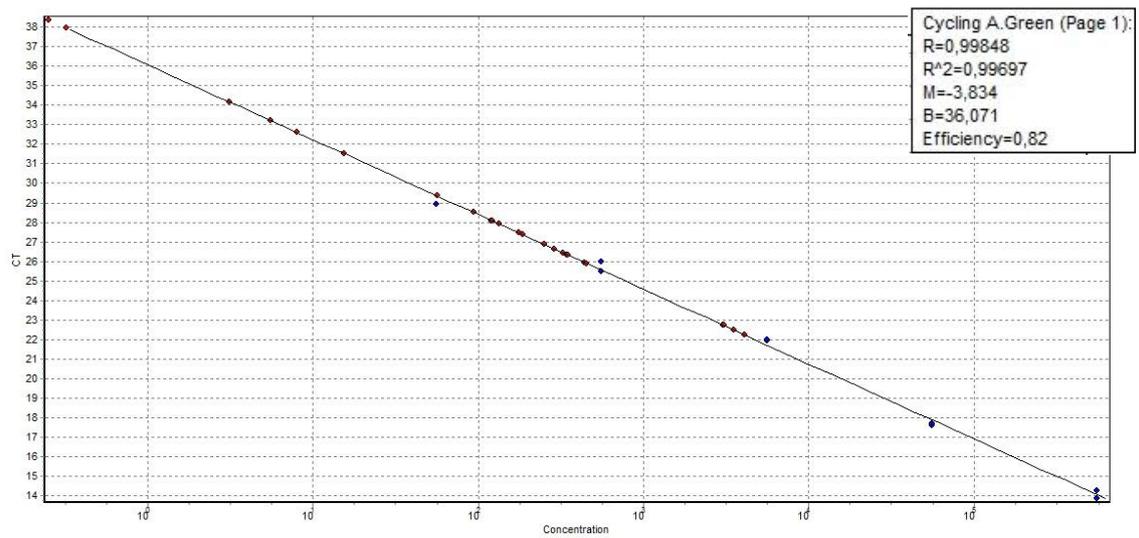


Figura AI-4. Curva estándar de qPCR del gen 16S ARNr de *Azospirillum* spp. Se representa C_T vs Concentración (copias. μL^{-1}), donde los puntos azules corresponden al estándar (duplicados desde dilución 10^{-5} a 10^{-9}) y los rojos las muestras. Arriba a la derecha se indican los parámetros obtenidos.

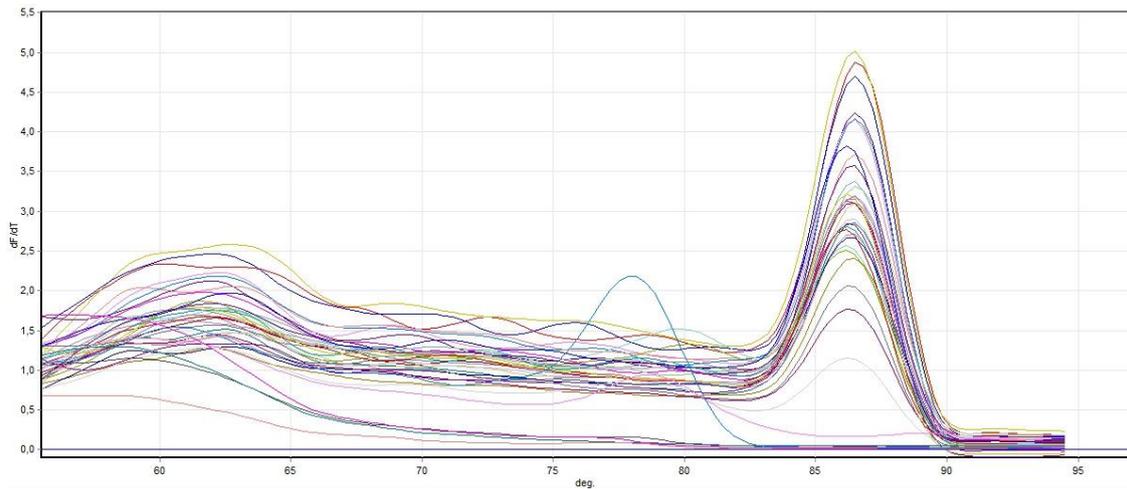


Figura AI-5. Curva de melting de amplicones obtenidos en qPCR de 16S ARNr de *Azospirillum* spp. Se muestra un barrido de temperaturas entre 55 y 95°C para la curva estándar (85-88°C), las muestras y los controles negativos.

Optimización de la qPCR para el gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp.

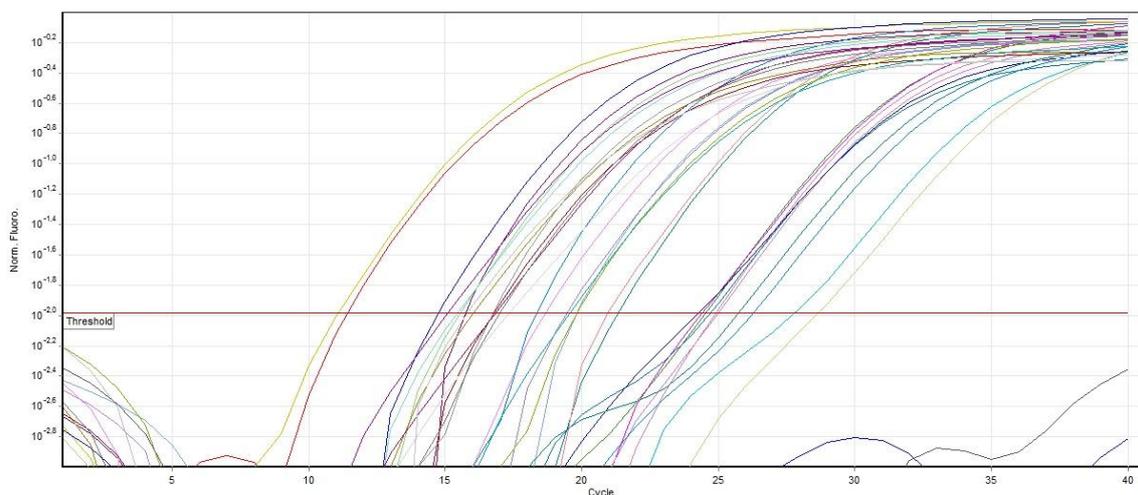


Figura AI-6. Curva de cuantificación por qPCR de 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. en el ensayo de interferencia. Se representa en escala logarítmica la cuantificación de la curva estándar, las muestras y los controles negativos. La línea roja indica el umbral establecido.

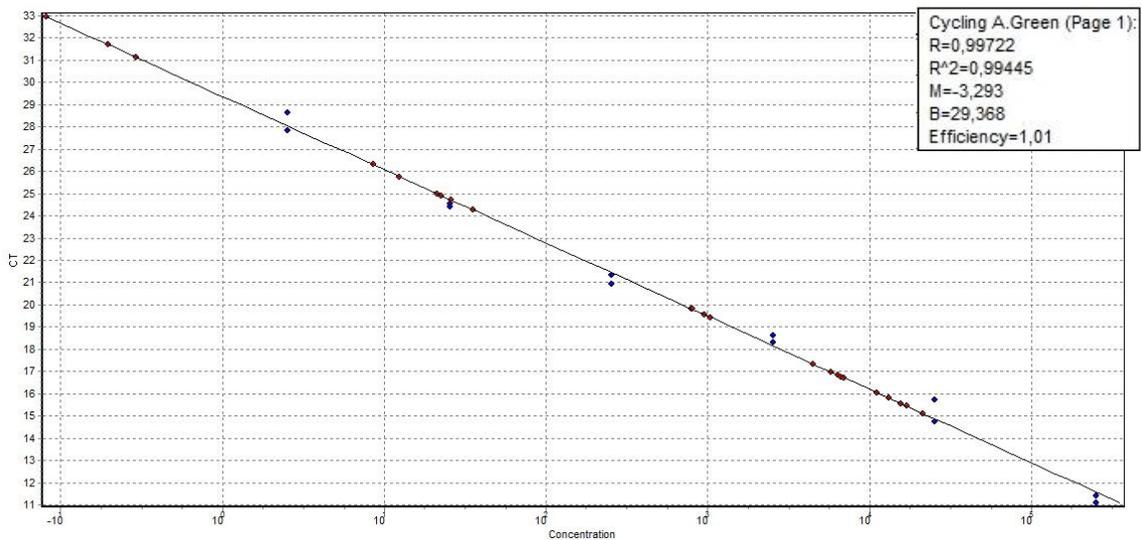


Figura AI-7. Curva estándar de qPCR del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. Se representa C_T vs Concentración (copias. μL^{-1}), donde los puntos azules corresponden al estándar (duplicados desde dilución 10^{-5} a 10^{-10}) y los rojos las muestras. Arriba a la derecha se indican los parámetros obtenidos.

