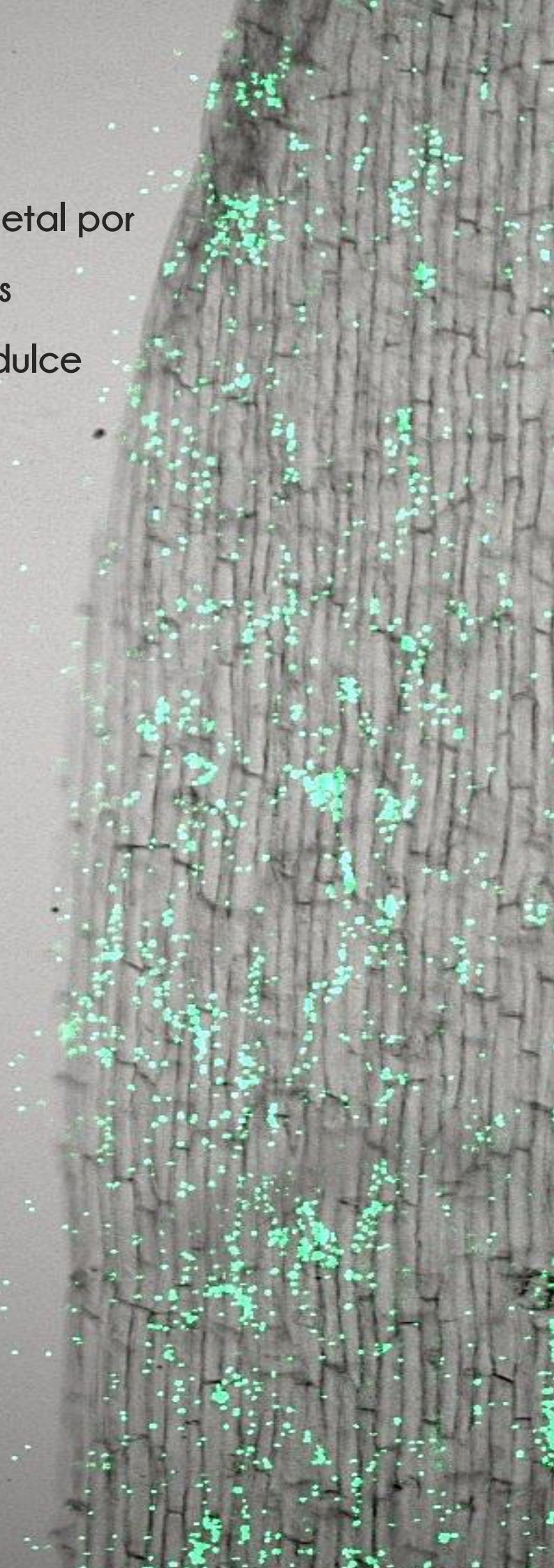




Promoción del crecimiento vegetal por bacterias endófitas diazótrofes asociadas a planta de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

Tesis de Posgrado – Maestría

PEDECIBA Biología | Subárea Microbiología

Lic. Gabriela Heijo Davino

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Federico Battistoni

TRIBUNAL

Dra. Inés Ponce de León (Presidenta)

Dra. María Inés Siri

Dr. Gastón Azziz

Universidad de la República

2019 | Montevideo, Uruguay



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Promoción del crecimiento vegetal por bacterias endófitas diazótrofes asociadas a planta de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

Tesis de Posgrado – Maestría

PEDECIBA Biología | Subárea Microbiología

Lic. Gabriela Heijo Davino

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Federico Battistoni

TRIBUNAL

Dra. Inés Ponce de León (Presidenta)

Dra. María Inés Siri

Dr. Gastón Azziz

Universidad de la Republica

2019 | Montevideo, Uruguay

A mi familia. A mis amigxs.

Por la paciencia y la motivación. Por el recorrido juntxs.



RESUMEN

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es un cultivo multipropósito, adaptado a características de los suelos de Uruguay y sus condiciones climáticas. Se destaca por poseer un elevado porcentaje de azúcares fermentables en sus tallos, razón por la cual es una de las principales materias primas empleadas para la producción de bioetanol en nuestro país. Sin embargo, para optimizar su rendimiento, son aplicadas elevadas concentraciones de fertilizantes químicos inorgánicos, lo cual genera grandes costos económicos y efectos ambientales adversos. Esta problemática hace necesaria la búsqueda de estrategias de producción sustentables que logren reducir la dependencia de esta fertilización. Una tecnología amigable con el ambiente es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PCV) como biofertilizantes.

El presente trabajo tuvo como objetivo aportar conocimiento para el desarrollo de un bioinoculante para el cultivo de sorgo dulce, basado en bacterias PCV diazótrofes. Las cepas bacterianas estudiadas pertenecen a una colección de aislamientos asociados a tejidos de plantas de sorgo dulce cv. M81E. Mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA), se determinó que 7 de los 8 aislamientos estudiados son diazótrofes. A partir de los ensayos en donde se evaluó el efecto de la inoculación en condiciones *gnotobióticas*, se comprobó que 5 aislamientos promueven el crecimiento en la cv. M81E. De este conjunto de aislamientos se demostró en ensayos de invernáculo, que las cepas *Kosakonia* sp. UYSB89, *Bacillus* sp. UYSB119 y *Kosakonia* sp. UYSB139 promovieron el crecimiento de las cv. M81E y ADV2010. Por otra parte, se demostró que cuando se inocula la cv. ADV2010 con las cepas UYSB89 y UYSB139, en condiciones de invernáculo, es posible reducir a la mitad la dosis de fertilizante químico nitrogenado sin comprometer la productividad del cultivo. Finalmente, se logró describir un modelo de infección y colonización de las plantas de sorgo dulce cv. M81E, por las cepas *Kosakonia* sp. UYSB89, *Bacillus* sp. UYSB119 y *Kosakonia* sp. UYSB139, determinando su condición endofítica.

En términos generales, este trabajo generó aportes valiosos en el estudio de bacterias PCV endófitas nativas asociadas a este cultivo, los cuales son un insumo fundamental para el posible desarrollo de un inoculante basado en estas cepas.

ÍNDICE

1.1 BACTERIAS ENDÓFITAS.....	14
1.1.1. Mecanismo de colonización endófito de la planta.....	16
Acercamiento y adhesión a la raíz.....	17
Colonización de la superficie radicular.....	18
Infección y colonización de los tejidos internos.....	18
1.2 MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	19
1.2.1. Control biológico e inducción de la respuesta sistémica	20
1.2.2. Fitoestimulantes.....	21
Auxinas	21
Etileno	21
1.2.3. Biofertilización.....	22
Solubilización de fosfatos.....	22
Producción de sideróforos	22
Fijación biológica del nitrógeno	23
1.3. SORGO DULCE.....	26
1.3.1. Origen y morfología.....	26
1.3.2. Usos y cultivo	27
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1. CEPAS BACTERIANAS Y SEMILLAS.....	34
2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA DE LOS AISLAMIENTOS PCV.....	36
2.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO	37
2.2.2. Ensayo de reducción de acetileno (ARA)	38
2.2.3. Cuantificación de proteínas	40
2.3 ENSAYOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE PLANTAS DE SORGO DULCE	41
2.3.1. Ensayo de PCV en condiciones <i>gnotobióticas</i>	42
2.3.2. Ensayo de PCV en condiciones de invernáculo	43

2.3.3. Ensayo de PCV en condiciones de invernáculo en presencia de diferentes dosis de fertilización química nitrogenada	45
2.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PLANTAS DE SORGO DULCE (CV. M81E) Y CEPAS PCV	46
2.4.1. Transformación de las cepas en estudio	46
Preparación de células termocompetentes de la cepa <i>E.coli</i> S17.1.....	47
Purificación del plásmido pHC60.....	47
Transformación de las células competentes de la cepa <i>E.Coli</i> S17-1 con el plásmido pHC60	48
Estudio de las resistencias de las cepas a antibióticos.....	49
Conjugación de las cepas de interés con la cepa <i>E.Coli</i> S17-1/ pHC60	49
2.4.2. Verificación de la eficacia del procedimiento de CONJUGACIÓN.....	50
Verificación de la incorporación del plásmido en las cepas de interés.....	50
Estudio de la identidad de las cepas conjugadas	51
2.4.3. Inoculación y crecimiento de plántulas de sorgo dulce de la cultivar M81E con las cepas transformantes.....	52
2.4.4. Recuentos bacterianos de tejido radicular	53
2.4.5. Procesamiento del material vegetal para estudios de microscopía confocal de fluorescencia	53
3. RESULTADOS.....	55
3.1. ENSAYOS DE PCV DE SORGO DULCE EN CONDICIONES GNOTOBIÓTICAS	56
3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA DE AISLAMIENTOS SELECCIONADOS	59
3.3. ENSAYOS DE PCV DE SORGO DULCE EN CONDICIONES DE INVERNÁCULO	60
Cultivar M81E.....	61
Cultivar ADV2010	62
3.4. ENSAYOS DE PCV DE SORGO DULCE EN CONDICIONES DE INVERNÁCULO EN PRESENCIA DE DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITROGENADA.....	64
Cultivar M81E.....	65
Cultivar ADV2010	69
3.4. COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE PLANTAS DE SORGO DULCE (CV. M81E) POR LA CEPAS <i>KOSAKONIA SP.</i> UYSB89, <i>BACILLUS SP.</i> UYSB119 Y <i>KOSAKONIA SP.</i> UYSB139 .	74
3.4.1. conjugación de las cepas con el plásmido pHC60.....	75
3.4.2. Recuentos de bacterias UYSB89, UYSB119 y UYSB139 en el tejido radicular de plantas inoculadas	76
3.4.3. Análisis de micrografías de florescencias de plantas inoculadas.....	76

Cepa <i>Kosakonia</i> sp. UYSB139	77
Cepa <i>Bacillus</i> sp. UYSB119	79
Cepa <i>Kosakonia</i> sp. UYSB89	81
3.4.3.3. Control negativo.....	83
4. DISCUSIÓN	84
4.1. DIAZOTROFÍA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ASOCIADOS A PLANTAS DE SORGO DULCE	85
4.2. BACTERIAS DIAZÓTROFAS PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL DE CULTIVARES DE SORGO DULCE	87
4.3 LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITROGENADA AFECTA LA PCV DE LAS BACTERIAS DIAZÓTROFAS	91
4.3.1 Cultivar M81E.....	92
4.3.2 cultivar ADV2010.....	93
4.4. LAS CEPAS KOSAKONIA RADICINCITANS SP UYSB89, BACILLUS TOYONESIS SP. UYSB119 Y KOSAKONIA COWANII SP. UYSB139 SON ENDÓFITOS VERDADEROS.	95
4.4.1. Colonización de la superficie radicular.....	96
4.4.2. Infección y colonización de los tejidos internos.....	97
4.4.3. Colonización del tejido vascular.....	97
6. PERSPECTIVAS.....	101
AGRADECIMIENTOS.....	104
7. ANEXO.....	105
BIBLIOGRAFÍA	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la distribución bacteriana y los patrones de colonización de la raíz de una planta.....	17
Figura 2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por parte de bacterias endófitas.....	20
Figura 3. Reacción de reducción del nitrógeno atmosférico a NH_3 catalizada por el complejo enzimático nitrógenoasa.....	24
Figura 4. Esquema del complejo enzimático nitrógenoasa.....	25
Figura 5. Sorgo dulce (<i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench).....	27
Figura 6. Estrategia experimental del ensayo ARA.....	39
Figura 7. Estrategia experimental del ensayo de PCV en condiciones <i>gnotobióticas</i>	43
Figura 8. Estrategia experimental del ensayo de PCV en condiciones de invernáculo.....	44
Figura 9. Estrategia experimental abordada para la visualización de la interacción plata-bacteria mediante microscopía confocal de fluorescencia.....	46
Figura 10. Mapa físico del plásmido pH60.....	48
Figura 11. Ensayos de PCV en condiciones <i>gnotobióticas</i> empleando la cultivar de sorgo dulce M81E.....	57
Figura 12. Fotografías de los ensayos <i>gnotobióticos</i>	58
Figura 13. Ensayos de PCV en condiciones de invernáculo empleando la cultivar de sorgo dulce M81E.....	61
Figura 14. Fotografía de ensayos PCV en condiciones de invernáculo en la cultivar M81E. Período: octubre 2017 a febrero 2018.....	62
Figura 15. Ensayos de PCV en condiciones de invernáculo empleando la cultivar de sorgo dulce ADV2010. Período: octubre 2017 a febrero 2018.....	63
Figura 16. Fotografías del ensayo de PCV en condiciones de invernáculo en la cultivar ADV2010. Período: octubre 2017 a febrero 2018.....	64
Figura 17. Ensayos de PCV de la cepa UYSB89 en plantas de sorgo dulce cultivar M81E crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: octubre 2017 a febrero 2018.....	67
Figura 18. Ensayos de PCV de la cepa UYSB139 en sorgo dulce cultivar M81E crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: octubre 2017 a febrero 2018.....	68

Figura 19. Fotografías del ensayo de evaluación conjunta de la respuesta de plantas de sorgo dulce (cv. M81E) a la inoculación bacteriana y diferentes niveles de fertilización química nitrogenada. Período: octubre 2017 a febrero 2018.....	69
Figura 20. Ensayos de PCV de la cepa UYSB89 en sorgo dulce cultivar ADV2010 crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: setiembre 2018 a enero 2019.....	72
Figura 21. Ensayos de PCV de la cepa UYSB139 en sorgo dulce cultivar ADV2010 crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: setiembre 2018 a enero 2019.....	73
Figura 22. Fotografías del ensayo de evaluación conjunta de la respuesta de plantas de sorgo dulce (cv. ADV2010) a la inoculación bacteriana y diferentes niveles de fertilización química nitrogenada. Período: setiembre 2018 a enero 2019.....	74
Figura 23. Colonización e infección de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, inoculadas con la cepa UYSB139.....	78
Figura 24. Colonización e infección de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, inoculadas con la cepa UYSB119.....	80
Figura 25. Colonización e infección de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, inoculadas con la cepa UYSB89.....	82
Figura 26. Imágenes del tejido radicular de plantas de sorgo dulce cultivar M81E sin inocular obtenidas mediante un MCF.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de los aislamientos utilizados en esta tesis.....	34
Tabla 2. Aislamientos seleccionados para el estudio de su actividad nitrogenasa.....	36
Tabla 3. Condiciones de cultivo ensayadas para la FBN de las cepas estudiadas.....	37
Tabla 4. Condiciones configuradas en el cromatógrafo GC-FID para la técnica ARA.....	40
Tabla 5. Puesta a punto del sistema para la realización de los ensayos PCV de plantas de sorgo dulce en condiciones <i>gnotobióticas</i>	42
Tabla 6. Condiciones de crecimiento y de actividad nitrogenasa óptimas, determinadas para cada cepa en estudio.....	59
Tabla 7. Respuesta de plantas de sorgo dulce cultivar M81E a las diferentes dosis de urea aplicada.....	65
Tabla 8. Análisis de contrastes de grupos para estudiar el efecto combinado de la inoculación y la aplicación de urea sobre la altura de plantas de sorgo dulce cultivar M81E.....	66
Tabla 9. Respuesta de plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010 a las diferentes dosis de urea aplicada.....	70
Tabla 10. Análisis de contrastes de grupos para estudiar el efecto de la interacción de la inoculación y la aplicación de urea sobre plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010.....	71
Tabla 11. Resistencia/sensibilidad de las cepas a diferentes antibióticos.....	75

ABREVIATURAS

BPCV Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

PCV Promoción del crecimiento vegetal

FBN Fijación biológica del nitrógeno

ARA Actividad reductora del acetileno

MCF Microscopio confocal de fluorescencia

GFP Proteína verde fluorescente



1. INTRODUCCIÓN

1.1 BACTERIAS ENDÓFITAS

Para un gran grupo de microorganismos, las plantas representan un hábitat ecológico complejo que ofrece diversidad espacial y admite una amplia variedad de interacciones específicas. Dichas interacciones surgen como resultado de una larga historia co-evolutiva, que ha ido moldeándose para conformar un lenguaje molecular entre planta y bacteria que permite el intercambio de respuestas coordinadas. Según el sitio en donde habita la bacteria es posible clasificarlas en bacterias de vida libre, asociadas (habitando la rizósfera, el rizoplaneo o la filósfera de la planta), o que habitan el interior de la planta (incluyendo a las endófitas, patógenas y rizóbios) (84).