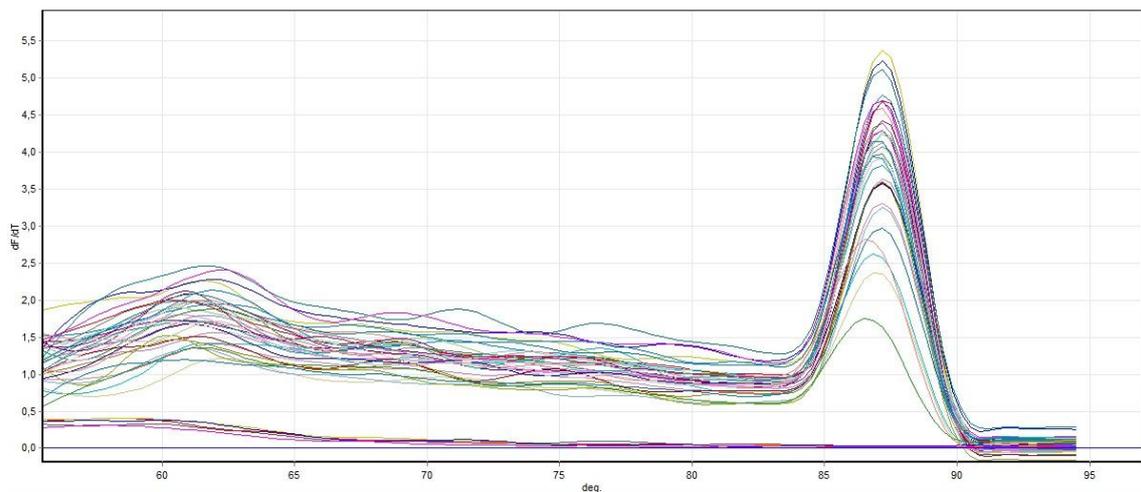


Figura AI-8. Curva de melting de amplicones obtenidos en qPCR de 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp. Se muestra un barrido de temperaturas entre 55 y 95°C para la curva estándar (86-88°C), las muestras y los controles negativos.

Abundancia de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y diazótrofos totales en *Oryza sativa*

Tabla AI-3. Número de copias de los genes *nifH* (diazótrofos) y 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp (16SH) y *Azospirillum* spp (16SA) cuantificados mediante qPCR. Se muestran los resultados en distintas unidades de cuantificación para el pool de muestras de semillas con dos horas de inoculadas (2h) y de plantines 4 días después de la inoculación y germinación sin contacto con suelo (0 DDT) según el tratamiento (Trat): Control sin inocular (C), inoculado con z67 (z67) e inoculado z39 (Az39).

Tiempo	Trat	Copias de 16SH		Copias de 16SA		Copias de <i>nifH</i>	
		Copias 16SH. g ⁻¹ tejido **	Copias 16SH. ng ⁻¹ ADN	Copias 16SA. g ⁻¹ tejido	Copias 16SA. ng ⁻¹ ADN	Copias <i>nifH</i> . g ⁻¹ tejido	Copias <i>nifH</i> . ng ⁻¹ ADN
2h	C	*	*	*	*	*	*
	z67	5.3 ± 0.7 x10 ⁷	7.7 ± 1.0 x10 ³	*	*	4.2 ± 0.2 x10 ⁶	6.2 ± 0.2 x10 ²
	Az39	*	*	2.5 ± 0.0 x10 ⁶	4.5 ± 0.2 x10 ²	2.6 ± 0.7 x10 ⁴	4.7 ± 1.2 x10 ⁰
0 DDT	C	1.1 ± 0.3 x10 ⁷	4.7 ± 1.2 x10 ²	1.2 ± 0.5 x10 ⁴	5.2 ± 2.2 x10 ⁻¹	*	*
	z67	7.1 ± 1.1 x10 ⁷	3.4 ± 0.5 x10 ³	4.2 ± 1.4 x10 ⁴	2.0 ± 0.7 x10 ⁰	9.7 ± 5.5 x10 ⁶	4.7 ± 2.6 x10 ²
	Az39	1.7 ± 0.5 x10 ⁵	1.7 ± 0.5 x10 ¹	1.3 ± 0.4 x10 ⁸	1.3 ± 0.4 x10 ⁴	4.6 ± 1.2 x10 ⁶	4.7 ± 1.3 x10 ²

*Valor de abundancia menor que el límite de cuantificación.

**Peso fresco.

Tabla AI-4. Número de copias de los genes *nifH* (diazótrofos) y 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp (16SH) y *Azospirillum* spp (16SA) en raíz cuantificados mediante qPCR. Se muestran los resultados en diferentes unidades de cuantificación con la desviación estándar obtenida de los triplicados biológicos a distintos días después de trasplante (DDT), para los tratamientos (Trat) Control sin inocular (C), inoculado con z67 (z67) e inoculado Az39 (Az39).

DDT	Trat	<i>Herbaspirillum</i> spp.		<i>Azospirillum</i> spp		Diazótrofos	
		Copias 16SH. g ⁻¹ raíz**	Copias 16SH. ng ⁻¹ ADN	Copias 16SA. g ⁻¹ raíz	Copias 16SA. ng ⁻¹ ADN	Copias <i>nifH</i> . g ⁻¹ raíz	Copias <i>nifH</i> . ng ⁻¹ ADN
5	C	9.1 ± 4.5 x10 ⁵	2.6 ± 0.9 x10 ²	0.9 ± 1.4 x10 ⁶	2.1 ± 3.0 x10 ²	5.8 ± 4.4 x10 ⁵	1.6 ± 0.7 x10 ²
	z67	6.8 ± 8.2 x10 ⁶	7.6 ± 8.6 x10 ³	4.0 ± 5.8 x10 ⁶	4.7 ± 6.7 x10 ²	3.1 ± 2.7 x10 ⁶	3.5 ± 2.8 x10 ²
	Az39	2.6 ± 0.3 x10 ⁵	5.5 ± 2.9 x10 ¹	3.7 ± 1.4 x10 ⁷	6.9 ± 1.0 x10 ³	3.7 ± 3.3 x10 ⁶	5.8 ± 3.0 x10 ²
10	C	2.3 ± 0.5 x10 ⁶	1.6 ± 1.4 x10 ²	9.6 ± 8.6 x10 ⁵	4.3 ± 5.0 x10 ¹	3.5 ± 3.0 x10 ⁶	1.5 ± 0.3 x10 ²
	z67	3.5 ± 5.3 x10 ⁶	3.3 ± 5.0 x10 ²	3.7 ± 4.6 x10 ⁶	4.4 ± 5.9 x10 ²	2.7 ± 1.2 x10 ⁶	2.7 ± 1.7 x10 ²
	Az39	7.6 ± 9.9 x10 ⁴	0.9 ± 1.2 x10 ¹	1.2 ± 1.6 x10 ⁷	1.3 ± 2.0 x10 ³	8.0 ± 9.1 x10 ⁵	0.8 ± 1.2 x10 ²
45	C	1.9 ± 1.7 x10 ⁵	1.5 ± 1.5 x10 ¹	5.2 ± 5.3 x10 ⁶	3.7 ± 3.4 x10 ²	8.9 ± 3.2 x10 ⁵	6.1 ± 1.2 x10 ¹
	z67	2.1 ± 1.4 x10 ⁴	1,8 ± 0,9 x10 ⁰	8.5 ± 7.6 x10 ⁴	6,5 ± 6,1 x10 ⁰	2.3 ± 1.6 x10 ⁵	1.7 ± 0.4 x10 ¹
	Az39	1.5 ± 0.6 x10 ⁴	1,9 ± 1,2 x10 ⁰	0.8 ± 1.3 x10 ⁶	1.3 ± 2.1 x10 ²	2.3 ± 2.5 x10 ⁵	3.6 ± 4.2 x10 ¹
70	C	*	*	2.9 ± 3.0 x10 ⁵	1.9 ± 1.7 x10 ¹	1.2 ± 1.8 x10 ⁶	0.8 ± 1.0 x10 ²
	z67	*	*	3.5 ± 3.7 x10 ⁵	3.7 ± 4.5 x10 ¹	3.8 ± 4.8 x10 ⁵	3.2 ± 3.5 x10 ¹
	Az39	*	*	3.8 ± 5.4 x10 ⁴	3.2 ± 4.2 x10 ⁰	0.8 ± 1.1 x10 ⁶	7.2 ± 9.7 x10 ¹

*Valores de abundancia menor que el límite de cuantificación. Estos valores no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

**Peso fresco.

Alineamiento de secuencias de *Herbaspirillum*

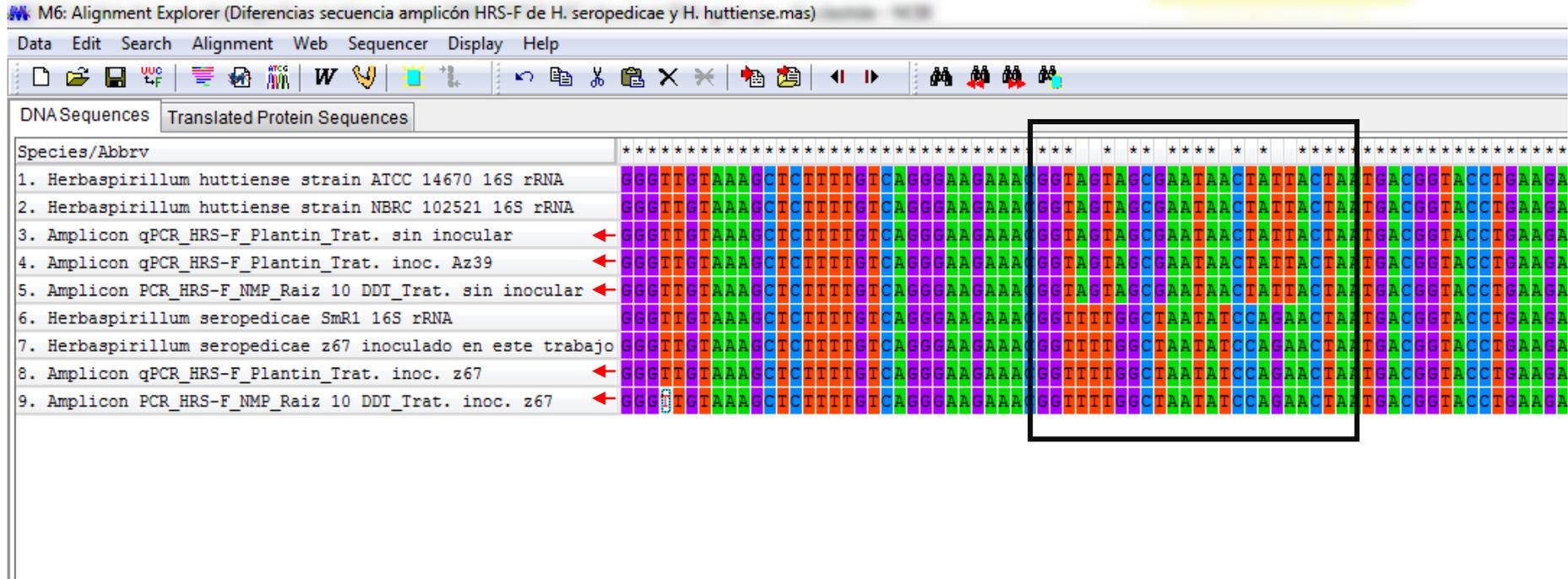


Figura AI-9. Diferencia en secuencias del gen 16S ARNr de *Herbaspirillum* detectadas en el recuento de diazótrofos. Se muestran las secuencias de *Herbaspirillum* obtenidas con el set de cebadores HRS-F/R a partir tubos del recuento por NMP (PCR) y de las medidas de abundancia en plantín y raíz (qPCR) (Flechas rojas), en comparación con secuencias de referencia. El cuadro en negro muestra 8 de los 9 pb de diferencia (ubicados en la posición 450), en aproximadamente 350 pb, que tienen *H. huttiense* y *H. seropedicae*.

CAPÍTULO II

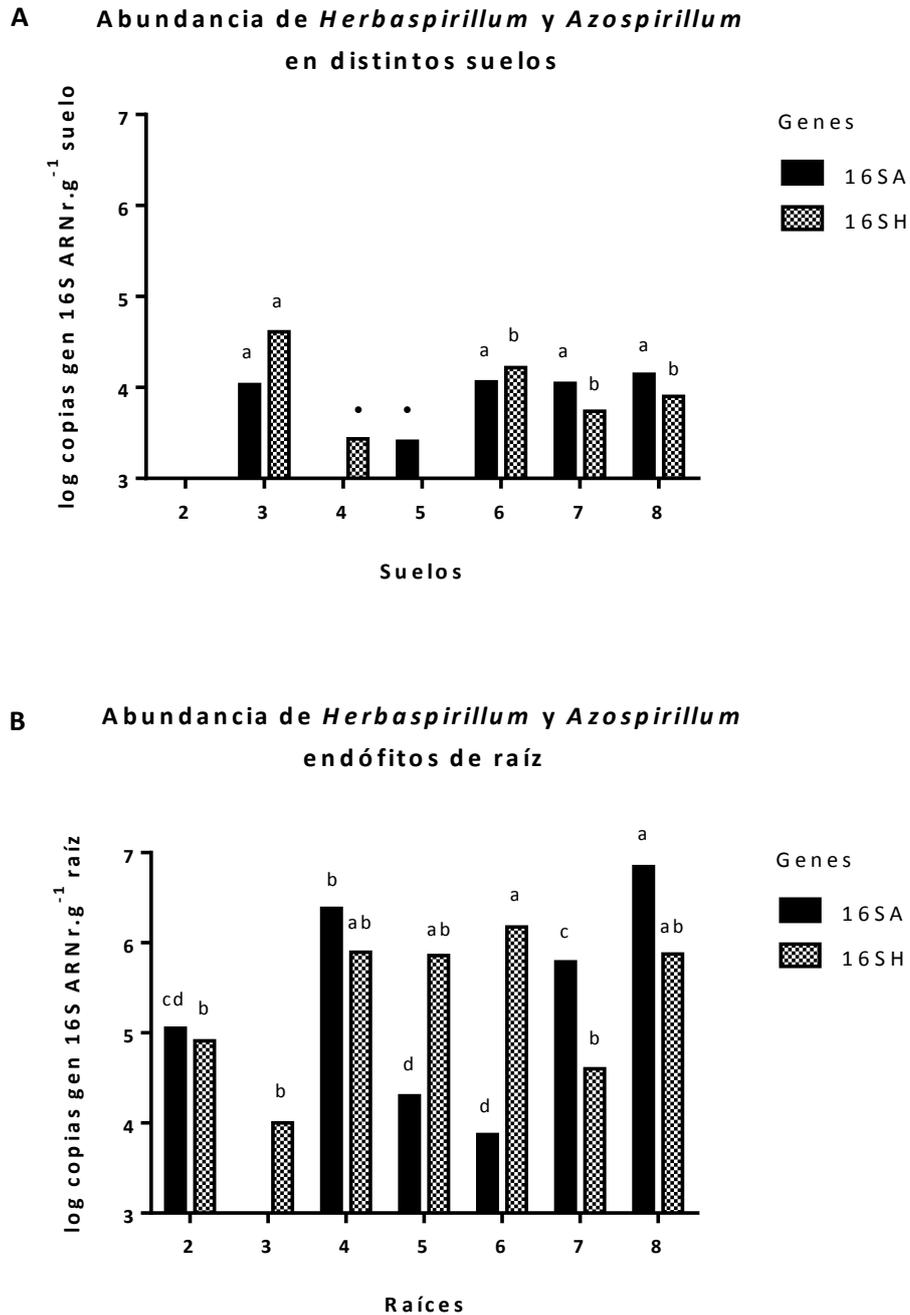
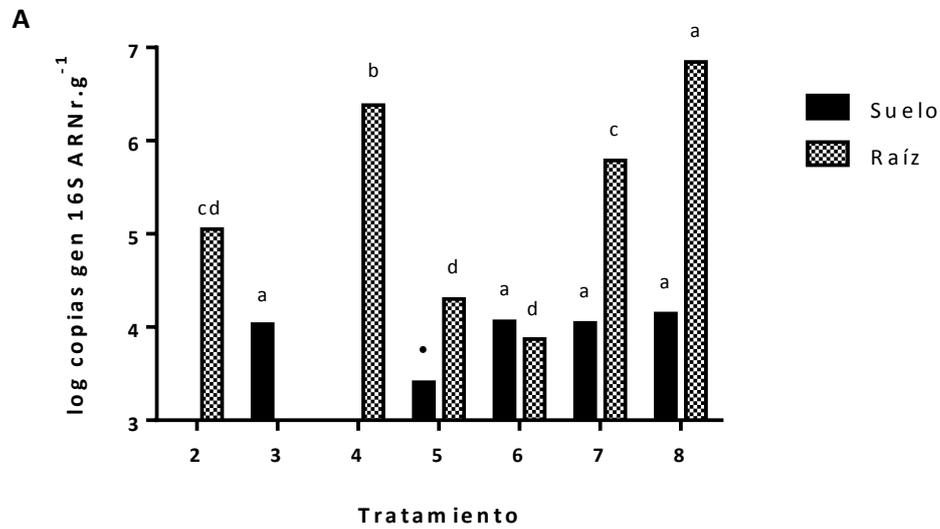