Las **bacterias endófitas** son un subgrupo de la comunidad rizobacteriana capaces de colonizar los tejidos internos de las raíces, tallos y hojas de la planta (habitando los espacios intercelulares), e interactuar con ella de forma sinérgica (69, 120). Por un lado, la planta se beneficia ya que ciertos endófitos intervienen su desarrollo fisiológico, pudiendo acelerar la emergencia de las semillas, promover el crecimiento bajo condiciones adversas, prevenir el desarrollo de enfermedades mediante la síntesis de metabolitos particulares, así como proporcionar resistencia a metales pesados (13, 33, 138). Además, pueden actuar como agentes de biocontrol ya que colonizan nichos similares a los de los patógenos (131). Por otro parte, para los endófitos, el ambiente del interior de la planta es más favorable que el ambiente rizosférico, ya que cuentan con disponibilidad de nutrientes, son menos vulnerables a la competencia con otras bacterias, están protegidos de los distintos factores de estrés abióticos (temperatura, radiación ultravioleta, potenciales ósmicos), y se aseguran su dispersión por transferencia en forma pasiva (104, 121). La relación del endófito con la planta puede ser obligatoria o facultativa. Los endófitos obligados dependen del huésped para su crecimiento, supervivencia y dispersión, mientras que los facultativos pueden habitar la planta u otro ambiente, en distintos momentos de su vida (71).

La comunidad bacteriana que habita dentro de la planta presenta una estructura dinámica que se encuentra influenciada por factores bióticos y abióticos. En primer

lugar, la rizósfera determina las condiciones fisicoquímicas y biológicas que favorecen el crecimiento y la reproducción de algunos grupos bacterianos del suelo, al tiempo que suprimen otros (50). De ese conjunto de grupos bacterianos pre-seleccionados, la planta realiza otra selección determinando la composición y distribución de la comunidad endofítica que la habitará (69). Es por esto que la microbiota en la endosfera de la raíz es significativamente menos diversa que la microbiota de la rizósfera y que la del suelo (89). Por otra parte, se ha reportado que el número de endófitos es de 10^4 – 10^8 células.g⁻¹ de tejido vegetal, lo cual es considerablemente menor al número de células bacterianas que se pueden encontrar en el suelo (10^6 – 10^9 células.g⁻¹ suelo) o en la rizósfera (10^6 – 10^9 células.g⁻¹ tejido vegetal) (26). Esto sugiere que efectivamente las raíces establecen un filtro que restringe la composición de la comunidad bacteriana (25). Las comunidades endofíticas son típicamente dominadas por Proteobacterias (~50% abundancia relativa), Actinobacteria (~10%), Firmicutes (~10%) y Bacteroidetes (~10%). También es posible encontrar en menor proporción otros filos bacterianos, tales como Chloroflexi, Cyanobacteria, Armatimonadetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes y Nitrospirae (137, 50). Las Archaea, Acidobacteria y Gemmatimonadetes están frecuentemente ausentes o en proporción casi nula (<1%) en las raíces, a pesar de ser representantes significativas en las comunidades microbianas del suelo (11, 137).

Por otra parte, la distribución de los endófitos no es uniforme en toda la planta, depende de la complejidad morfológica de cada tejido/órgano, existiendo diversos subnichos dentro de la planta. Si bien se han encontrado endófitos en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas, se ha visto que la mayor diversidad y densidad de bacterias endofíticas se encuentra en la raíz (131). La especificidad de la bacteria por determinado huésped y/o tejido está dada por una adaptación evolutiva, se puede clasificar en ubicuas (bacterias que crecen en cualquier hospedero o tejido), específicas (solo crecen en un determinado hospedero o tejido), o flexibles (presentan preferencia por algunos hospederos o tejidos) (136).

Para comprobar el estilo de vida endófito de una bacteria que fue aislada a partir de tejidos de plantas con su superficie desinfectada, fue definido un criterio con fines prácticos. El mismo consiste en constatar la presencia de la bacteria dentro del tejido de la planta re-inoculada mediante microscopía (121). Esta búsqueda implica la

identificación de las bacterias en el tejido mediante hibridación inmunológica *in situ* o mediante marcaje con genes reporteros. Además, la bacteria aislada debe cumplir los postulados de Koch, ser capaz de reinfectar al huésped y persistir en él (127, 121). Las técnicas de visualización microscópica, junto con técnicas de caracterización de mutantes, también sirven para definir y estudiar los procesos de colonización de la planta (136).

1.1.1. MECANISMO DE COLONIZACIÓN ENDÓFITA DE LA PLANTA

El proceso de **colonización activa** implica que la bacteria en el suelo reconozca a la planta mediante señales moleculares y se dirija hacia la raíz para adherirse a la superficie vegetal, colonizando primariamente el rizoplaneo y finalmente penetrando el tejido en donde se multiplicará, pudiendo dispersarse a través de los tejidos vasculares (97). Otra posible vía de **colonización** de hospederos es mediante mecanismos **pasivos**, como lo es la propagación vertical a través de semilla, yemas vegetativas o el uso de hongos como vectores (127) (Figura 1).

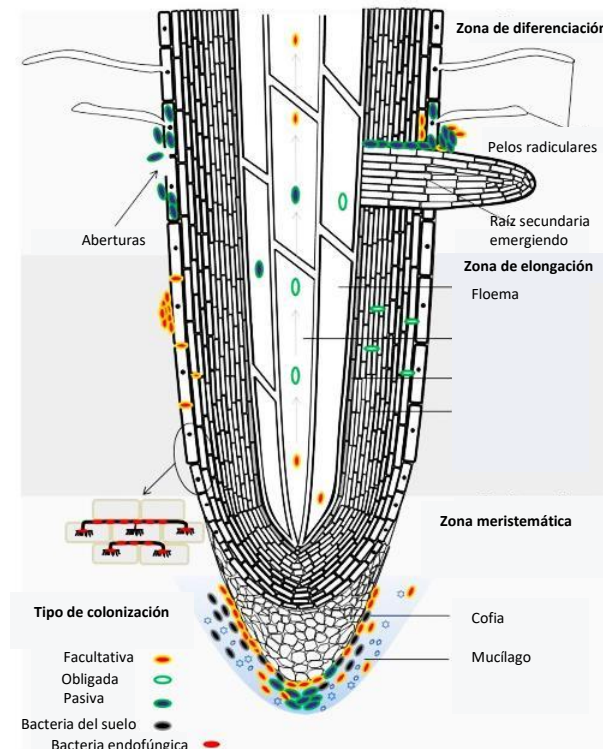


Figura 1. Representación de la distribución bacteriana en la raíz de una planta. Los sitios emergentes de raíces laterales, la cofia y las heridas en la superficie de la raíz son los principales puntos críticos de la colonización bacteriana. Los óvalos de diferentes colores muestran los distintos estilos de vida de las bacterias endófitas. Naranja, endófito facultativo; borde celeste, endófito obligado; azul, endófito pasivo; negro, bacteria del suelo; ovalo rosa, bacteria asociadas a hongos. Adaptado de Liu et al., 2017 (89).

Acercamiento y adhesión a la raíz

El mecanismo de **acercamiento activo** está impulsado por la atracción quimiotáctica que las bacterias tienen por los tejidos de la planta. La atracción es generada por los exudados radiculares, los cuales representan una fuente nutricional para la bacteria (93). La composición exacta de los exudados varía según el tipo de cultivo, el estado fisiológico, la composición del suelo y el estrés al que está sometida la planta (65, 128). La composición también dependerá de la microbiota presente en la rizósfera, ya que las plantas son capaces de reconocer a los microorganismos que le son benéficos o patógenos y responder acorde, produciendo determinados compuestos que modulan la comunicación (6, 66). Los quimioatrayentes más comunes que se pueden

encontrar son los ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos exudados por la planta (7, 71, 162).

La bacteria responde desplazándose hacia la superficie radicular, generalmente mediante flagelos, y posteriormente estableciendo interacciones electrostáticas débiles con la pared celular vegetal (158). Diversos genes han sido reportados como los responsables de la respuesta de la bacteria a los exudados, incluyendo aquellos que codifican para los componentes aromáticos de catabolismo, la biosíntesis de aminoácidos, el sistema de secreción del tipo III y proteínas generadoras de energía (100).

Colonización de la superficie radicular

Luego de establecidas las interacciones débiles, las cuales son rápidas y reversibles, la bacteria se ancla definitivamente a las paredes de las células de la planta mediante interacciones específicas irreversibles. Estas interacciones involucran la participación de fimbrias, pilis, lipopolisacáridos, exopolisacáridos y proteínas de membrana externa, como porinas y la proteína mayor de membrana (27, 49, 103, 150). El desarrollo de una población bacteriana sobre la pared celular representa una ventaja para la bacteria, ya que aumenta su probabilidad de supervivencia y eventualmente de ingresar a los tejidos internos. La disposición de las bacterias puede ser en forma de agregados y/o formando películas bacterianas (biopelículas), en donde se favorece la transferencia horizontal de genes e intercambio de señales de quorum sensing (2).

Infección y colonización de los tejidos internos

Los endófitos que infectan plantas tienen que ser colonizadores competitivos y posicionarse estratégicamente en los sitios de potencial ingreso a la raíz (121). Para ingresar a la planta, existen dos tipos de mecanismos: activos o pasivos. La mayoría de las veces el **ingreso** a los tejidos de la planta es **pasivo**, ya que las bacterias aprovechan las aberturas naturales, tales como los estomas, lenticelas, tricomas y sitios de emergencia de las raíces laterales o las heridas generadas por microorganismos patógenos (121). El **ingreso activo** puede darse en zonas donde el tejido está diferenciándose y elongando, por ejemplo la cofia de la raíz. Para penetrar el tejido las

bacterias utilizan vectores tales como los insectos o secretan enzimas degradadoras de la pared celular tales como proteasas, celulasas, hemicelulasas y enzimas lignolíticas (40, 41, 71, 77, 106, 121, 122). Dichas enzimas son las mismas que utilizan las bacterias patógenas, sin embargo, los endófitos no inducen la respuesta de hipersensibilidad de la plantas ya que ocurren a densidades poblacionales bajas y es por ello que la planta no rechaza su ingreso (69). Una vez dentro de los tejidos radiculares, algunas bacterias logran colonizar el sistema vascular de la planta donde pueden dispersarse a los demás órganos, pudiendo alcanzar tallos, hojas, frutos y semillas (41, 71).

1.2 MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Ciertas bacterias son capaces de promover el crecimiento vegetal (PCV) mediante una diversidad de mecanismos e interacciones con la planta. Cuanto más íntima sea la relación, las interacciones serán más complejas, traduciéndose en mayores beneficios para ambas partes. La interacción más específica es la simbiosis, seguida por los endófitos obligados, luego los facultativos y finalmente las bacterias de vida libre que habitan el rizoplano o la rizósfera (54, 84).

Los mecanismos por los cuales las bacterias promueven el crecimiento vegetal son comúnmente clasificados en directos e indirectos (Figura 2). **Los mecanismos directos** comprenden aquellos que regulan el crecimiento vegetal actuando como fitoestimulantes, ya que producen o regulan hormonas estimulantes del crecimiento vegetal, como lo son las auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno. También incluye aquellos mecanismos que operan como biofertilizantes, ya que incrementan el crecimiento de las plantas mediante el mejoramiento del ciclo de los nutrientes y minerales, movilizandolos que no se encuentran disponibles para la planta (fósforo, hierro, nitrógeno, etc.) (56). Por otra parte, los **mecanismos indirectos** comprenden aquellos que proveen protección a la planta contra factores bióticos (control biológico) o mediante la estimulación de la resistencia sistémica inducida de

las plantas (40, 94). Recientemente, diversos estudios han demostrado la efectividad de los endófitos en proteger a las plantas frente a diversas fuentes de estrés abiótico, incluyendo sequías (125, 140), bajas temperaturas, (147, 148) y estrés salino (1).

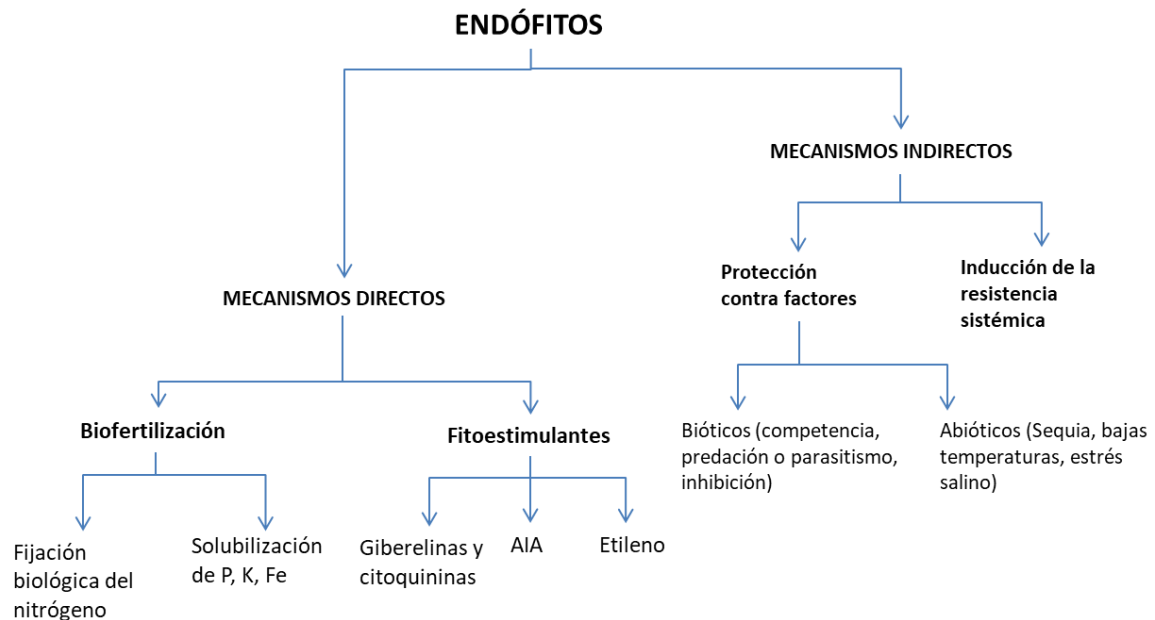


Figura 2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por parte de bacterias endófitas.

1.2.1. CONTROL BIOLÓGICO E INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SISTEMICA

El control biológico contra fitopatógenos se realiza mediante la competencia por el nicho (nutrientes, agua, luz, oxígeno); por predación o parasitismo del agente y/o por la producción de metabolitos secundarios tóxicos (antibióticos, bacteriocinas) que inhiben el crecimiento del patógeno (40).

Los microorganismos inductores de la respuesta sistémica, benefician a las plantas, ya que sin ocasionarles daños las «inmunizan» otorgándoles el potencial de movilizar sus defensas más rápida y efectivamente en presencia del patógeno (94).

1.2.2. FITOESTIMULANTES

Las hormonas de crecimiento vegetales (fitohormonas) son reguladoras del desarrollo vegetal. La planta depende de ellas para llevar a cabo sus procesos fisiológicos, participan en la regulación de procesos como la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, floración, la ramificación, macollaje, la maduración de los frutos y la resistencia de las plantas a factores ambientales (145). La producción de fitohormonas exógenas a la planta, es un mecanismo PCV de suma relevancia y es considerado posiblemente el mayor mecanismo promotor de crecimiento vegetal por bacterias endófitas (31).

Auxinas

Las auxinas participan en diversos procesos relacionados con el desarrollo de la planta, como lo son el crecimiento, la dominancia apical, el enraizamiento, la partenocarpia, el tropismo y la abscisión. El representante más característico y de mayor abundancia dentro de la familia de las auxinas es el ácido indolacético (AIA). Se estima que casi el 80% de las bacterias rizoféricas son capaces de sintetizar AIA (113). Las bacterias productoras de AIA pueden actuar incrementando el desarrollo de las raíces, permitiendo a la planta acceder a más nutrientes y agua del suelo, así como aumentar o influenciar los niveles endógenos de las auxinas de la planta (113). Se conocen seis vías de síntesis del AIA, las cinco más comunes son dependientes del triptófano secretado por la planta y una es independiente del mismo (144).

Etileno

La producción de etileno en plantas sucede durante la germinación, maduración de frutos, abscisión o senescencia de hojas y flores. Su producción también puede inducirse como respuesta a situaciones de estrés, tales como las condiciones ambientales o heridas mecánicas. Ciertas bacterias son capaces de modular la concentración de etileno al producir la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato

(ACC) desaminasa, la cual es encargada de hidrolizar el ACC, precursor inmediato del etileno, produciendo amonio y acetobutirato (59).

1.2.3. BIOFERTILIZACIÓN

Ciertas bacterias son referidas como biofertilizantes ya que poseen la capacidad de convertir los minerales del medio (fósforo, hierro, potasio, nitrógeno, etc.) a formas biodisponibles para las plantas, ayudando a su nutrición y crecimiento.

Solubilización de fosfatos

El fósforo es el tercer factor limitante para el crecimiento de las plantas, luego del agua y el nitrógeno (159). La mayoría de los suelos contiene cantidades de fosfatos suficientes para mantener a la planta en crecimiento. Sin embargo muchas de las formas en las que se encuentra no son biodisponibles para las plantas, las cuales únicamente logran absorber el fósforo como H_2PO_4^- y HPO_4^{--} (124). Determinadas bacterias son capaces de solubilizar el fosfato inorgánico o mineralizar el fosfato orgánico, volviéndolo así disponible para las plantas (88).

Producción de sideróforos

El hierro a pesar de encontrarse en abundancia en el suelo, es difícilmente soluble a pH neutro, por lo que no se encuentra disponible para todos los organismos. En condiciones limitantes de hierro, ciertas bacterias producen quelantes de bajo peso molecular altamente específicos para el ion férrico llamados sideróforos los cuales actúan quelando el Fe^{3+} para luego internalizarlo activamente. Asimismo, algunas especies de plantas pueden absorber los complejos Fe^{3+} -sideróforo bacterianos en la superficie de la raíz donde es reducido y absorbido (57). Otro rol de los sideróforos es actuar como competidores de hierro frente a otros microorganismos de la comunidad bacteriana, pudiendo actuar como agentes de biocontrol (86).

Fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno en las plantas, se encuentra formando parte de numerosas biomoléculas como las proteínas, los ácidos nucleicos, las porfirinas y los alcaloides, siendo así uno de los principales factores limitantes para su crecimiento. Las plantas son capaces de asimilar el nitrógeno presente en el suelo únicamente en forma de nitrato y amonio. Sin embargo, solamente el 2 % del nitrógeno total del suelo se encuentra en las formas biodisponibles por las plantas, de modo que la mayor parte del nitrógeno necesario para su crecimiento proviene de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) (54). La FBN es el proceso por el cual un grupo de microorganismos denominados diazótrofos, reducen el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+). En términos numéricos, el 60 % del N_2 total incorporado cada año al suelo se debe a la FBN, mientras que un 30 % se debe al proceso de Haber-Bosh y el restante 10 % proviene de procesos no biológicos realizados en la atmósfera (54).

El espectro de organismos diazótrofos es muy amplio, con representantes tanto en las arqueas (2 géneros) como en las bacterias (38 géneros) y las cianobacterias (20 géneros) (160). También son muy diversos sus hábitats y modos de vida. Particularmente con las plantas, han establecido diversos tipos de asociaciones simbióticas, lo que les ha permitido distribuirse ampliamente en la biósfera, ocupar diferentes nichos y adaptarse a diversas condiciones ambientales (4). En esta diversidad, se encuentran diferentes niveles de eficiencia en el proceso de FBN. El más específico y eficiente involucra la formación de nódulos en leguminosas, las bacterias involucradas en este proceso son los rizobios miembros de los subgrupos Alfa y Beta del filo Protobacteria. Bacterias del género *Frankia* también son capaces de establecer una asociación simbiótica con plantas no leguminosas, induciendo la formación de nódulos en las raíces pero con menor eficiencia que los rizobios. Estas actinobacterias diazotróficas son capaces de asociarse simbióticamente con ca. 200 especies diferentes de angiospermas en una relación benéfica para ambas partes (45).

Por otro lado, un gran grupo de bacterias endófitas diazótrofes se asocian a las raíces y demás órganos internos de las plantas, donde encuentran un hábitat propicio para realizar la FBN e intercambiar nutrientes con la planta. Algunos géneros que incluyen bacterias endófitas diazótrofes son *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*,

Paenibacillus, *Pseudomonas*, *Kosakonia* y *Stenotrophomonas* (45). Finalmente, se pueden encontrar diazótrofos de vida libre, los cuales ocupan nichos ecológicos muy diversos. Los mismos incluyen anaerobios estrictos (*Desulfovibrio*, *Clostridium*), anaerobios facultativos, que fijan solo en condiciones anaeróbicas (*Klebsiella*, *Citrobacter*) o microaeróbicas (*Azospirillum*, *Xanthobacter*) y aerobios estrictos (*Azotobacter*, *Beijerinckia*) (4).

La FBN es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual requiere para la reacción un donador de electrones y ATP (Figura 3). Por otra parte, requiere que la concentración de O₂ intracelular sea regulada, ya que la mayor parte de las nitrogenasas son inhibidas irreversiblemente por oxidación. En condiciones fisiológicas, los electrones son utilizados para reducir el N₂ a amonio y en menor cuantía H⁺ a H₂. Sin embargo la enzima no es completamente específica para el N₂, siendo capaz de utilizar otros sustratos con triples enlaces como cianuro, óxido nitroso o acetileno (108, 134)

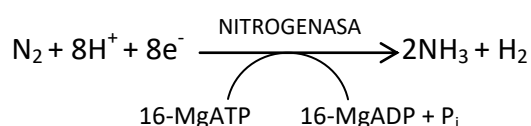


Figura 3. Reacción de reducción del nitrógeno atmosférico a NH₃ catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa.

El complejo nitrogenasa se encuentra altamente conservado tanto en los diazótrofos de vida libre como en los simbióticos. Si bien existen distintos tipos de nitrogenasas, la más abundante y ampliamente distribuida entre los organismos diazótrofos consta de dos ferrosulfoproteínas: la Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa), un dímero con estructura α₂ y masa molecular de 62 KDa, codificada por el gen *nifH*; y la FeMo-proteína (dinitrogenasa), un tetrámero con estructura α₂β₂ y masa molecular de 220 KDa, codificada por los genes *nifD* (subunidad α) y *nifK* (subunidad β) (116). La Fe-proteína enlaza el ATP-Mg y reduce específicamente la FeMo-proteína, mientras que la FeMo-proteína enlaza y reduce el sustrato (Figura 4). La FBN es regulada a nivel transcripcional y postraducciona mediante inactivación reversible. La disponibilidad de nitrógeno o la presencia de oxígeno, son moduladores del proceso (118).

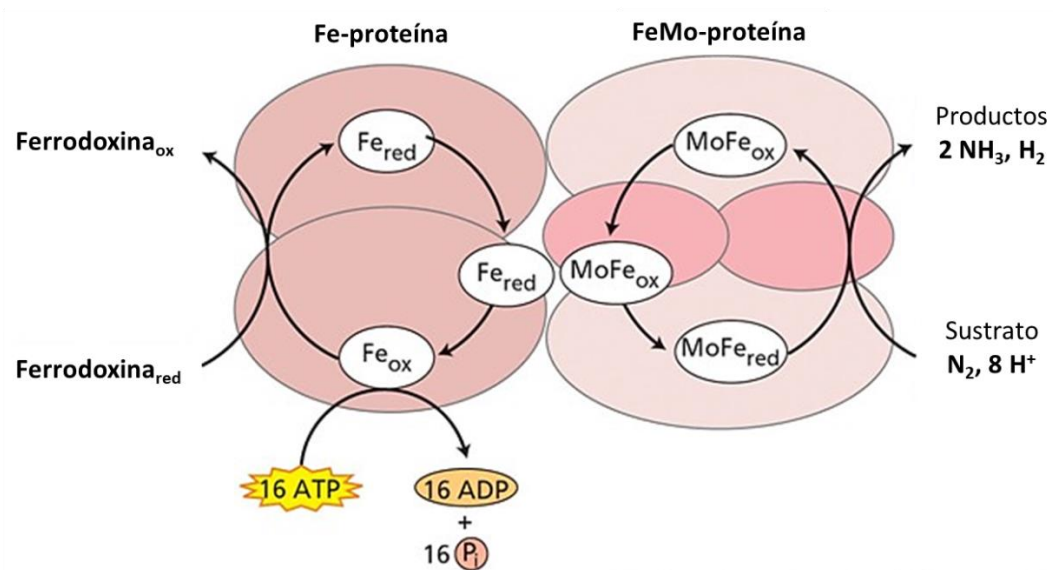


Figura 4. Esquema del complejo enzimático nitrogenasa. Adaptado de Taiz & Zeiger, 2002 (151).

La actividad FBN ha sido estudiada mediante una amplia cultivar de métodos. En organismos vivos se puede medir mediante análisis de Kjeldahl que permite determinar el N total (28), por enriquecimiento con N^{15} medido por espectrofotometría de masas (28), y por incorporación de N^{13} medio por conteo radiactivo (29, 112). En células puede ser medida por enriquecimiento de N^{15} , incorporación de N^{13} (29, 112), ensayo colorimétrico de NH_3 (44) y consumo de $\text{N}_2\text{-H}_2$ (110) entre otros. Estos métodos son relativamente insensibles, a excepción del método de N^{13} , el cual tiene como desventaja que su aplicación es muy limitada por su tiempo de vida corto (10 minutos). El método más sensible y eficiente es el de reducción de acetileno (ARA), el cual se basa en que la enzima nitrogenasa es capaz de catalizar la reducción de una cultivar de sustratos que contengan un triple enlace en su molécula, por ejemplo puede reducir acetileno a etileno. El método consiste en cuantificar la concentración de etileno como medida de la actividad nitrogenasa. La detección se realiza mediante cromatógrafo de gases con llama de hidrogeno. (73,74)

1.3. SORGO DULCE

1.3.1. ORIGEN Y MORFOLOGÍA

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L) Moench) pertenece a la familia *Poaceae*, tribu *Andropogonae*. Este cultivo es originario de las estepas y sabanas del África oriental, existie una gran diversidad de razas y cultivares (47) (Figura 5). Su morfología consiste en un formato tipo caña, con un tallo cilíndrico que puede alcanzar alturas desde 50 centímetros hasta 4,5 metros. Su tallo actúa como órgano de reserva de grandes concentraciones de azúcares y carbohidratos. Tiene un sistema radicular fibroso extenso y ramificado, que puede penetrar hasta 1,8 metros dentro del suelo. Las hojas se presentan en un número de entre 7 y 28 dispuestas en forma alternada y opuesta. Morfológicamente, las hojas son similares a las del maíz, siendo lineales, lanceoladas, con un borde con dientes curvos, filosos y numerosas células motoras ubicadas cerca de la nervadura central del haz. Los macollos se forman a partir de las yemas axilares localizándose generalmente en el extremo de la planta y siendo su maduración más tardía que la del tallo principal. La forma de las flores en la espiga es variable entre las razas. La planta se autopoliniza, ya que la espiga está compuesta por flores bisexuales. El grano es una cariósida esférica y oblonga, de color negro, rojizo y amarillento de alrededor de 4 mm de diámetro (3). Este cultivo posee un metabolismo C4 (ciclo del malato), lo cual significa que la temperatura, la intensidad lumínica y el fotoperíodo deben ser considerados como factores de control o limitantes, afectando tanto los rendimientos de tallos como el contenido de azúcares utilizables de los jugos.



Figura 5. Sorgho dulce (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **a.** Inflorescencia. **b.** Infrutescencia. **c.** Plantación de sorgo dulce.

1.3.2. USOS Y CULTIVO

El sorgo dulce representa un grano básico para millones de personas, es el quinto cultivo de mayor importancia en el mundo, luego del trigo, el arroz, el maíz y la cebada. Su ventaja radica en que se adapta a crecer en zonas con altas temperaturas, suelos pobres y requiere de poca agua, lo que lo hace ideal para crecer en tierras que no resultan aptas para muchos otros cultivos. Tiene usos muy variados y es por eso que se lo considera un cultivo multipropósito: el grano es usado como alimento humano y animal, la porción vegetativa para forraje y a partir de sus jugos se produce etanol carburante (60, 142).

Actualmente, es uno de los insumos energéticos más importantes para la producción de biocombustibles debido al elevado porcentaje de azúcares fermentables en su tallo (16-23%, similar a la caña de azúcar) (24). Para optimizar los rendimientos industriales, este cultivo suele ser incorporado en ciclos de rotación con otras materias primas para producción de bioetanol, como la caña de azúcar y la remolacha azucarera. Además, el

procesamiento industrial del sorgo dulce coincide con el de la caña de azúcar, por lo que se puede utilizar la misma maquinaria para ambas materias primas. Esto es lo que sucede en Uruguay, donde el sorgo es procesado en las mismas instalaciones que la empresa Alur S.A. utiliza para industrializar la caña de azúcar. El procesamiento de este cultivo ocurre entre los meses de marzo y abril, mientras que el de la caña de azúcar es entre los meses de junio y noviembre. Este esquema aumenta la eficiencia al extender en dos meses el uso de la fábrica sin que haya solapamiento entre las materias primas utilizadas (<http://www.alur.com.uy/articulos/2011/p-15-7-11.html>). En nuestro país el cultivo de sorgo dulce se ha incrementado a lo largo de los últimos años. En el período 2005-2006 se pasó de 450 a 1200 hectáreas sembradas; en el 2006-2007 a más de 2.000 hectáreas y entre los años 2017 y 2018, se sembraron 29.000 hectáreas a partir de las cuales se procesaron 76.000 toneladas del cultivo (101, 105).