Figura AI-10. Abundancia de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. Se muestra la abundancia de copias de los genes 16S ARNr de *Herbaspirillum* spp (16SH) y *Azospirillum* spp. (16SA) en distintos suelos (A) y en el interior de raíces de plantas cultivadas en esos suelos por 25 días (B). Las columnas del mismo color (mismo gen) con letras iguales, indican que no hay diferencias significativas en la abundancia de genes para $p=0,05$ (Test de Tukey). La abundancia cero indica que la misma fue menor al límite de cuantificación, mientras que el (•) indica la abundancia del replicado cuyo valor fue superior al límite de cuantificación, estos datos no fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico.

Abundancia de *Azospirillum* en suelo y raíces de plantas cultivadas en estos suelos



Abundancia de *Herbaspirillum* en suelo y raíces de plantas cultivadas en estos suelo

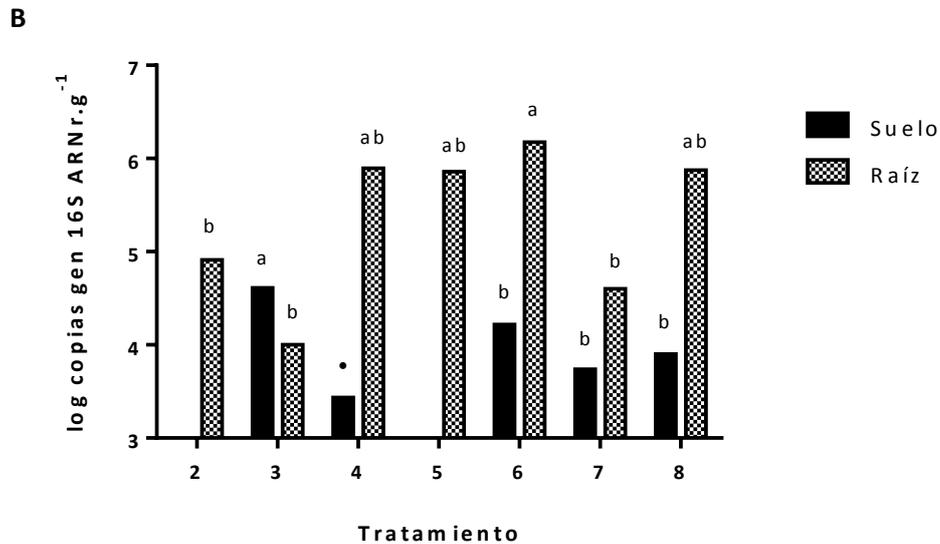


Figura AI-11. Abundancia de *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. Se muestra la abundancia de copias de los genes 16S ARNr de *Azospirillum* spp. (A) y *Herbaspirillum* spp. (B) en distintos suelos y el interior de raíces de plantas cultivadas en estos por 25 días (Tratamiento). Las columnas del mismo color (mismo tratamiento) con letras iguales, indican que no hay diferencias significativas en la abundancia de genes para $p=0,05$ (Test de Tukey La abundancia cero indica que la misma fue menor al límite de cuantificación, mientras que el (•) indica la abundancia del replicado cuyo valor fue superior al límite de cuantificación, estos datos no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

Análisis de correlación de Pearson

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	16S Azo g/r	16S Herb g/R	CO	MO	N	P	K	Arena	Limo	Arcilla
16S Azo g/r	1,00	0,73	0,34	0,33	0,33	0,08	0,46	0,28	0,63	0,12
16S Herb g/R	0,16	1,00	0,20	0,22	0,28	0,56	0,05	0,09	0,05	0,21
CO	0,43	-0,55	1,00	2,1E-09	6,2E-05	0,73	0,02	0,01	0,01	0,03
MO	0,43	-0,53	1,00	1,00	5,2E-05	0,72	0,02	0,01	0,01	0,04
N	0,44	-0,48	0,98	0,99	1,00	0,54	0,05	0,01	0,02	0,03
P	-0,70	-0,27	-0,16	-0,17	-0,28	1,00	0,75	0,68	0,82	0,31
K	0,34	-0,76	0,84	0,84	0,75	0,15	1,00	0,01	4,4E-03	0,04
Arena	-0,47	0,69	-0,90	-0,90	-0,87	0,19	-0,90	1,00	2,5E-03	1,9E-03
Limo	0,23	-0,76	0,89	0,89	0,83	0,10	0,91	-0,93	1,00	0,06
Arcilla	0,64	-0,54	0,79	0,79	0,80	-0,45	0,77	-0,94	0,74	1,00

Figura AI-12. Análisis de correlación entre la abundancia de copias en raíz y propiedades fisicoquímicas del suelo. Se muestra la correlación entre la abundancia de copias de los genes 16S ARNr.g⁻¹ raíz de *Azospirillum* spp. (16S Azo g/r) y de *Herbaspirillum* spp. (16S Herb g/R) respecto a las propiedades fisicoquímicas del suelo: CO (Carbono Orgánico), MO (Materia Orgánica), N (Nitrógeno), P (Fósforo), K (Potasio) y contenido de Arena, Arcilla y Limo.