Para mejorar los rendimientos de biomasa de este cultivo son aplicadas altas concentraciones de fertilizantes químicos nitrogenados. La aplicación de fertilizantes químicos repercute negativamente sobre el ambiente ya que alteran el complejo sistema de los ciclos biogeoquímicos del suelo, agua y aire (115). Aproximadamente el 50% del fertilizante aplicado se pierde del sistema suelo-planta mediante emisiones gaseosas, lixiviación, erosión y escurrimiento lo que lleva a una degradación de los ecosistemas, contribuye al efecto invernadero y contamina con nitrato y fósforo el agua superficial y la napa freática (123). Por otra parte, la fertilización es uno de los principales gastos de producción en la agricultura de países como el nuestro, el cual importa grandes cantidades del mismo.

Estas problemáticas hacen necesaria la búsqueda de alternativas no tradicionales que logren reducir la dependencia de la fertilización química nitrogenada y que sean sustentables económica y ambientalmente (143). Una tecnología amigable con el ambiente, que ofrece una alternativa para una producción agropecuaria sustentable, es el uso de bacterias PCV como biofertilizantes, con particular interés en las bacterias diazótrofes (58).

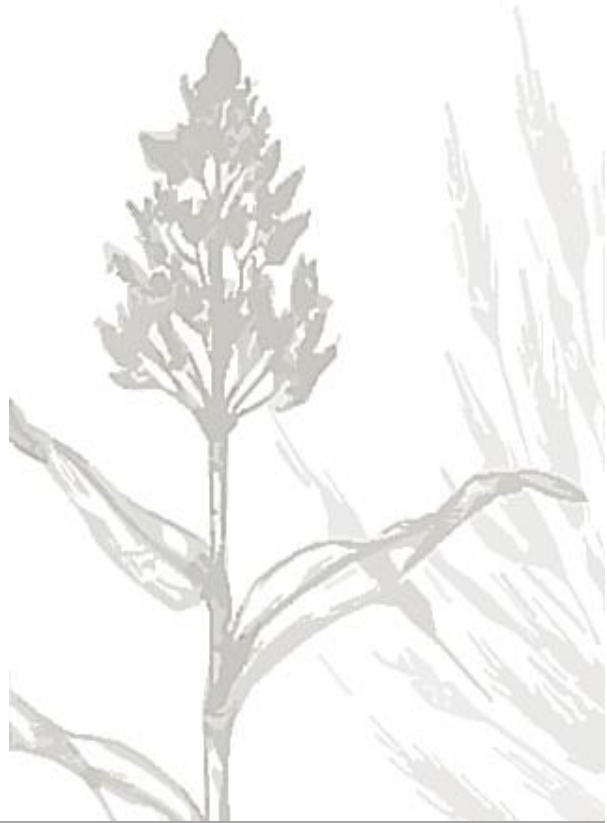


ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO Y DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO Y DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) cuenta con una larga trayectoria en el estudio de la interacción entre bacterias PCV y cultivos de interés agronómico (leguminosas y gramíneas). Concretamente, la línea de investigación en la cual se enmarca esta tesis, tiene como objetivo generar conocimiento para el desarrollo de inoculantes basados en bacterias endófitas PCV nativas, que permitan sustituir total o parcialmente el uso de fertilizantes químicos. Las primeras investigaciones tuvieron como foco el estudio de las bacterias PCV asociadas a la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y posteriormente se extendió el estudio a otros cultivos de interés agronómico incluyendo el sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), festuca (*Festuca arundinacea*) y canola (*Brassica napus*) (43, 51, 75, 98, 153, 154, 155).

Específicamente para el cultivo de sorgo dulce, se construyó una colección de bacterias asociadas a los tejidos internos (raíces, tallos y semillas) de plantas adultas de sorgo dulce cv. M81E crecidas en campo (75, 98). Las bacterias de la colección fueron aisladas en un medio de cultivo sin nitrógeno en su composición y crecidas bajo condiciones de microaerofilia, lo cual favoreció la selección de probables bacterias diazótrofes. Posteriormente, la colección fue caracterizada buscándose *in vitro* la presencia de características promotoras del crecimiento vegetal (producción de sideróforos, síntesis de AIA, solubilización de fosfatos, presencia del gen *NifH* y crecimiento en forma de biopelícula), así como características probablemente involucradas en el proceso de colonización e infección de las plantas (producción de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas y proteasas). Los aislamientos de interés fueron identificados a nivel de género mediante la amplificación y secuenciación del gen marcador *ADNr 16S*. Siguiendo esta aproximación se logró construir y caracterizar una colección de 181 aislamientos de probables endófitos nativos, de los cuales 102 presentaron el gen *NifH* y crecieron en forma de biopelícula en medio de cultivo semisólido, 11 produjeron AIA y una solubilizó fosfatos. Asimismo, el análisis filogenético permitió conocer a que pertenecen 38 de los aislamientos, los cuales incluyeron: *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (75).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo propone que cepas diazótrofes, pertenecientes a la colección, establecen una interacción endofítica con plantas de sorgo dulce y promueven su crecimiento vegetal.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la sustentabilidad ambiental del cultivo de sorgo dulce en Uruguay, mediante el aporte de conocimientos básicos para el desarrollo de un inoculante basado en bacterias promotoras del crecimiento vegetal nativas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar la capacidad de fijar biológicamente nitrógeno de cepas pertenecientes a la colección.
- II. Evaluar la respuesta de plantas de sorgo dulce a la inoculación con bacterias diazótrofes, en condiciones *gnotobióticas* y de invernáculo.
- III. Evaluar en plantas de sorgo dulce, el efecto combinado de la fertilización química nitrogenada y la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, bajo condiciones de invernáculo.
- IV. Determinar si cepas PCV seleccionadas son endófitas verdaderas de plantas sorgo dulce.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS BACTERIANAS Y SEMILLAS

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo forman parte de una colección de aislamientos presuntos endófitos diazótrofos asociados a tejidos de raíces, tallos y semillas de plantas de sorgo dulce de la cultivar comercial M81E. Las bacterias habían sido aisladas en un medio de cultivo sin nitrógeno en su composición y crecidas bajo condiciones de microaerofilia, lo cual favoreció la selección de probables bacterias diazótrofes. Dicha colección fue caracterizada fisiológica y genéticamente, se seleccionaron posteriormente un subconjunto de aislamientos en base a sus características promotoras del crecimiento vegetal (PCV) *in vitro* e identidad de género. Este subconjunto fue el sujeto de estudio de esta tesis (75) (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de los aislamientos utilizados en esta tesis.

Cepa	Órgano de procedencia	Identidad	Características relacionadas a la bioestimulación y biofertilización				Características relacionadas a la infección	
			Presencia del gen <i>nifH</i>	Crecimiento en forma de película	Producción de AIA	Sol. de fosfatos	Celulasas	Proteasas
UYSB139	Semilla	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB140	Semilla	<i>Pantoea sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB141	Semilla	<i>Pantoea sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB143	Semilla	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB146	Semilla	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB148	Tallo	<i>Leclerciaade sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB149	Tallo	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB150	Tallo	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB50	Raíz	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB53	Raíz	<i>Cellulomonas sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB55	Raíz	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB59	Raíz	<i>Citrobacter sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB63	Raíz	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB68	Raíz	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB73	Raíz	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB83	Raíz	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	-	+	+
UYSB89	Raíz	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB106	Raíz	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	-	+	-	-
UYSB108	Raíz	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB109	Raíz	<i>Kosakonia sp.</i>	+	+	-	-	-	-

Cepa	Órgano de procedencia	Identidad	Características relacionadas a la bioestimulación y biofertilización				Características relacionadas a la infección	
			Presencia del gen <i>nifH</i>	Crecimiento en forma de película	Producción de AIA	Sol. de fosfatos	Celulasas	Proteasas
UYSB116	Raíz	<i>Klebsiella sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB135	Raíz	<i>Citrobacter sp.</i>	+	+	-	-	-	-
UYSB119	Raíz	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB93	Raíz	<i>Staphylococcus sp.</i>	+	+	+	-	-	-
UYSB75	Raíz	S.D	+	+	-	-	-	-
UYSB77	Raíz	S.D	+	+	-	-	-	-
UYSB85	Raíz	S.D	+	+	-	-	-	-
UYSB88	Raíz	S.D	+	+	+	-	-	-
UYSB91	Raíz	S.D	+	+	+	-	-	-
UYSB92	Raíz	S.D	+	+	-	-	-	-
UYSB99	Raíz	S.D	+	+	-	-	-	-
UYSB101	Raíz	S.D	+	+	+	-	-	-
UYSB112	Raíz	S.D	+	+	+	-	-	-
UYSB125	Raíz	S.D	+	+	-	-	-	-
UYSB132	Raíz	S.D	+	+	+	-	+	+
UYSB151	Tallo	S.D	+	+	+	-	-	-
UYSB152	Tallo	S.D	+	+	+	-	-	-
UYSB60	Raíz	S.D	+	+	+	-	-	-

Por otro lado, las semillas de sorgo dulce utilizadas en esta tesis, corresponden a la cultivar M81E y al híbrido ADV2010, ambas provistas por la empresa ALUR S.A. El cultivar ADV2010 fue desarrollado por la empresa Advanta Semillas (<http://www.advantaseeds.com.ar/>), a partir de la hibridación de las cultivares *S. bicolor* y *S. saccharatum*. Por otra parte el cultivar M81E fue desarrollado por la Mississippi State University-Meridian (<https://www.meridian.msstate.edu/>) (23), a partir de la cultivar *S. saccharatum*. Ambos cultivares presentan un elevado contenido de azúcares solubles y rendimiento estimado de etanol, entre otras características positivas de interés industrial (78).

2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA DE LOS AISLAMIENTOS PCV

Se determinó la actividad nitrogenasa de ocho aislamientos seleccionados de acuerdo con sus características PCV evaluadas *in vitro* (presencia del gen *nifH* y capacidad de crecer en viales conteniendo medio semisólido de cultivo sin nitrógeno), y su capacidad de promover el crecimiento vegetal de plantas de sorgo dulce en condiciones *gnotobioticas*, así como su identidad de género (tabla 2) (75).

Tabla 2. Aislamientos seleccionados para el estudio de su actividad nitrogenasa.

Aislamiento	Nombre
UYSB106	<i>Kosakonia sp.</i>
UYSB139	<i>Kosakonia sp.</i>
UYSB150	<i>Enterobacter sp.</i>
UYSB63	<i>Bacillus sp.</i>
UYSB73	<i>Enterobacter sp.</i>
UYSB85	<i>Kosakonia sp.</i>
UYSB89	<i>Kosakonia sp.</i>
UYSB93	<i>Stapylococcus sp.</i>
UYSB119	<i>Bacillus sp.</i>
UYSB55	<i>Enterobacter sp.</i>

Para la determinación de la actividad nitrogenasa se utilizó la técnica de reducción de acetileno (ARA) (28, 73). La puesta a punto de los medios de cultivos así como las condiciones experimentales óptimas para la determinación enzimática fueron realizadas en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Federal do Paraná de Brasil, bajo la dirección del Dr. Emanuel De Souza y del Dr. Adriano Stefanello.

2.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

Previo a la determinación de la actividad nitrogenasa en las cepas en estudio se pusieron a punto las condiciones de crecimiento bacteriano, así como las condiciones óptimas en las cuales cada cepa realizó FBN, para cada cepa en particular. Para esto, se ensayaron los medios de cultivo NFCC (anexo) y el Nfb (anexo) y se realizaron variaciones en las fuentes de carbono. Una vez definida la composición de los medios de cultivos con los cuales trabajar, se realizaron ensayos para estudiar la actividad nitrogenasa bajo diferentes condiciones de crecimiento (tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de cultivo ensayadas para la FBN de las cepas estudiadas.

Medio de cultivo	NFCC	Líquido	Malato (2.5 gr/l)
			Glucosa (1,25 gr/l)
			Piruvato de sodio (1,27 gr/l)
			Malato(2,5 gr/l) + glucosa (1,25 gr/l)
		Semisólido	Malato (2.5 gr/l)
			Glucosa (1,25 gr/l)
			Piruvato de sodio (1,27 gr/l)
			Malato(2,5 gr/l) + glucosa (1,25 gr/l)
	Nfb	Líquido	Malato (2.5 gr/l)
			Glucosa (1,25 gr/l)
			Piruvato de sodio (1,27 gr/l)
			Malato(2,5 gr/l) + glucosa (1,25 gr/l)
		Semisólido	Malato (2.5 gr/l)

			Glucosa (1,25 gr/l)
			Piruvato de sodio (1,27 gr/l)
			Malato(2,5 gr/l) + glucosa (1,25 gr/l)
Condiciones de crecimiento	Estufa de cultivo a 30°C		con o sin agitación
			con tapón de goma hermético o con tapón de espuma no hermético (permite el intercambio gaseoso)
			Composición atmosférica dentro del vial sin modificar o sustituida por argón para evitar que las cepas entren en contacto con el O ₂ atmosférico (presión atmosférica= 1 atm)
Tiempo de crecimiento	1 días		
	3 días		
	5 días		
Tiempo de incubación con acetileno	1hr		
	2 hs		
	3 hs		
	4 hs		
	18 hs		

2.2.2. ENSAYO DE REDUCCIÓN DE ACETILENO (ARA)

La técnica consistió en inocular una suspensión de 1×10^7 cel/ml de las cepas de interés, en viales de 10 ml conteniendo 5 ml del medio de cultivo previamente determinado. El

inóculo provino de un pre-cultivo en medio LB (Anexo) crecido durante 24hs con agitación a 30°C, el cual fue lavado en una solución de NaCl 0.9%. Los viales inoculados se crecieron en estufa a 30°C, hasta la visualización de un halo de crecimiento en forma de película (característico de bacterias diazótrofes), en el caso de crecimiento en medio de cultivo semisólido; o hasta que el medio adquirió turbidez en el caso de medio de cultivo líquido. Posteriormente el vial se cerró herméticamente y se inyectó 0,5 ml de acetileno sustituyéndose así el 10% de la atmósfera dentro del vial. A partir de la fase gaseosa se tomaron muestras de 1 ml a distintos tiempos, las cuales se inyectaron y analizaron en un cromatógrafo de gases del tipo FID (Figura 6.).

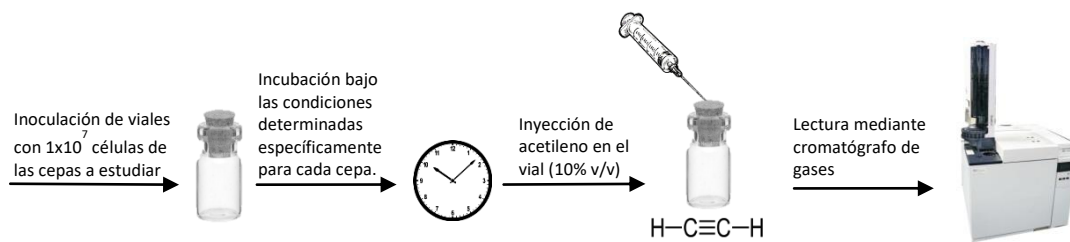


Figura 6. Estrategia experimental del ensayo ARA.

Un aislamiento fue considerado positivo cuando: 1- el cromatograma presentó dos picos, correspondientes a la detección de acetileno y etileno, y 2- cuando el valor de actividad nitrogenasa expresado en función de la concentración de proteínas totales dio mayor a 2 nmoles etileno/min.mg. El estándar de etileno utilizado tuvo una concentración de 2,23 nmol/0,5mL. En todos los casos, la medición de la reducción de acetileno se realizó utilizando un cromatógrafo de gases GC (Varian Star 3400 CX, Estados Unidos) con un detector del tipo FID, y una columna Porapak N 80/160. Las condiciones en las cuales se configuró el método de equipo fueron las siguientes (tabla 4):

Tabla 4. Condiciones configuradas en el cromatógrafo GC-FID para la técnica ARA.

Velocidad de flujo	300 mL/min
Gas de arrastre	N ₂ (80 psi)
Gas de llama	Aire comprimido (45 psi) e H ₂ (65 psi)
Temperatura de la columna	110°C
Temperatura del inyector	120°C
Temperatura del detector	200°C

2.2.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La actividad nitrogenasa de las cepas se expresó en función de la cantidad de proteínas totales presentes en el vial como medida indirecta de la cantidad de células. La concentración proteica se determinó mediante la técnica de Bradford (20). Dicha técnica consistió, primero en vortexear el vial para homogeneizar el cultivo bacteriano. Posteriormente, se agregaron 50 µl de NaOH 0,2M a 50 µl de la suspensión del vial y se incubó durante 30 min a 37°C, para lisar las células. A continuación, se colocaron 30µl de la muestra en una placa de 96 pocillos y se le agregaron 170 µl del reactivo de Bradford (anexo). Inmediatamente después se procedió a medir la absorbancia en espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV1800, Japón), a una longitud de onda de 595nm. La curva de calibración se realizó con diluciones de BSA 0,2 mg/ml en agua ultrapura (1/50, 3/47, 5/45, 10/40, 15/35, 20/30 y 30/20). En este caso, a 15 µl de cada dilución se le agregó 15 µl de NaOH 0,2M y 170 µl del reactivo de Bradford. La técnica se realizó por triplicado para cada una de las muestras y para la curva de calibración.

2.3 ENSAYOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE PLANTAS DE SORGO DULCE

La capacidad PCV de las cepas en estudio fue evaluada mediante ensayos de respuesta a la inoculación en condiciones: i- *gnotobióticos*, ii- invernáculo y iii- invernáculo, en presencia de diferentes dosis de fertilizante químico nitrogenado.

Como primer paso, para todos los ensayos, las semillas de sorgo dulce fueron esterilizadas en su superficie siguiendo el protocolo puesto a punto previamente (98, 75). Brevemente, las semillas fueron incubadas con EtOH 70% (v/v) durante 5 min y se lavó el remanente de alcohol con agua destilada estéril. Posteriormente se incubaron con una solución de hipoclorito de sodio 4% (v/v) durante 20 min en agitación y finalmente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada. La efectividad de la esterilización se comprobó, deslizando el material procesado sobre la superficie de una placa de Petri conteniendo medio de cultivo TSA (Anexo) y luego se incubó durante 24 hs a 30°C. Se consideró una esterilización de superficie exitosa, aquella en la que no se observó formación de colonias bacterianas sobre la placa control.

2.3.1. ENSAYO DE PCV EN CONDICIONES *GNOTOBIÓTICAS*

En primera instancia se puso a punto el sistema para la realización de los ensayos, se evaluaron diferentes medios de cultivo, soportes y pHs del medio (tabla 5).

Tabla 5. Puesta a punto del sistema para la realización de los ensayos PCV de plantas de sorgo dulce en condiciones *gnotobióticas*.

Medios de cultivo de plantas	MS (anexo)
	Jensen (anexo)
pH	5,8
	6,5
	6,8
Soporte	Bolitas de propileno
	Agar 0,4%

Una vez puesto a punto el sistema, el ensayo consistió en germinar semillas de la cultivar M81E, previamente esterilizadas en su superficie, en placas de Petri conteniendo agar-agua 0,8% (p/v) durante 48 hs a 30°C. Posteriormente, las semillas germinadas se traspasaron a tubos de crecimiento de plantas conteniendo 15 ml de medio de cultivo y bolitas de propileno como soporte. Se colocaron dos semillas por tubo y se inocularon con una suspensión de 1×10^7 células/semilla de la cepa en estudio. El inóculo se originó a partir de un cultivo crecido en medio de cultivo líquido TSB (anexo) por 24 hs a 30°C. En el diseño experimental se incluyó un tratamiento de referencia en el cual las semillas fueron inoculadas con la cepa tipo *Azospirillum brasilense* SP7 (10). Por su parte, el tratamiento control negativo consistió en inocular las semillas con 100 µl de NaCl 0,9% (v/v), mientras que al control positivo se les agregó una solución de KNO₃ 0,05 % (m/v). Para este ensayo se realizaron 8 repeticiones por tratamiento, manteniéndose las plantas en el cuarto de cultivo vegetal *in vitro* durante 20 días con temperatura y fotoperíodo controlado (26°C, 16 hs

de luz / 8 hs oscuridad) (Figura 7). Usando esta aproximación se evaluaron 37 cepas pertenecientes a la colección, en 4 experimentos diferentes. Se analizaron estadísticamente los datos de la altura y peso seco de la planta entera, empleando el programa estadístico Infostat (2008). Para esto se estudió la normalidad y la heterogeneidad de varianzas en el conjunto de muestras. Posteriormente se realizó el análisis de varianza, mediante la prueba LSD ($p \leq 0,05$).

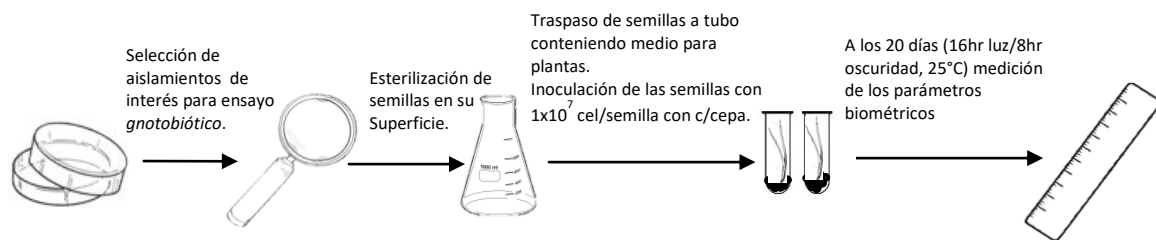


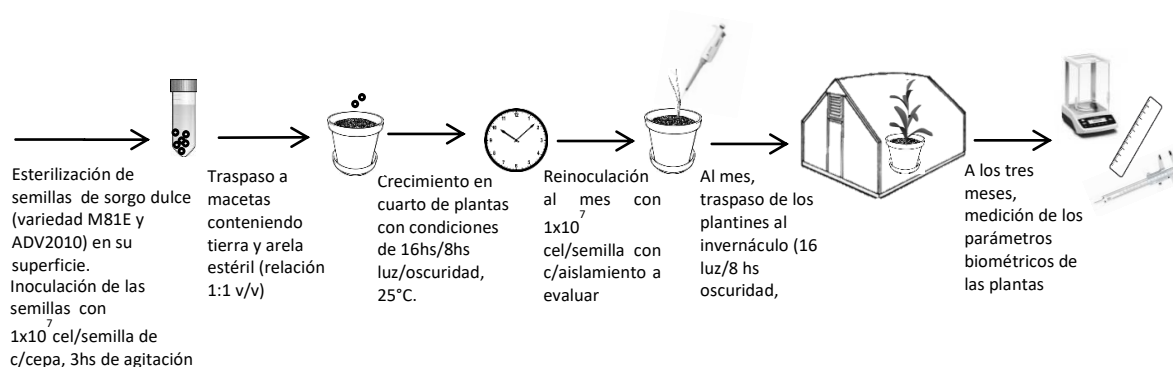
Figura 7. Estrategia experimental del ensayo de PCV en condiciones *gnotobióticas*

2.3.2. ENSAYO DE PCV EN CONDICIONES DE INVERNÁCULO

Para este ensayo se seleccionaron las cepas *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y *Kosakonia sp.* UYSB139, las cuales demostraron ser PCV en condiciones *gnotobióticas*. El ensayo se realizó con las cultivares de semilla de sorgo dulce M81E y ADV2010. La inoculación de las semillas, previamente esterilizadas en su superficie, consistió en sumergir 300 semillas en una suspensión bacteriana de 1×10^7 células/ml de la cepa a ensayar, suplementada con ampicilina $10 \mu\text{g/ml}$, antibiótico al cual las cepas evaluadas sus resistencias. La suspensión se incubó durante 3hs con agitación suave, con el objetivo de que las bacterias logren adherirse a la superficie de la semilla. El preinóculo empleado se originó a partir de un cultivo crecido en medio líquido TSB por 24 hs a 30°C .

Las semillas inoculadas se traspasaron a macetas conteniendo tierra de vivero y arena estéril (relación 1:1 v/v). En cada maceta se colocaron 30 semillas, debido a los bajos niveles de germinación de estas cultivares. Luego de que germinaron se raleó dejando

dos plantines por maceta. Durante el primer mes, en el cual los plantines están débiles, las macetas se colocaron en un cuarto de plantas con una temperatura controlada de 25°C y un fotoperíodo de 16 hs luz /8 hs oscuridad. Al mes, las plantas fueron reinoculadas, sobre la base del tallo, con una suspensión bacteriana de 1×10^7 células/planta. Posteriormente, las macetas fueron traspasadas a un invernáculo con iguales condiciones. Las plantas fueron regadas tres veces por semana. Las plantas fueron cosechadas a los 4 meses post-siembra, momento en el cual se midieron los parámetros biométricos. En el diseño experimental se incluyó un tratamiento de referencia, el cual consistió en inocular las semillas con la cepa tipo *Azospirillum brasilense* SP7. Por otra parte, el tratamiento control negativo consistió en inocular las semillas con NaCl 0,9% (m/v) y el control positivo en agregar el equivalente a 150 kgN ha⁻¹ de urea. En este ensayo se realizaron 12 repeticiones por tratamiento con un diseño completamente al azar (Figura 8). Al momento de la cosecha se midieron las variables biométricas altura y diámetro del tallo, así como el peso seco aéreo y radicular. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el programa estadístico Infostat (2008), se estudió la normalidad y la heterogeneidad de varianzas en el conjunto de muestras y posteriormente se realizó el análisis de varianza



mediante el test de Tukey ($p \leq 0,05$) y la prueba LSD ($p \leq 0,05$).

Figura 8. Estrategia experimental del ensayo de PCV en condiciones de invernáculo.

2.3.3. ENSAYO DE PCV EN CONDICIONES DE INVERNÁCULO EN PRESENCIA DE DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITROGENADA

En este ensayo se evaluaron semillas de las cultivares M81E y ADV2010, esterilizadas en su superficie e inoculadas con las cepas *Kosakonia sp.* UYSB89 y *Kosakonia sp.* UYSB139, como se describió en el ensayo anterior. Al mes las plantas fueron reinoculadas, sobre la base del tallo, con una suspensión bacteriana de 1×10^7 células/planta. En este estudio se evaluó el efecto combinado de la fertilización química nitrogenada a diferentes niveles (el equivalente a 0, 75 y 150 kgNha⁻¹ urea) con la inoculación bacteriana. La dosis de fertilizante fue aplicada gradualmente, dosificándose de a 25kgNha⁻¹ urea semanalmente hasta llegar a la concentración final.

En la diagramación de los tratamientos, las plantas sin fertilización nitrogenada ni inoculación se utilizaron como control negativo. Por otro lado, se emplearon plantas sin inocular a las cuales se les añadió urea como fertilizante nitrogenado a una concentración final al equivalente de 75 o 150 kgN ha⁻¹.

El experimento incluyó 12 repeticiones por tratamiento con un diseño completamente al azar. Las macetas se ubicaron en un invernáculo con un fotoperíodo de 16 hs luz/ 8 hs oscuridad. El ensayo se cosechó a los cuatro meses post-inoculación evaluándose los mismos parámetros biométricos mencionados en el experimento anterior. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el programa estadístico Infostat (2008). Se realizó el análisis de varianza mediante el test LSD ($p \leq 0,05$) para dos variables y mediante análisis de contrastes de grupo.

2.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PLANTAS DE SORGO DULCE (CV. M81E) Y CEPAS PCV

Con el propósito de investigar cual es la naturaleza de la interacción entre plantas de sorgo dulce y las cepas PCV *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119, *Kosakonia sp.* UYSB139, se realizó una aproximación microscópica. Las cepas mencionadas fueron seleccionadas por su capacidad de PCV de plantas de sorgo dulce cultivar M81E en condiciones *gnotobióticas* y de invernáculo.

La estrategia experimental consistió en inocular plantas de sorgo dulce con cepas conteniendo un plásmido codificante para la proteína GFP (proteína fluorescente verde) en condiciones *gnotobióticas* (Figura 9). Posteriormente, a diferentes tiempos post-inoculación, las plantas fueron cosechadas y se realizaron cortes ultrafinos de los tejidos de raíz, tallo y hojas para ser visualizados mediante microscopía confocal de fluorescencia (MCF). Paralelamente, se realizó la cuantificación de la colonización endofítica de plantas de sorgo dulce a los mismos tiempos post-inoculación por conteo de unidades formadoras de colonia (ufc) en placa. Esta aproximación permitió describir un modelo de infección y colonización a lo largo del tiempo para cada cepa estudiada.

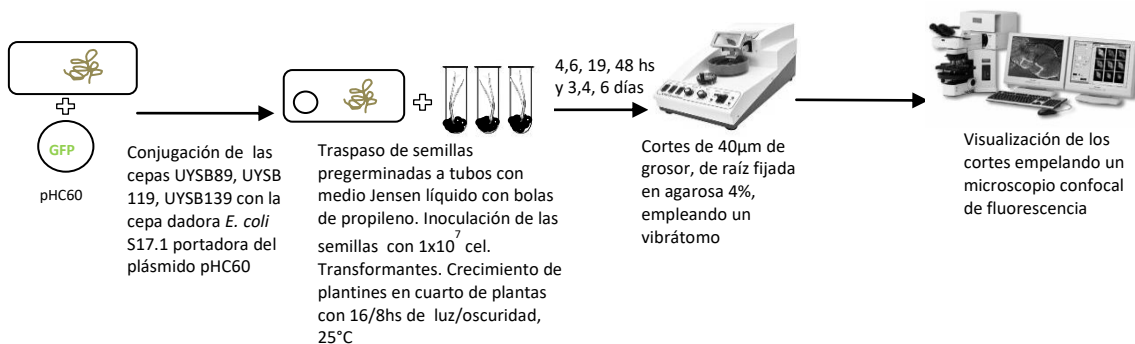


Figura 9. Estrategia experimental abordada para la visualización de la colonización bacteriana de la planta mediante microscopía confocal de fluorescencia.

2.4.1. TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

La estrategia consistió, en primera instancia, en preparar células termocompetentes de la cepa *Escherichia coli* S17.1. Posteriormente, a dichas células termocompetentes, se

les introdujo el plásmido pHC60-gfp, el cual expresa la GFP bajo un promotor constitutivo (35). Además, contiene una secuencia estabilizadora RK2 que evita que se pierda el plásmido con facilidad y un gen de resistencia a tetraciclina. El plásmido se mantiene independiente y no se integra al material genético de la célula.

Finalmente, las cepas de interés fueron conjugadas con la *E.coli* S17.1, para la incorporación del plásmido pHC60-gfp.