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	16S Herb g/s	16S Azo g/s	CO	MO	N	P	K	Arena	Limo	Arcilla
16S Herb g/s	1,00	0,55	0,39	0,38	0,25	0,17	0,96	0,58	0,78	0,46
16S Azo g/s	0,45	1,00	0,91	0,91	0,93	0,99	0,63	0,98	1,00	0,97
CO	-0,61	0,09	1,00	2,6E-04	0,02	0,08	0,24	0,06	0,16	0,02
MO	-0,62	0,09	1,00	1,00	0,02	0,07	0,25	0,07	0,17	0,03
N	-0,75	-0,07	0,98	0,98	1,00	0,04	0,37	0,10	0,22	0,04
P	0,83	-0,01	-0,92	-0,93	-0,96	1,00	0,54	0,25	0,42	0,16
K	0,04	0,37	0,76	0,75	0,63	-0,46	1,00	0,13	0,07	0,19
Arena	0,42	0,02	-0,94	-0,93	-0,90	0,75	-0,87	1,00	0,03	0,01
Limo	-0,22	1,6E-03	0,84	0,83	0,78	-0,58	0,93	-0,97	1,00	0,07
Arcilla	-0,54	-0,03	0,98	0,97	0,96	-0,84	0,81	-0,99	0,93	1,00

Figura AI-13. Análisis de correlación entre la abundancia de copias en suelo y propiedades fisicoquímicas del suelo. Se muestra la correlación entre la abundancia de copias de los genes 16S ARNr.g⁻¹ suelo de *Azospirillum* spp. (16S Azo g/s) y de *Herbaspirillum* spp. (16S Herb g/s) respecto las propiedades fisicoquímicas del suelo: CO (Carbono Orgánico), MO (Materia Orgánica), N (Nitrógeno), P (Fósforo), K (Potasio) y contenido de Arena, Arcilla y Limo.



ANEXO II

Medios de Cultivo

Medio RMR modificado de Elbeltagy *et al* (2001)

Solución A	Para 900 ml	Concentración final
K ₂ HPO ₄	0.80 g	0.8 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.20 g	0.2 g.L ⁻¹
NaCl	0.10 g	0.1 g.L ⁻¹
Na ₂ FeEDTA (sol)*	16.50 mL	28 mg.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₂ .H ₂ O (sol)**	9.00 mL	25 mg.L ⁻¹
Extracto de levadura	0.10 g	0.1 g.L ⁻¹
Manitol	3.00 g	3 g.L ⁻¹
Sacarosa	5.00 g	5 g.L ⁻¹
Lactato de K 3M (sol)***	0.90 mL	3 mM
Ácido málico	1.72 g	1.72 g.L ⁻¹
Agua destilada	900.00 mL	---
Agar	2.50 g	2.5 g.L ⁻¹

Ajustar pH a 7.0 con NaOH antes de agregar el agar.

*solución stock: 149mg/100mL Na₂EDTA + 108mg/100mL FeCl₃.6H₂O. **solución 100x.

***solución stock 3M = 0.5ml de solución 60% Lactato de Sodio.

Solución B	Para 100 ml	Concentración final
MgSO ₄ .6H ₂ O	0.216 g	2.16 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.060 g	0.6 g.L ⁻¹
Agua destilada	100 mL	---

Suplemento

Solución vitaminas BCyT 1000x *2mL/100mL de solución B.

(Mantener las vitaminas a oscuras. Esterilización por filtración por membrana).

*Solución 1000x: Biotina 2 mg y ácido para-aminobenzoico en 1 litro de agua destilada. Se filtra por membrana y se conserva en oscuridad.

Caldo LB (Luria Bertani)

Composición	Para 1 Litro
Triptona	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g

pH 7.0 ± 0.2



Bibliografía

- ACA (2010) Cuatro años de inoculación de arroz. Revista de la Asociación de Cultivadores de Arroz. 63: 38- 42.
- ACA (2013) Guía de buenas prácticas en el cultivo de arroz en Uruguay. (En línea) <http://www.aca.com.uy/manual-de-buenas-practicas-agricolas> [Consulta: Noviembre de 2015].
- ACA, Asociación de cultivadores de arroz. EL cultivo en Uruguay. (En línea) www.aca.com.uy [Consulta: Marzo de 2012].
- ACA, Asociación de cultivadores de arroz. EL cultivo en Uruguay. (En línea) www.aca.com.uy [Consulta: Marzo de 2015].
- Alexandre G (2015) Chemotaxis in *Azospirillum*. En: Cassán FD, Okon Y, Creus CM (Eds). Handbook for *Azospirillum*. Springer International Publishing. 101-114.
- Ali S, Trevor CC, Glick BR (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. Plant Physiol Biochem. 80: 160–167.
- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Soil. 356: 245–264.
- Ambrosini A, de Souza R, Passaglia LM (2015) Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. Plant Soil. 1-15.
- Andrade EF, Celi HR, Hurtado DJ, Valdiviezo FE (2007) Manual del cultivo de arroz. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) Estación experimental Boliche. 66(2).
- Araújo AE da S, Baldani VLD, Galisa P de S, Pereira JA, Baldani JI (2013) Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. Appl Soil Ecol. 64: 49–55.
- Azevedo MS, Teixeira KRS, Kirchhof G, Hartmann A, Baldani JI (2005) Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. Pedobiología 49: 565–576.
- Bagwell CE, Rocque JR, Smith GW, Polson SW, Friez MJ, Longshore JW, Lovell CR (2002) Molecular diversity of diazotrophs in oligotrophic tropical seagrass bed communities. FEMS Microb Ecol. 39: 113–119.
- Balandreau J (2002) The spermosphere model to select for plant growth promoting rhizobacteria. En: Kennedy IR, Choudhury ATMA (Eds). Biofertilisers in action. Rural Industries Research and Development Corporation. Canberra. 86: 55–63
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. Int J Syst Bacteriol. 36: 86–93
- Baldani JI, Videira SS, dos Santos Teixeira KR, Reis VM, de Oliveira ALM, Schwab S, de Souza EM, Pedraza RO, Baldani VLD, Hartmann A (2014a) The family *Rhodospirillaceae*, En: Rosenberg E, De Long EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (Eds). The Prokaryotes. Springer. Berlín. 533–618.
- Baldani JI, Videira SS, Rows L, Magalhaes CL, Olivares FL, Schmid M, Hartmann A (2014b) The Family *Oxalobacteraceae*, En: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (Eds). The Prokaryotes. The Prokaryotes. Springer. Berlín. 920–974.

- Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (1987) Inoculation of field grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brasil. *Biol Fert Soils*. 4: 37-40.
- Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fert Soils*. 30: 485–491.
- Baldani VLD, Baldani JI, Olivares F, Döbereiner J (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 13: 65-73
- Baldani VLD, Döbereiner J (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol Biochem*. 12: 433–439
- Baldwin BR, Nakatsu CH, Nies L (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl Environ Microb*. 69: 3350–3358.
- Baldwin BR, Nakatsu CH, Nies L (2008) Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. *Water Res*. 42: 723–731.
- Bao Z, Sasaki K, Okubo T, Ikeda S, Anda M, Hanzawa E, Kakizaki K, Sato T, Mitsui H, Minamisawa K (2013). Impact of *Azospirillum* sp. B510 Inoculation on Rice-Associated Bacterial Communities in a Paddy Field. *Microbes Environ*. 28: 487–490.
- Bashan Y (1999) Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol Fertil Soils*. 29: 246–256.
- Bashan Y, de-Bashan L (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. *Advances Agron*. 108: 77–136.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE (2004) *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol*. 50: 521-557.
- Bashan Y, Puente ME, Rodriguez-Mendoza MN, Toledo G, Holguin G, Ferrera-Cerrato R, Pedrin S (1995) Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of Soil Types. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1938–1945.
- Bashan Y, Puente ME, Rodriguez-Mendoza MN, Toledo G, Holguin G, Ferrera-Cerrato R & Pedrin S (1995) Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1938-1945.
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberelins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul*. 24: 7–11.
- Baudoin E, Couillerot O, Spaepen S, Moëgne-Loccoz Y, Nazaret S (2010) Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. *J Appl Microbiol*. 108: 25–38.
- Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, Döbereiner J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174: 195–209.
- Bodelier PLE (2003) Interaction between oxygen- releasing roots and microbial processes in flooded soils and sediments. *Ecol Studies*. 168: 331- 362.
- Bottini R, Cassán F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65: 497–503.
- Breidenbach B, Pump J, Dumont MG (2016) Microbial Community Structure in the Rhizosphere of Rice Plants. *Front Microbiol*. 6: 1537.

- Brusamarello-Santos LCC, Pacheco F, Aljanabi SMM, Monteiro RA, Cruz LM, Baura VA, Pedrosa FO, Souza EM, Wassem R (2012) Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil*. 356: 113-125.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 488: 91-95.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Lorenvan Themaat E, Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol*. 64: 807–838.
- Cassán F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O (2009a) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol*. 45: 12–19.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V (2009b) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol*. 45: 28–35.
- Cassán F, Sgroy V, Perrig D, Masciarelli O, Luna V (2008) Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento. En: Cassán FD, García de Salamone IE (Eds). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. 4: 61-86.
- Cassán FD, Garcia de Salamone I (2008) *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant Interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires.
- Cassman K, Peng S, Olk DC, Ladha JK, Reichardt W, Dobermann A, Singh U (1998) Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. *Field Crop Res*. 56: 7-39.
- Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM (2013) Root-exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE*. 8(2) doi: 10.1371/journal.pone.0055731
- Cocking EC (2005) Intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *In vitro Cell Develop Biol Plant*. 41: 369-373.
- Cordeiro FA, Tadra-Sfeir MZ, Huergo LF, De Oliveira Pedrosa F, Monteiro RA, De Souza EM (2013) Proteomic analysis of *herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. *J of Proteome Res*. 12: 1142–1150.
- Costa P, Beneduzi A, Souza R, Schoenfeld R, Vargas LK, Passaglia LMP (2013) The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: guidelines for directed bacterial prospecting and testing. *Plant Soil*. 368: 267–280.
- Couillerot O, Bouffaud M-L, Baudoin E, Muller D, Caballero-Mellado J, Moënne-Loccoz Y (2010a) Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biol Biochem* 42: 2298–2305.
- Couillerot O, Poirier M-A, Prigent-Combaret C, Mavingui P, Caballero-Mellado J, Moënne-Loccoz Y. (2010b) Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere

- quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *J Appl Microbiol.* 109: 528–538.
- de Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2013) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil.* 366: 585–603.
- de Souza R, Meyer J, Schoenfeld R, Costa PB, Passaglia LMP (2015) Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Ann Microbiol.* 65: 951–964.
- De Souza V, Piro VC, Faoro H, Tadra-Sfeir MZ, Chicora VK, Guizelini D, Weiss V, Vialle RA, Monteiro RA, Steffens MBR, Marchaukoski JN, Pedrosa FO, Cruz LM, Chubatsu LS, Raittz RT (2013) Draft genome sequence of *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* IAM 15032, a strain isolated from well water. *Genome Announc.* 1: e00252-12.
- Deambrosi E (2003) El sistema de producción de arroz en Uruguay y su sustentabilidad. Publicado en el libro de la 3ra Conferencia Internacional de Arroz de Clima Templado. Punta del Este, Uruguay.
- Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol.* 62: 313–322.
- Devers M, Soulas G, Martin-Laurent F (2004) Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J Microbiol Meth.* 56: 3–15.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Diallo MD, Reinhold-Hurek B, Hurek T (2008) Evaluation of PCR primers for universal *nifH* gene targeting and for assessment of transcribed *nifH* pools in roots of *Oryza longistaminata* with and without low nitrogen input. *FEMS Microbiol ecol.* 65: 220-228.
- Díaz-Zorita M, Fernández CM (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur J Soil Biol.* 45: 3–11.
- Ding L and Yokota A (2004) Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 2223–2230.
- Dixon R & Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2: 621–631.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Okon Y, Vanderleyden J (2002) Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol Fertil Soils.* 36: 284–297.
- Döbereiner J (1992) Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. *Ci Cultura.* 44: 310–313

- Döbereiner J (1995) Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: K. Alef and P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London. 134–141.
- Dobritsa AP, Reddy MCS, Samadpour M (2010) Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttienne*, with the description of *H. huttienne* subsp. *huttienne* subsp. nov. and *H. huttienne* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1418–1426.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Drogue B, Dore H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2012) Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res Microbiol*. 163: 500–510.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol*. 67: 5285-5293.
- Estrada GA, Baldani VLD, de Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*. 369: 115–129.
- Faleiro AC, Pereira TP, Espindula E, Brod FCA, Arisi ACM (2013) Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. *Symbiosis*. 61: 125–133.
- FAO (2015) Alimentar a una creciente población mundial requiere invertir en las zonas rurales. (En línea) <http://www.fao.org/news/story/es/item/338222/icode/>
- Fernández F (1980) Crecimiento y etapas de desarrollo de la planta de arroz. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. 04SR-05.04.
- Ferrando L (2013) Factores que afectan la composición y la diversidad de la comunidad de bacterias endófitas en arroz (*Oryza sativa*). Tesis de Doctorado en Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Ferrando L, Fernández FA (2015) Strong shift in the diazotrophic endophytic bacterial community inhabiting rice (*Oryza sativa*) plants after flooding. *FEMS Microbiol Ecol*. doi: dx.doi.org/10.1093/femsec/fiv104
- Franquet BJM, Borràs PC (2004) *Varietades y mejoras del arroz (Oryza sativa, L.)*. Universitat Internacional de Catalunya. Escola Universitària de Ciències Experimentals i Tecnologia. Cap 1.
- Freitas ADS, Vieira CL, Santos CERS, Stamford NP, Lyra MCCP (2007) Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*. 66: 497–504.
- Gaby JC, Buckley DH (2012) A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase. *PLoS ONE*. 7: e42149.
- Gaby JC, Buckley DH (2014) A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. *Database-Oxford* 2014. bau001.
- Gans J, Wolinsky M, Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*. 309: 1387–1390.

- García de Salamone IE and Döbereiner J (1996) Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol Fert Soils* 21: 193–196.
- Giglio S, Monis PT, Saint CP (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucliec Acids Res.* 31: e136.
- Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012: 1-15.
- Gobbin D, Rezzonico F, Gessler C (2007) Quantification of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-153 in soil using a quantitative competitive PCR assay unaffected by variability in cell lysis and DNA-extraction efficiency. *Soil Biol Biochem.* 39: 1609–1619.
- Gonod LV, Martin-Laurent F, Chenu C (2006) 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 529–537.
- Gonzalez-Escalona N, Fey A, Höfle MG, Espejo RT, Guzman A (2006) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environ Microbiol.* 8: 658–666.
- Granada C, Costa PB, Lisboa BB, Vargas LK, Passaglia LMP (2014) Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. *Plant Soil.* 373:339–358.
- GRiSP (Global Rice Science Partnership). 2013. Rice almanac, 4th edition. IRRI. Los Baños. Philippines. p 283.
- Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytol*, 154: 131–145.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.* 43: 895–914.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463–471.
- Hartmann A, James EK, Frans J, Schwab S, Rothballer M, and Schmid M (2015) In Situ Localization and Strain-Specific Quantification of *Azospirillum* and Other Diazotrophic Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Using Antibodies and Molecular Probes. En: Cassán FD, Okon Y, Creus CM (Eds). *Handbook for Azospirillum*. Springer International Publishing. 45-64.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *P Natl Acad Sci USA.* 88: 7276–7280.
- Hsu SF, Buckley DH (2009) Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME Journal.* 3: 124-136
- Hungria M, Campo R, Souza E, Pedrosa F (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331: 413–425.
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piche Y (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 233–242.

Hurek T, Reinhold-Hurek B (2005) Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with graminaceous plants. En: Werner D, Newton WE (Eds). Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 173-198.

Isawa T, Yasuda M, Awazaki H, Minamisawa K, Shinozaki S, Nakashita H (2010) *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. Microbes Environ. 25: 58-61.

Islam MT, Deora A, Hashidoko Y, Rahman A, Ito T, Tahara S (2007) Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. Z Naturforsch. 62: 103–110

Islam MT, Hashidoko Y, Deora A, Ito T, Tahara S (2005) Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizosphere bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soil borne Peronosporomycetes. Appl Environ Microbiol 71: 3786–3796

Jäderlund L, Hellman M, Sundh I, Bailey MJ, Jansson JK (2008) Use of a novel nonantibiotic triple marker gene cassette to monitor high survival of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on winter wheat in the field. FEMS Microbiol Ecol. 63: 156–168.