Preparación de células termocompetentes de la cepa *E.coli* S17.1

El protocolo seguido fue el descrito por Chung et al. (37). Se preparó un preinóculo creciendo la cepa *E. coli* S17 en medio de cultivo LB con agitación, durante 24 hs a 37°C. Luego, tubos conteniendo 10 ml de medio de cultivo LB, fueron inoculados con 100 µl del preinóculo y colocados en una estufa con agitación a 37°C, hasta que el cultivo alcanza una densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) de 0.3. A partir de el, se realizaron alícuotas de 1 ml y se centrifugó durante 10 min a 15.600 g. El pellet celular obtenido fue lavado con 1 ml de H₂O destilada estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 100 µl de solución TSS (anexo). Todo el protocolo descrito fue realizado manteniendo las muestras en hielo. La suspensión obtenida se almacenó inmediatamente en freezer a -20°C.

Purificación del plásmido pHC60

Células de la cepa *Escherichia coli* DH5α conteniendo el plásmido pHC60 (Figura 10) se cultivaron en tubos de ensayo conteniendo 3 ml de LB + Kanamicina 100 µg/ml durante 24 hs a 37°C y con agitación hasta una $D.O_{600}$ de 0,3. Posteriormente, 1,5ml del cultivo crecido se centrifugaron en un microtubo, durante 30 seg a 15.600 g. El sobrenadante obtenido se descartó y el pellet se resuspendió con vortex en 150 µl de buffer GET (anexo) suplementado con 2 µl/ µl de RNAsa 10 mg/ml. A la suspensión obtenida se le adicionó 150 µl de una solución de lisis (anexo) y se mezcló por inversión durante 1 min. A continuación, a la suspensión se le adicionó 150 µl de acetato de potasio para neutralizar, mezclándose nuevamente por inversión. Una vez

células competente durante 30 seg. en hielo, luego 30 seg. a 42°C y finalmente 2 min. en hielo. Luego, a cada tubo se le adicionaron 400 µL de medio de cultivo SOC (anexo) y se incubaron 60 min. a 37°C. Finalmente, la totalidad del cultivo bacteriano obtenido fue sembrado en placas conteniendo medio de cultivo LA suplementado con Tetraciclina 25 µg/ml (el plásmido confiere resistencia) y se las incubó durante 24 hs a 37°C. Los clones transformantes fueron reaislados en las mismas condiciones mencionadas y se confirmaron mediante observación bajo luz UV.

Estudio de las resistencias de las cepas a antibióticos

Para seleccionar las células transformantes (nombradas de aca en adelante *E. Coli* S17-1 /pHC60) se tomó en cuenta la resistencia a antibióticos codificada por el plásmido y la resistencia natural a antibióticos por las cepas a ser transformadas. Para esto, se estudió previamente las resistencias de las cepas UYSB89, UYSB119 y UYSB139. Se crecieron en medio de cultivo líquido LB y se incubaron durante 24 hs a 30°C. Luego se inocularon 100 µl del preinóculo en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LA (anexo), suplementadas con diferentes concentraciones de los antibióticos: Tetraciclina (Tc), Kanamicina (Km), Ampicilina (Amp) y Spectromicina (Spc). Las concentraciones evaluadas según los antibióticos fueron: Tc 10, 25, 100 µg/ml, Km, Amp y Spc 25, 100 µg/ml. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 24 hs a 30°C. Se consideró que la cepa es resistente al antibiótico cuando se observaron colonias crecidas en la placa.

Conjugación de las cepas de interés con la cepa *E.Coli* S17-1/ pHC60

Por un lado, las cepas *Kosakonia* sp. UYSB89, *Bacillus* sp. UYSB119 y *Kosakonia* sp. UYSB139, se crecieron en medio de cultivo líquido LB durante 24 hs a 30°C hasta una D.O. de 0,3. Por otro, se creció la cepa *E.coli* S17-1/pHC60 durante 24 hs a 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0,3. Al día siguiente 2µl del cultivo de *E.coli* S17-1/pHC60 se incubaron junto con 100 µl del cultivo del aislamiento a transformar en microtubos durante 4 min a 40°C en baño María. Posteriormente, la suspensión se sembró en forma de gota en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LA, se dejó incubar en estufa durante 24hs a 37°C.

Las colonias obtenidas se recogieron con ansa y se traspasaron a tubos de ensayo conteniendo 5 ml de medio LB y posteriormente se realizaron diluciones 1/100; 1/1000 en medio de cultivo LB. A partir de cada dilución se inocularon 300 µl de la suspensión en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LA suplementado con el antibiótico de selección determinado (Tc 25 µg/ml y Amp 100 µg/ml), se incubaron durante 24 hs a 30°C. Las colonias obtenidas, es decir que incorporaron el plásmido, se repicaron en placas de Petri conteniendo el mismo medio de cultivo de selección.

2.4.2. VERIFICACIÓN DE LA EFICACIA DEL PROCEDIMIENTO DE CONJUGACIÓN

Para corroborar que el procedimiento de conjugación de las cepas de interés con el plásmido pHc60 fue efectivo se llevaron a cabo dos aproximaciones: 1- se comprobó que las cepas a transformar hayan efectivamente incorporado el plásmido, 2- se estudió la identidad las cepas exconjugantes.

Verificación de la incorporación del plásmido en las cepas de interés

Para corroborar que las cepas hayan incorporado el plásmido, se les realizó una extracción del ADN plasmídico siguiendo la metodología descrita anteriormente (24). La presencia de los plásmidos se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (p/v) en buffer TAE sometido a 90 V/cm. El agente intercalante utilizado fue el GoodView (Beijing SBS. GenetechCo. Ltd.) en una relación de 1 µl/50 ml (colorante: agarosa) y expuestos a luz UV para su visualización.

Asimismo, la incorporación de los plásmidos también fue evaluada mediante la visualización de la señal característica emitida por el gen reportero presente en el plásmido. Para esto, las células transformantes fueron sembradas por estrias en placas conteniendo medio de cultivo LA con el antibiótico correspondiente y las colonias observadas bajo luz UV. Se consideró positivas aquellas colonias que emitían un color verde flúor en estas condiciones.

Estudio de la identidad de las cepas conjugadas

Para confirmar que las células conjugadas con el plásmido fueran las cepas de interés, se estudió su identidad mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal *16S*, a partir de lisados de colonia. La secuencia del gen ribosomal *16S* obtenida fue comparada con la secuencia de las cepas de interés originales.

Extracción de ADN genómico a partir del lisado de colonia

El ADN genómico extraído mediante el método de lisado celular fue utilizado como molde para realizar la amplificación del gen ribosomal *16S* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR). Para esto se colectó, en condiciones asépticas, una ansada de varias colonias puras a partir de placas de Petri conteniendo medio de cultivo TSA, se resuspendieron en 100 µl de agua ultra pura estéril. La suspensión obtenida se centrifugó durante 2 min a 15.600 g. y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de NaOH 0,05 M, se incubó durante 4 min. a 100 °C, seguido de 2 min. en baño de hielo, con el propósito de provocar una lisis por “shock” térmico. A la suspensión obtenida se le agregó 900 µl de H₂O ultra pura estéril, centrifugándose por 2 min a 15.600 g. Como solución de trabajo se guardaron 700 µl del sobrenadante obtenido a -20°C.

Amplificación del gen ribosomal *16S*

Se utilizaron los cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3) (85). La mezcla de reacción consistió en 29,6 µl de agua desionizada estéril, 5 µl de DreamTaq Buffer 10X (Thermo Fisher Scientific Inc.) que incluía MgCl₂ en una concentración de 20 mM; 5 µl de dNTPs 2 mM, 2 µl de cada cebador 20 µM, 2 µl de BSA 1% (p/v), 0,4 µl de Taq (5u/ µl) y 4 µl de lisado bacteriano. El programa empleado para la reacción de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1min a 72°C., con un paso de extensión final de 15 min a 72°C.

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (p/v) en buffer TAE 1X. La corrida se realizó durante 40min a 90 V/cm. El agente intercalante utilizado fue el GoodView (Beijing SBS. GenetechCo. Ltd.) en una relación de 1 µl/50 ml (colorante: agarosa). El tamaño correcto del amplicón se confirmó mediante su comparación con el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kbDNA Ladder (Thermo Scientific #SM1332) el gen se visualizó bajo luz UV.

Secuenciación de los amplicones obtenidos del gen ribosomal 16S

Los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación del gen ribosomal 16S se enviaron a Macrogen Inc. Corea para su purificación y posterior secuenciación con los mismos cebadores utilizados. Las secuencias obtenidas a partir de ambos extremos se editaron y empalmaron con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012) (HeracleBioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>) siendo cada secuencia ensamblada de 1400 pares de bases aproximadamente. Luego las estas secuencias ensambladas se compararon con la secuencia de las cepas utilizando el programa informático The Ribosomal Database Project (RDP) (39, 163, http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp), mediante el algoritmo KKN matches.

2.4.3. INOCULACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE SORGO DULCE DE LA CULTIVAR M81E CON LAS CEPAS TRANSFORMANTES

Semillas de sorgo dulce fueron esterilizadas en su superficie siguiendo el protocolo descrito previamente, y germinadas en placas de Petri conteniendo agar-agua (0,8%). Al momento del brote, se traspasaron dos semillas a cada tubo de crecimiento de planta, conteniendo 15 ml de medio de cultivo Jensen con bolitas de propileno como soporte. Cada plántula fue inoculada con una suspensión de 1×10^7 células/ml de la cepa transformada previamente, crecida en 5ml de medio de cultivo TSB. Los plantines

inoculados fueron cultivadas en cuarto de plantas en condiciones de 16hs luz/ 8hs oscuridad a 25°C. Las plantas se cosecharon luego de transcurridas 4, 16, 19, 48, 72, 120 y 144 hs post inoculación (pi.) y se separaron las raíces de la parte aérea. Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular.

2.4.4. RECuentos BACTERIANOS DE TEJIDO RADICULAR

Los recuentos fueron realizados a partir de material vegetal radicular cosechado a las 4, 19, 48 y 144 hs pi. El procedimiento consistió en separar la porción radicular de la aérea y esterilizados en su superficie, para esto se sumergieron durante 1 min en etanol 70%, seguido de 1 min en hipoclorito de sodio 1% y luego se realizaron 4 enjuagues en NaCl 0,09%.. Luego se cortó en porciones de 1cm y se maceró en un mortero estéril. Posteriormente, fueron maceradas en 1 ml de NaCl 0,9%, empleando un mortero estéril, y se realizaron diluciones seriadas a partir de la suspensión obtenida (1/100; 1/100.000; 1/1.000.000). Se sembraron en superficie 100 µl de las diluciones en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TSA suplementado con Tc 25 µg/ml y Amp 100 µg/ml. Las placas se incubaron durante 24 hs a 30°C y luego se realizó el recuento. Los resultados se expresaron en función de los gramos de tejido radicular. Todo el procedimiento fue realizado por duplicado.

2.4.5. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL PARA ESTUDIOS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

El material vegetal cosechado fue posteriormente procesado para ser analizado mediante MCF. En este estudio se trabajó exclusivamente con la parte radicular, no se logró ajustar la técnica para visualizar la parte aérea ya que la autofluorescencia de la planta generó demasiado ruido en las imágenes. Las raíces cosechadas (principal y adventicias), fueron cortadas en segmentos de 0,5 cm y colocadas en un molde de

silicona de 0,5 x 1 x 0,5 cm, orientándolas en sentido transversal como longitudinal. El molde fue rellenado con agarosa 4% (p/v) hasta que las raíces estuvieran completamente cubiertas. Los bloques de agarosa conteniendo las raíces fueron posteriormente cortados en láminas de 40 µm de grosor mediante el empleo de un vibrátomo (Leica VT100S, Wetzlar, Alemania), empleando una frecuencia de vibración para el corte de 60 Hz. Las láminas se colocaron en un portaobjeto y se cubrieron con un cubreobjetos, se sellaron los bordes con esmalte de uñas transparente. Por cada muestra se obtuvieron 10 láminas, tanto de sentido transversal longitudinal. Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular, las cuales fueron procesadas bajo idénticas condiciones.

Los preparados fueron observados en un microscopio confocal Zeiss, Modelo LSM 800 (Je1na-Alemania) con un módulo AiryScan integrado, de la plataforma de Microscopía del IIBCE. El protocolo de detección incluyó la detección, en tres canales independientes, de: a) la emisión de la proteína GFP correspondiente a lo emitido por la cepa transformada; b) señal del rojo lejano correspondiente a la emisión natural de la planta; c) y luz transmitida. La detección de la emisión de la proteína GFP fue entre 480 - 530 nm. La detección de rojo lejano fue entre 600 - 700 nm. Los valores del láser, fotomultiplicador e intensidad del láser no fueron alterados entre los distintos tratamientos. De todas las láminas obtenidas se seleccionaron las tres mejores para tomarles fotos, tomándoles en promedio, tres fotografías por lámina. Las imágenes obtenidas fueron procesadas para integrar los canales utilizando el programa de edición de imágenes FIJI (135).



3. RESULTADOS

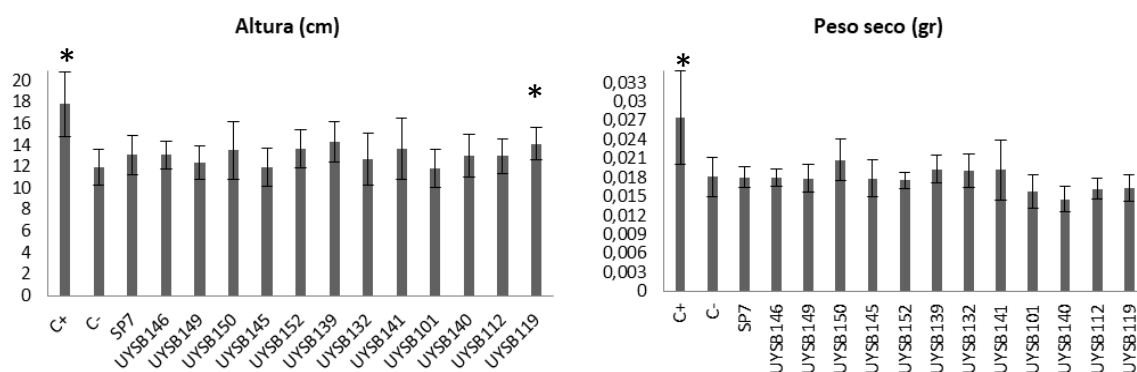
3.1. ENSAYOS DE PCV DE SORGO DULCE EN CONDICIONES GNOTOBIÓTICAS

Para este ensayo se realizó la puesta a punto de las condiciones del mismo y se determinó que las óptimas fueron las siguientes: medio de cultivo jensen a pH 6,8 con bolitas de propileno como soporte.

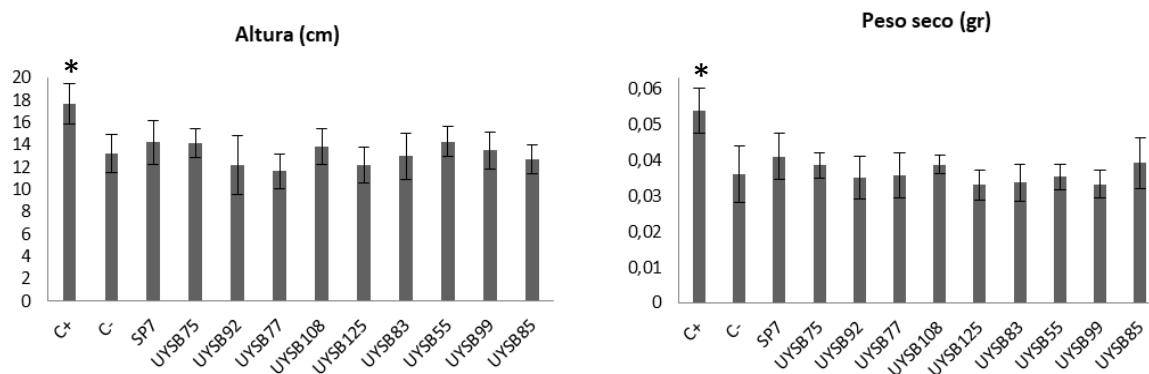
Fueron seleccionadas para su estudio 37 cepas de acuerdo a sus características PCV determinadas *in vitro* (tabla 1). Una de las características en común que presentaron las cepas es la presencia del gen *nifH* en su genoma, así como la capacidad de crecer en forma de película en medios semisólidos sin nitrógeno (característico de cepas diazótrofes). Teniendo en cuenta el número total de cepas a ser evaluadas, así como las características de la diagramación del ensayo, los aislamientos fueron evaluados en 4 experimentos separados para facilitar la manipulación experimental. En estos experimentos se evaluó la respuesta de la cultivar de sorgo dulce M81E a la inoculación.