James EK, Gyaneshwar P, Mathan PN, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PP, Olivares FL, Ladha JK (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Mol Plant Microbe Interact. 15: 894–906.

James EK, Olivares FL (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit Rev Plant Sci. 17: 77–119.

Jijón-Moreno S, Marcos-Jiménez C, Pedraza RO, Ramírez-Mata A, de Salamone IG, Fernández-Scavino A, Vásquez-Hernández CA, Soto-Urzúa L, Baca BE (2015) The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. Antonie van Leeuwenhoek. 107: 1501-17

Kaneko T, Minamisawa K, Isawa T et al (2010) Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. DNA Res 17: 37–50

Kanungo PK, Panda D, Adhya TK, Ramakrishnan B, Rajaramamohan Rao V (1997) Nitrogenase Activity and Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Rhizosphere of Rice Cultivars with Varying Absorption Efficiency. J Sci Food Agric. 73: 485-488

Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y (1985) Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can J Microbiol 31: 881–887.

Kirchhof G, Reis VM, Baldani JJ, Eckert B, Döbereiner J, Hartmann A (1997) Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. Plant Soil. 194: 45–55.

Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2012) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41: doi: 10.1093/nar/gks808

Kögel-Knabner I, Amelung W, Cao Z, Fiedler S, Frenzel P, Jahn R, Kalbitz K, Kölbl A, Schloter M (2010) Biogeochemistry of paddy soils. Geoderma. 157: 1-14.

Kolb S, Knief C, Stubner S, Conrad R (2003) Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. Appl Environ Microb. 69: 2423–2429.

- Lacava PT, Li WB, Araújo WL, Azevedo JL, Hartung JS (2006) Rapid specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. *J Microbiol Methods*. 65: 535–541.
- Ladha JK, Baraquio WL, Watanabe I (1982) Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with rice. *Can J Microbiol*. 28: 478–485
- Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vanderley J (2000) Indole-3-acetic acid: A reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol*. 8: 298–300.
- Leifson, E (1962) The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 12: 161–170.
- Leloup J, Loy A, Knab NJ, Borowski C, Wagner M, Jorgensen BB (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ Microbiol*. 9: 131–142.
- Lin SY, Shen FT, Young CC (2011) Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 99: 837–844.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 4: 357–362.
- Loaces I, Ferrando L, Fernández Scavino A (2011) Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microbiol Ecol*. 61: 606-618.
- Lueders T, Friedrich MW (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microb*. 69: 320–326.
- Mahaffee WF, Bauske EM, van Vuurde JWL, van der Wolf JM, van den Brink M, Kloepper JW (1997) Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the fate of a rhizobacterium. *Appl Environ Microbiol*. 63: 1617–1622.
- Malik KA, Mirza MS, Hassan U, Mehnaz S, Rasul G, Haurat J, Bally R, Normand P (2002) The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. En: Kennedy IR, Choudhury ATMA (Eds). *Rural Industries Research and Development Corporation*. Canberra. 73–83.
- Marschner P and Timonen S (2005) Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Appl Soil Ecol*. 28: 23–36.
- Martínez Romero E (2006) Dinitrogen-fixing prokaryotes. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Strackebrandt E (Eds). *The Prokaryotes*. Springer. NewYork. 2: 793-817.
- Martino MM (2008) Evaluación del efecto de inoculación con Bioprom Az39 y *Rhanelia* sp. EMA-83 en Maíz. Validación y Desarrollo de Tecnologías. Realizado para CALISTER SA. (En línea). http://www.calister.com.uy/wp-content/files_mf/1311185800Inoculante_Bioprom_Maiz.pdf

- Mascher F, Schnider-Keel U, Haas D, Défago G, Moëgne-Loccoz Y (2003) Persistence and cell culturability of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 under plough pan conditions in soil and influence of the anaerobic regulator gene *anr*. *Environ Microbiol.* 5: 103–115.
- Mavrodi OV, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM (2007) Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* Strains in the Plant Rhizosphere by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5531–5538.
- McKew BA, Coulon F, Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Smith CJ, Osborn AM, Timmis KN, McGenity TJ (2007) Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol.* 9: 1562–1571.
- Mirza M, Mehnaz S, Normand P, Prigent-Combaret C, Moëgne-Loccoz Y, Bally R, Malik K (2006) Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol Fertil Soils.* 43: 163–170.
- Mirza MS, Rasul G, Mehnaz S, Ladha JK, So RB, Ali S, Malik KA (2000) Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. En: Ladha, J. K., Reddy, P. M. (Eds). *The quest for nitrogen fixation in rice*. IRRI. Los Baños. Philippines. 191–204.
- Moëgne-Loccoz Y, Tichy H-V, O'Donnell A, Simon R, O'Gara F (2001) Impact of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent pseudomonads associated with the root of field-grown sugarbeet seedlings. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3418–3425.
- Monteiro RA, Balsanelli E, Tuleski T, Faoro H, Cruz LM, Wassem R, *et al* (2012b) Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. *FEMS microbiol ecol.* 80: 441-451.
- Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankievicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2012a) *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil.* 356: 175–196.
- Murty MG, Ladha JK (1988) Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil.* 108: 281–285
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA & Hunter N (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* 148: 257–266.
- Neretin LN, Schippers A, Pernthaler A, Hamann K, Amann R, Jorgensen BB (2003) Quantification of dissimilatory (bi)sulphite reductase gene expression in *Desulfobacterium autotrophicum* using real time PCR. *Environ Microbiol.* 5: 660–671.
- Nishizawa N (1995) Nutrient Absorption of the Rice Plant. En: Matsuo T (Ed) *Science of the Rice Plant. Physiology.* 2: 268-269.
- Njoloma J, Tanaka K, Shimizu T, Nishiguchi T, Zakria M, Akashi R & Akao S (2006) Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. *Biol Fert Soils.* 43: 137–143.
- Ofek M, Ruppel S, Waisel Y (2007) Differences between bacterial associations with two root types of *Vicia faba* L. *Plant Biosyst.* 141: 352–362
- Okon Y (1985) *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol* 3: 223–228

- Okon Y, and Itzigsohn R (1995) The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnol Advan.* 13: 415-424.
- Okon Y, Labandera GC, Lage M, Lage P (2015) Agronomic Applications of *Azospirillum* and Other PGPR. En: de Bruijn (Ed). *Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA. 921-932.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. *Biol Fertil Soils* 21: 197–200
- Olivares FL, James EK, Baldani JI, Döbereiner J (1997) Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.* 135: 723–737
- Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A (2009) Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur J of Soil Biol.* 45: 106–113.
- Olmos S (2007) Apunte de morfología, fenología, ecofisiología y mejoramiento genético del arroz. Publicaciones Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Argentina.
- Paolino G (2006) Diversidad de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno en ecosistemas arroceros. Tesis de Maestría en Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Pedraza RO, Bellone CH, Carrizo de Bellone S, Boa Sorte PMF, Teixeira KRS (2009) *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur J Soil Biol.* 45: 36–43.
- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wasseem R, Cruz LM *et al.* (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet* 7: e1002064.
- Penna A, Galluzzi L (2013) The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species. *Environ Scien Poll Res Int.* 20: 6851–6862.
- Peoples MB, Craswell ET (1992) Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil.* 141: 13-39
- Pereira e Silva MC, Schloter-Hai B, Schloter M, van Elsas JD, Salles JF (2013) Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils. *PLoS ONE.* 8: 1–15.
- Pereira TP, Do Amaral FP, Dall’Asta P, Brod FCA, Arisi, ACM (2014) Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. *Mol Biotechnol.* 56: 660-670.
- Perrig D, Boiero L, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75: 1143–1150.
- Pimentel JP, Olivares FL, Pitard R, Urquiaga S, Akiba F, Döbereiner J (1991) Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil.* 137: 61–65
- Pinheiro R de O, Boddey LH, James EK, Sprent JI, Boddey RM (2002) Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. *Plant Soil.* 246: 151–166.

- Poly F, Jocteur Monrozier L, Bally R (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol.* 152: 95–103
- Punschke K y Mayans M (2011) Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencias Uruguay.* 15: 19-26.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0
- Racine JS (2012) RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *Journal of Appl Econom* 27: 167-172.
- Rariz G (2012) Competencia entre *Azospirillum brasilense* y bacterias endófitas nativas de semilla de arroz (*Oryza sativa*). Tesina de Licenciatura en Bioquímica, Universidad de la República, Uruguay.
- Rariz G, Martínez A, Ferrando L, Menes RJ, Scavino FA (2013) Caracterización e interacciones entre bacterias con propiedades promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de arroz. *Revta Agron N O Argent.* 33: 13-24.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol.* 21: 541–554.
- Reis VM, Baldani VLD, Baldani JI (2015) Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum* spp. and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. En: Cassán FD, Okon Y, Creus CM (Eds). *Handbook for Azospirillum.* Springer International Publishing. 3-26.
- Rivera D, Revale S, Molina R, Gualpa J, Puente M, Maroniche G *et al* (2014) Complete genome sequence of the model rhizosphere strain *Azospirillum brasilense* Az39, successfully applied in agriculture. *Genome Announc.* 2: pii: e00683-14.
- Rodríguez Cáceres E, Di Ciocco A, César A, Carletti S (2008) 25 Editorial Años de investigación de *Azospirillum brasilense* Az39 en Argentina. En: Cassán F, Salamone I (Eds). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. 179–188.
- Roesch LFW, Camargo FAO, Bento FM, Triplett EW (2007). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil.* 302: 91-104.
- Rosado AS, Seldin L, Wolters AC, van Elsas JD (1996) Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 19: 153–164.
- Rosconi F, Davyt D, Martínez V, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Zane H, Butler A, Souza EM, Fabiano E (2013) Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ Microbiol.* 15: 916–927.
- Rothballer M, Eckert B, Schmid M, Fekete A, Schloter M, Lehner A, Pollmann S, Hartmann A (2008) Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiol Ecol.* 66: 85–95.
- Rothballer M, Schmid M, Hartmann A (2003) *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis.* 34: 261–279.
- Ruppel S, Rühlmann J, Merbach W. 2006. Quantification and Localization of Bacteria in Plant Tissues Using Quantitative Real-Time PCR and Online Emission Fingerprinting. *Plant Soil.* 286: 21–35.

- Sánchez AC, Gutiérrez RT, Santana RC, Urrutia AR, Fauvart M, Michiels J, Vanderleyden J (2014) Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *Eur J Soil Biol.* 62: 105–112.
- Sant'Anna FH, Almeida LGP, Cecagno R, Reolon LA, Siqueira FM, Machado MRS, Vasconcelos ATR, Schrank IS (2011) Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics.* 12(1): 409
- Schulz B, Boyle C, Sieber T (2006) *Soil biology.* vol. 9. Springer. Berlin, Germany.
- Schulz B (2006) Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes. En: Schulz B, Boyle C, Sieber TN (Eds) *Microbial Root Endophytes.* Soil Biol. Springer. Berlin. 9: 261–279.
- Shime-Hattori A, Kobayashi S, Ikeda S, Asano R, Shime H, Shinano, T (2011) A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *J Appl Microbiol.* 111(4): 915–924.
- Shukla KP, Sharma S, Singh NK, Singh V, Tiwari K, Singh S (2011) Nature and role of root exudates: efficacy in bioremediation. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 9717–9724.
- Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, Osborn AM (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microb.* 73: 3612–3622.
- Sørensen J, Haubjerg NM, Ron E, Simonet P (2009) Molecular tools in rhizosphere microbiology from single-cell to whole-community analysis. *Plant Soil.* 321: 483–512.
- Sourjik V, Wingreen NS (2012) Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 24:262–268
- Stets MI, Alqueres SMC, Souza EM, Pedrosa FDO, Schmid M, Hartmann A, Cruz LM (2015) Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol.* 81:6700–6709.
- Stets MI, Pinto AS Jr, Huergo LF, de Souza EM, Guimarães VF, Alves AC, Steffens MBR, Monteiro RA, Pedrosa F de O, Cruz LM (2013) Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *J Biotechnol.* 165:167–174.
- Steunou AS, Bhaya D, Bateson MM, Melendrez MC, Ward DM, Brecht E, Peters JW, Kühl M, Grossman AR (2006) *In situ* analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 2398–2403.
- Sturz AV, Christie BR, Nowak S (2000) Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci.* 19: 1-30.
- Suslow TV (1982) Role of root-colonizing bacteria in plant growth. En: Mount MS, Lacy GH (Eds) *Phytopathogenic prokaryotes.* Academic. New York. 1: 186–223.
- Takai K & Horikoshi K (2000) Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microb.* 66: 5066–5072.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Tan ZQ, Men R, Zhang RY, Huang Z (2010) First report of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* causing mottled stripe disease on sugarcane in China. *Plant Dis.* 94:379

- Tanaka AS, Navasero A, García CV, Parao FI, Ramírez E (1964) Growth habit of the rice plant in the tropics and its effects on nitrogen response. *IRRI. Tech Bull.* 3: 67-80
- Ting ASY, Mah SW, Tee CS (2011) Detection of potential volatile inhibitory compounds produced by endobacteria with biocontrol properties towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *World J Microbiol Biotechnol.* 27:229–235.
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amorelated proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol.* 7: 1985–1995.
- Tripathi AK, Klingmueller W (1992) Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. *Can J Microbiol.* 38: 1238-1241.
- Turner T, James E, Pool P (2014) The Plant Microbiome. *Genome Biol.* 14(6): 209.
- Uruguay XXI (2013) Sector Arrocerero, Diciembre 2013. (En línea) <http://www.uruguayxxi.gub.uy> [Consulta: Noviembre de 2015].
- Uruguay XXI (2015) Información de comercio exterior. Exportaciones e importaciones de Uruguay, Octubre 2015. (En línea) <http://www.uruguayxxi.gub.uy>.
- Uruguay XXI (2015) Sector Arrocerero, Febrero 2015. (En línea) <http://www.uruguayxxi.gub.uy>.
- USDA (2012) World Rice Trade. Foreign Agricultural Service/USDA 2015 Office of Global Analysis (En línea) <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome> [Consulta: Octubre de 2015].
- Valdameri G, Kokot TB, Pedrosa F de O, de Souza EM (2015) Rapid quantification of rice root-associated bacteria by flow cytometry. *Lett Appl Microbiol*, 60(3): 237–241.
- Vargas L, de Carvalho TLG, Ferreira PCG, Baldani VLD, Baldani JI, Hemerly AS (2012) Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant Soil.* 356:127-137.
- Viebahn M, Glandorf, DCM, Ouwens, TWM, Smit E, Leeflang P, Wernars K, Thomashow L.S, van Loon LC et al. (2003) Repeated introduction of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat. *Appl Environ Microbiol.* 69: 3110–3118.
- Von Felten A, Défago G, Maurhofer M (2010) Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain- specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *J Microbiol Methods* 81, 108e115.
- Wagh J, Bhandari P, Shah S (2014) Overexpression of citrate operon in *Herbaspirillum seropedicae* Z67 enhances organic acid secretion, mineral phosphate solubilization and growth promotion of *Oryza sativa*. *Plant Soil.* 383(1): 73-86.
- Weber OB, Muniz CR, Vitor AO, Freire FC, Oliveira VM (2007) Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* on plantlets of banana “Maca”. *Plant Soil.* 298:47–56.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* 22: 130–138.
- Yoshida S (1981) Climatic Environment and its influence. En: *Fundamentals Rice Crop Science*. IRRI. Los Baños. Philippines. 65-110.
- Young JPW (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (Eds.) *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall New York, London. 43-86.

Yousuf B, Kumar R, Mishra A, Jha B (2014). Differential distribution and abundance of diazotrophic bacterial communities across different soil niches using a gene-targeted clone library approach. *FEMS Microbiol Lett.* 360(2): 117–125.

Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross- system comparison. *Environ Microbiol.* 5: 539–554.

Zhu F, Massana R, Not F, Marie D, Vaulot D (2005) Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiol Ecol.* 52: 79–92.