El análisis de la varianza (ANOVA, p. valor $\leq 0,5$) mostró que hubo diferencias significativas entre los tratamientos. En todos los experimentos realizados, el control positivo presentó diferencias significativas positivas con respecto al control negativo para los parámetros biométricos evaluados (altura y peso seco total), validando los ensayos (Figura 11). Cabe resaltar que el tratamiento inoculado con la cepa referencia *A. brasilensis* Sp7 no mostró diferencias significativas con respecto al control negativo, en ninguno de los experimentos realizados. Por su parte, los tratamientos inoculados con las cepas USB89, UYSB93, UYS106 y UYSB119, tuvieron valores de altura significativamente mayores que el control negativo. Asimismo, el peso seco del tratamiento inoculado con la cepa UYSB93 fue significativamente mayor que el del control negativo. Es preciso mencionar que aquellas cepas que demostraron diferencias significativas con respecto al control negativo, no mostraron diferencias significativas con respecto al control positivo (Figura 11 y 12).

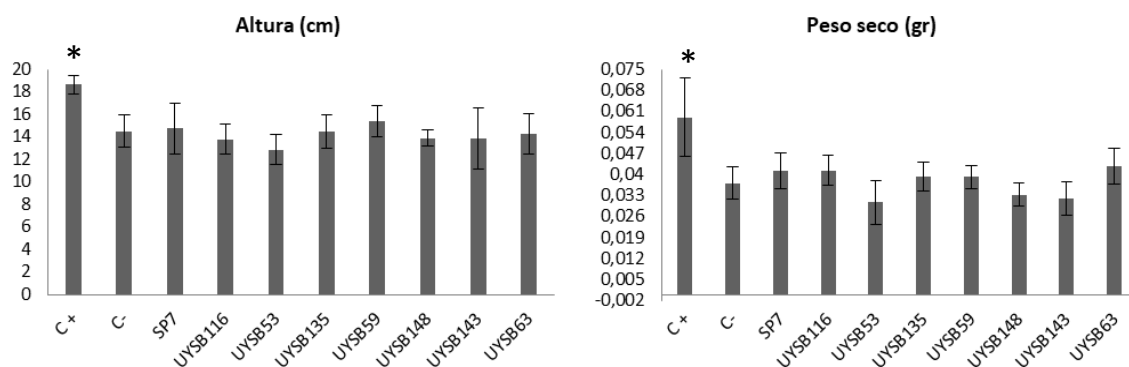
1^{er} experimento



2^{do} experimento



3^{er} experimento



4^{to} experimento

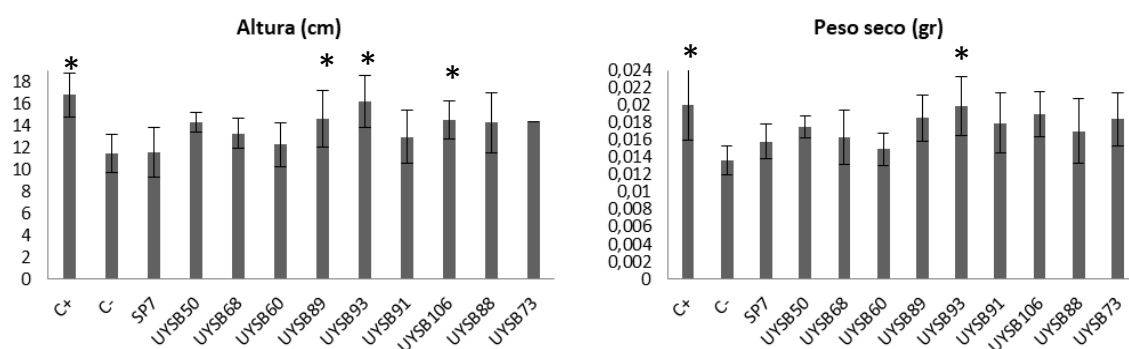


Figura 11. Ensayos de PCV en condiciones *gnotobióticas* empleando la cultivar de sorgo dulce M81E. C+: control positivo, 0,05% v/v de KNO₃. C-: control negativo, NaCl 0,9%. Se muestra el promedio de 8 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Asterisco sobre la barra: tratamientos que mostraron diferencias significativas con el control negativo (Test de LSD, p. valor $\leq 0,05$).

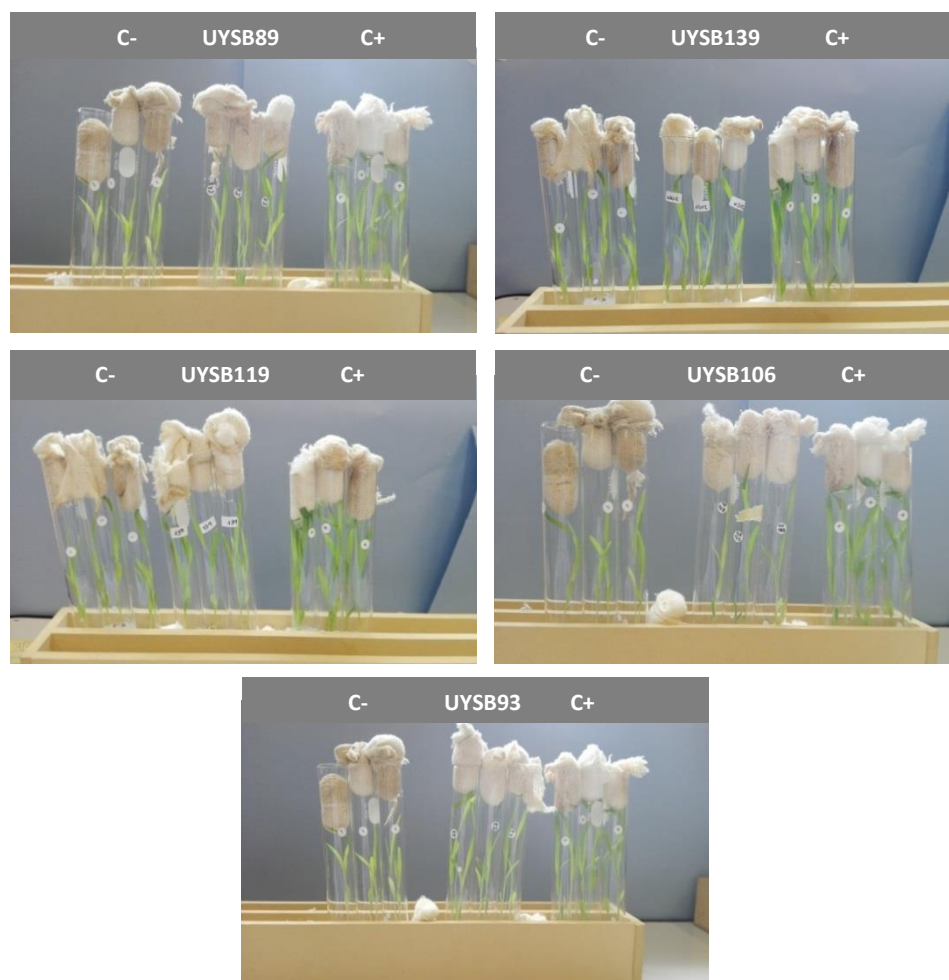


Figura 12. Fotografías de los ensayos *gnotobióticos*. Se muestran los tratamientos que mostraron efectos positivos en al menos uno de los parámetros biométricos de la planta evaluados.

3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA DE AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

El objetivo de esta actividad fue determinar la actividad nitrogenasa de 8 aislamientos pertenecientes a la colección, mediante la técnica ARA. Como resultado de las diferentes evaluaciones se lograron definir las mejores condiciones de crecimiento y de actividad nitrogenasa para cada una de las cepas ensayadas. Asimismo, se logró determinar la actividad nitrogenasa para 7 de los 8 aislamientos estudiados, los cuales expresaron valores de actividad nitrogenasa mayores al valor de referencia, 2 nmoles etileno/min.mg (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de crecimiento y de actividad nitrogenasa óptimas, determinadas para cada cepa en estudio.

Cepa	Genero	Condiciones de crecimiento bacteriano	Actividad nitrogenasa (nmoles etileno/min.mg de proteína)*
UYSB139	<i>Kosakonia sp.</i>	No se logró determinar	---
UYSB63	<i>Bacillus sp.</i>	Medio de cultivo: NFCC + glucosa líquido. Crecimiento: viales herméticos con agitación, atmósfera de Argón, 1 día. Incubación con acetileno: 2 hs.	3.61
UYSB73	<i>Enterobacter sp.</i>	Medio de cultivo: NFCC + glucosa líquido. Crecimiento: viales no herméticos, sin agitación, 5 días. Incubación con acetileno: 2 hs.	3.10
UYSB85	<i>Kosakonia sp.</i>	Medio de cultivo: NFCC + glucosa líquido. Crecimiento: viales herméticos, sin agitación, 3 días. Incubación con acetileno: 2 hs.	3.14
UYSB89	<i>Kosakonia sp.</i>	Medio de cultivo: NFCC + glucosa líquido. Crecimiento: viales herméticos, sin agitación, 3 días. Incubación con acetileno: 2 hs.	2.02
UYSB93	<i>Staphylococcus sp.</i>	Medio de cultivo: NFCC + glucosa líquido. Crecimiento: viales herméticos con agitación, atmósfera de Argón, 1 día. Incubación con acetileno: 2 hs.	8.03
UYSB119	<i>Bacillus sp.</i>	Medio de cultivo: NFCC + glucosa líquido. Crecimiento: viales herméticos, sin agitación, 5 días. Incubación con acetileno: 2 hs.	4.28
UYSB55	<i>Enterobacter sp.</i>	Medio de cultivo: Nfb + malato + glucosa	5.14

semisólido. Crecimiento: Vial hermético, sin agitación, 3 días. Incubación con acetileno: 2 hs.
--

* La actividad nitrogenasa se expresó en función de la cuantificación proteica total, determinada mediante el método de Bradford.

3.3. ENSAYOS DE PCV DE SORGO DULCE EN CONDICIONES DE INVERNÁCULO

Las cepas seleccionadas para estudiar su PCV en condiciones de invernáculo fueron: UYSB119, seleccionada por pertenecer al género *Bacillus*, ya que la producción de esporas puede conferir una ventaja para su aplicación como inoculante; UYSB89, seleccionada por pertenecer al género *Kosakonia* reportado como PCV en varias especies vegetales; y UYSB139, si bien no mostro ser PCV en condiciones *gnotobióticas* fue seleccionada por pertenecer al género *Kosakonia* y por ser aislada a partir de semilla. El hecho de haber sido aislada de semilla es interesante para su desarrollo como inoculante ya que tiene la potencialidad de transmitirse mediante semilla a la nueva generación.

En estos ensayos, la capacidad PCV de las cepas fue evaluada en las cultivares de semillas de sorgo dulce M81E y ADV2010 entre octubre de 2017 y febrero 2018; se repitió en la cultivar ADV2010 entre setiembre de 2018 y enero de 2019. En este último caso, no fue posible realizar la repetición del ensayo empleando la cultivar M81E ya que las semillas con las que contábamos no tenían potencial de germinación, posiblemente debido a que se encontraban envejecidas, y la empresa que nos proveía no contaba con stock renovado.

Cultivar M81E

El análisis estadístico (ANOVA, p. valor $\leq 0,5$) del ensayo realizado en la cultivar M81E, informó que hubieron diferencias significativas entre los tratamientos. Por una parte, las plantas del tratamiento control positivo tuvieron valores de peso seco aéreo y radicular significativamente más altos que las plantas del control negativo. Asimismo, el peso seco radicular de los tratamientos inoculados con las cepas Sp7, UYSB139 y UYSB89 fue significativamente más elevado que el del control negativo (Figura 13). Sin embargo, ningún tratamiento mostró diferencias significativas con el control negativo en la altura ni en el diámetro del tallo (Figura 13 y 14). En cuanto al tratamiento UYSB119, no fue posible analizar los datos debido a que no se obtuvo el mínimo de 8 réplicas necesarias para poder realizar el análisis estadístico.

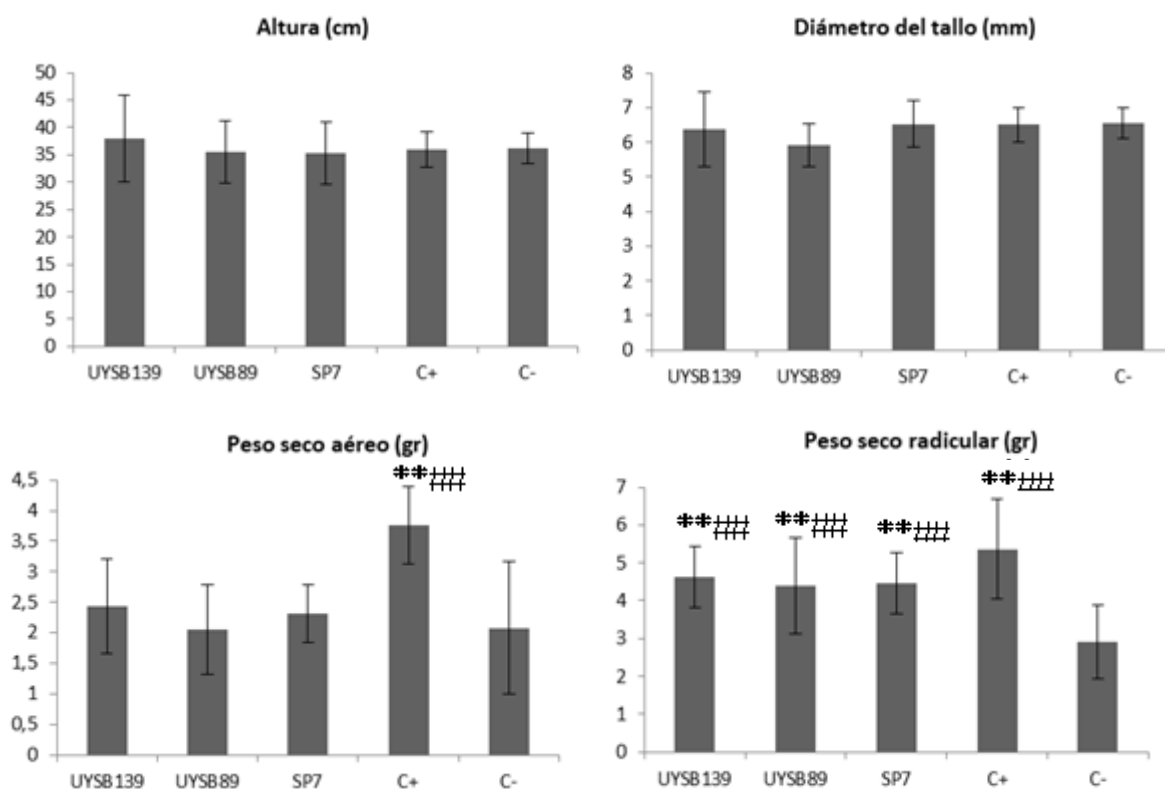


Figura 13. Ensayos de PCV en condiciones de invernáculo empleando la cultivar de sorgo dulce M81E. Periodo: octubre 2017 a febrero 2018. C+: control positivo (agregado de 50 kgN.ha⁻¹ de Urea), C-: Control negativo (agregado de 100 µl NaCl 0,9%/planta). Se muestra el promedio de 10 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Diferencias significativas con respecto el C-: (##) Test de Tukey, p. valor $\leq 0,05$; (**) Test de LSD, p. valor $\leq 0,05$.

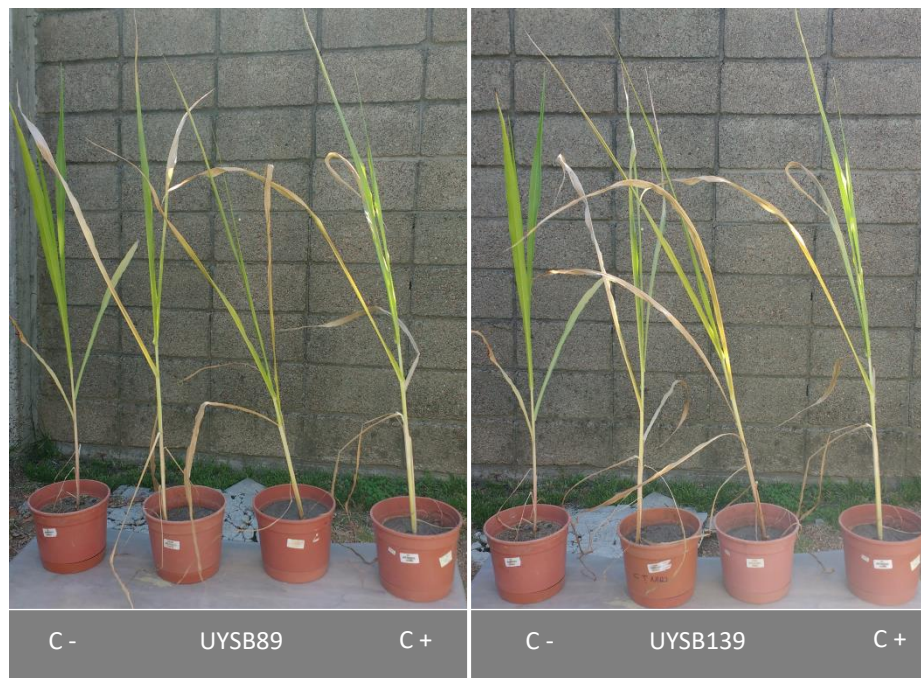


Figura 14. Fotografía de ensayos PCV en condiciones de invernáculo en la cultivar M81E. Período: octubre 2017 a febrero 2018. Se muestran los tratamientos que mostraron efectos positivos en al menos uno de los parámetros biométricos de la planta evaluados.

Cultivar ADV2010

Para esta cultivar, el análisis estadístico (ANOVA, p. valor $\leq 0,5$) informó que hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados mostraron que las plantas del tratamiento control positivo, tuvieron diferencias significativas positivas con respecto al control negativo en todos los parámetros evaluados. Por su parte, el tratamiento inoculado con la cepa referencia Sp7 no se diferenció significativamente del control negativo, en ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, el tratamiento inoculado con la cepa UYSB139 mostró valores de todos sus parámetros significativamente más elevados que los del control negativo. Asimismo, el peso seco aéreo y radicular del tratamiento UYSB119 y el peso seco radicular del tratamiento UYSB89 fueron significativamente más altos que el control negativo (Figura 15 y 16).

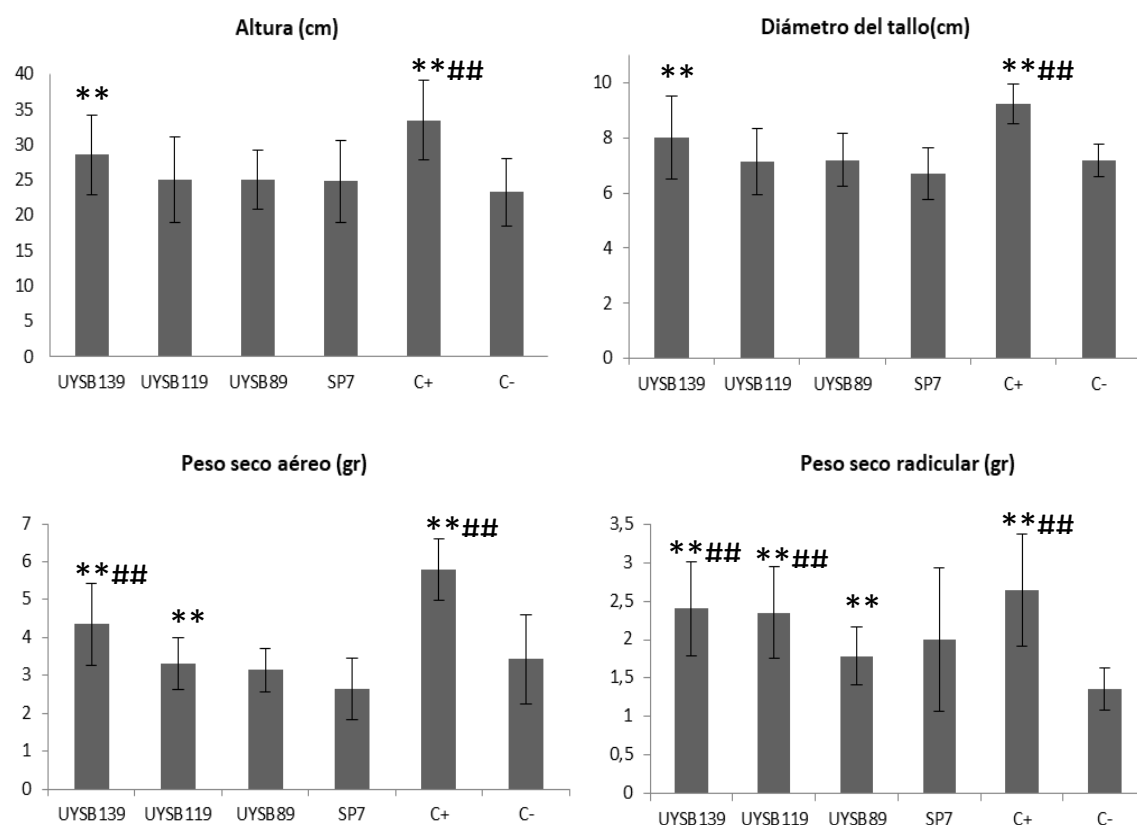


Figura 15. Ensayos de PCV en condiciones de invernáculo empleando la cultivar de sorgo dulce ADV2010. Período: octubre 2017 a febrero 2018. C+: control positivo (agregado de 50 kgN.ha⁻¹ de Urea), C-: Control negativo (agregado de 100 µl NaCl 0,9%/planta). Se muestra el promedio de 10 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Diferencias significativas con respecto el C-: (##) Test de Tukey, p. valor ≤0,05; (**) Test de LSD, p. valor ≤0,05.

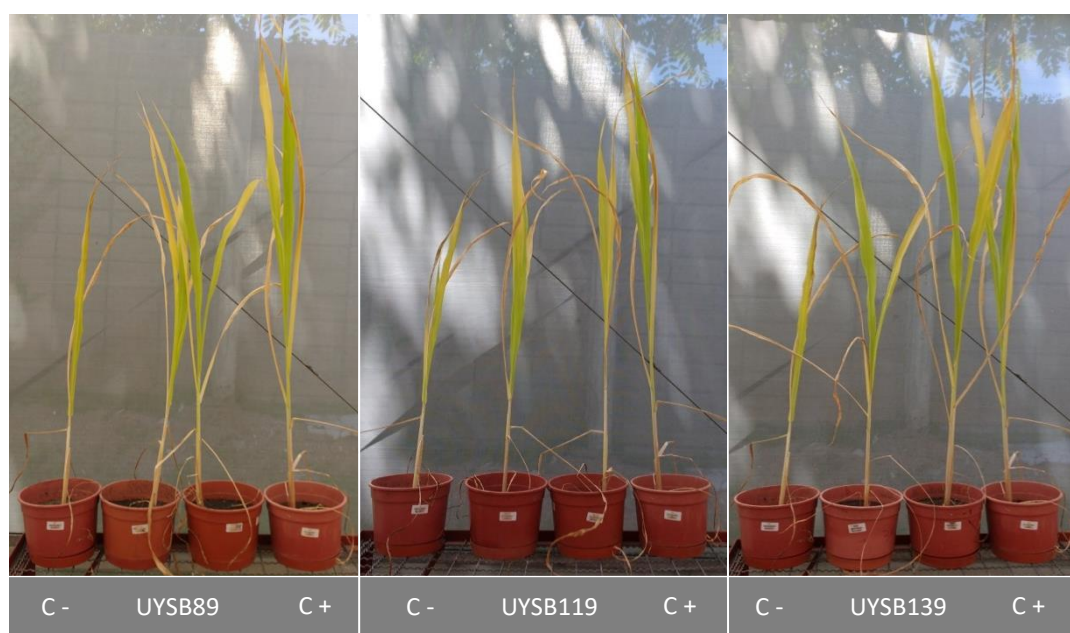


Figura 16. Fotografías del ensayo de PCV en condiciones de invernáculo en la cultivar ADV2010. Período: octubre 2017 a febrero 2018. Se muestran los tratamientos que mostraron efectos positivos en al menos uno de los parámetros biométricos de la planta evaluados.

3.4. ENSAYOS DE PCV DE SORGO DULCE EN CONDICIONES DE INVERNÁCULO EN PRESENCIA DE DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITROGENADA

El objetivo de esta actividad fue estudiar el efecto del suministro de diferentes dosis de fertilizante químico nitrogenado, sobre la capacidad PCV de las cepas UYSB89 y UYSB139. Este experimento se evaluó tanto en la cultivar de semilla M81E (período: octubre 2017 a febrero 2018), como en la ADV2010 (período: setiembre 2018 a enero 2019). Como fertilizante nitrogenado se utilizó urea en la concentración recomendada por la empresa proveedora de las semillas ($150 \text{ kgN.ha}^{-1}\text{urea}$), se evaluó también una dosis menor ($75 \text{ kgN.ha}^{-1}\text{urea}$).

Cultivar M81E

En primera instancia se buscó confirmar si la cultivar M81E responde a la fertilización química nitrogenada, mediante un análisis de varianza (ANOVA, p. valor $\leq 0,05$) de los tratamientos sin urea (0N), 75 kgN.ha⁻¹urea (75N) y 150 kgN.ha⁻¹urea (150N). El análisis mostró que la altura varió significativamente entre todos los tratamientos, mientras que el diámetro del tallo, el peso seco aéreo y radicular, se diferenciaron significativamente entre el tratamiento 0N y los tratamientos 75N y 150N (Tabla 7, figura 19). Por lo tanto, se confirmó que la cultivar M81E respondió favorablemente a la aplicación de fertilizante químico en dosis bajas, pero la respuesta fue más moderada al duplicar la dosis.

Tabla 7. Respuesta de plantas de sorgo dulce cultivar M81E a las diferentes dosis de urea aplicada.

	0N		75N		150N	
Altura (cm)	24,10±3,51	A*	39,60±6,60	B	48,90±7,69	C
Diámetro (mm)	6,42±0,80	A	8,06±0,51	B	7,71±0,70	B
Peso seco radicular (gr)	2,22±0,68	A	2,93±0,60	B	3,62±1,53	B
Peso seco aéreo(gr)	2,36±0,60	A	5,72±1,16	B	6,44±1,60	B

*Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test estadístico LSD, p. valor $\leq 0,05$.

El siguiente paso fue estudiar el efecto combinado de la inoculación y las diferentes dosis de fertilizante químico empleado. Para ello se realizaron análisis de contrastes de grupos para todos los parámetros evaluados (Tabla 8). En el contraste 1 se evaluó solamente el efecto de la inoculación, mientras que en los contrastes 2 y 3 se evaluó el efecto de la inoculación cuando también es aplicado fertilizante químico a dosis 75N y 150N, respectivamente. Este estudio se realizó estudiando en conjunto las dos cepas. El análisis de contraste del parámetro altura, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) solamente en el contraste 1, es decir que el efecto de la cepa sobre este parámetro se observó solamente cuando fue inoculado sin presencia de fertilizante. Por otra parte, los contrastes para los parámetros diámetro y peso seco radicular, no mostraron diferencias significativas en ninguno de los contrastes, por lo tanto, la inoculación no

tuvo efecto sobre estos parámetros cuando se ensayó sola (contraste 1) o en conjunto con el fertilizante (contrastes 2 y 3). Por otro lado, el parámetro peso seco aéreo mostró diferencias significativas en el contraste 3, lo cual indica que la inoculación a dosis de fertilizante 150N incrementó los valores del peso seco aéreo cuando se lo comparó con el tratamiento 150N.

Tabla 8. Análisis de contrastes de grupos para estudiar el efecto combinado de la inoculación y la aplicación de urea sobre la altura de plantas de sorgo dulce cultivar M81E.

Contraste			Altura (p. valor)	Diámetro (p. valor)	peso seco aéreo (p. valor)	peso seco radicular (p. valor)
1	sin inocular / 0N	vs. UYSB89 / 0N y UYSB139 / 0N	0,0002	0,1320	0,1220	0,7655
2	Sin inocular / 75N	vs. UYSB89 / 75N y UYSB139 / 75N	0,7716	0,6354	0,5207	0,8119
3	Sin inocular / 150N	vs. UYSB89 / 150N y UYSB139 / 150N	0,3485	0,8591	0,0081	0,8108

Posteriormente, se procedió a estudiar el efecto PCV de cada cepa en particular, bajo las distintas condiciones de fertilización química. Para evaluar el efecto de la cepa UYSB89, se compararon todos los tratamientos fertilizados sin inocular e inoculados con la cepa (Figura 17 y 19). El ANOVA ($p. \text{valor} \leq 0,05$) mostró que existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos en la altura y el peso seco aéreo. Por una parte, el tratamiento UYSB89/0N mostró una altura significativamente mayor que la del tratamiento 0N. A su vez, dicho tratamiento mostró valores de altura y peso seco aéreo significativamente más bajos que los tratamientos 75N, UYSB89/75N, 150N y UYSB89/150N. Por otra parte, el tratamiento UYSB89/75N no mostró diferencias significativas con el tratamiento 75N, en ningún parámetro. Sin embargo, su altura fue significativamente menores que la del tratamiento 150N y UYSB89/150N, mientras que su peso seco aéreo no mostró diferencias con el tratamiento 150N y fue significativamente menor que el del tratamiento UYSB89/150N. Asimismo, el tratamiento UYSB89/150N no se diferenció significativamente del tratamiento 150N.

Por lo tanto, los análisis estadísticos indican que hubo efecto PCV de la cultivar M81E por parte de la cepa UYSB89, sin embargo dicho efecto se vio enmascarado cuando la planta fue fertilizada.

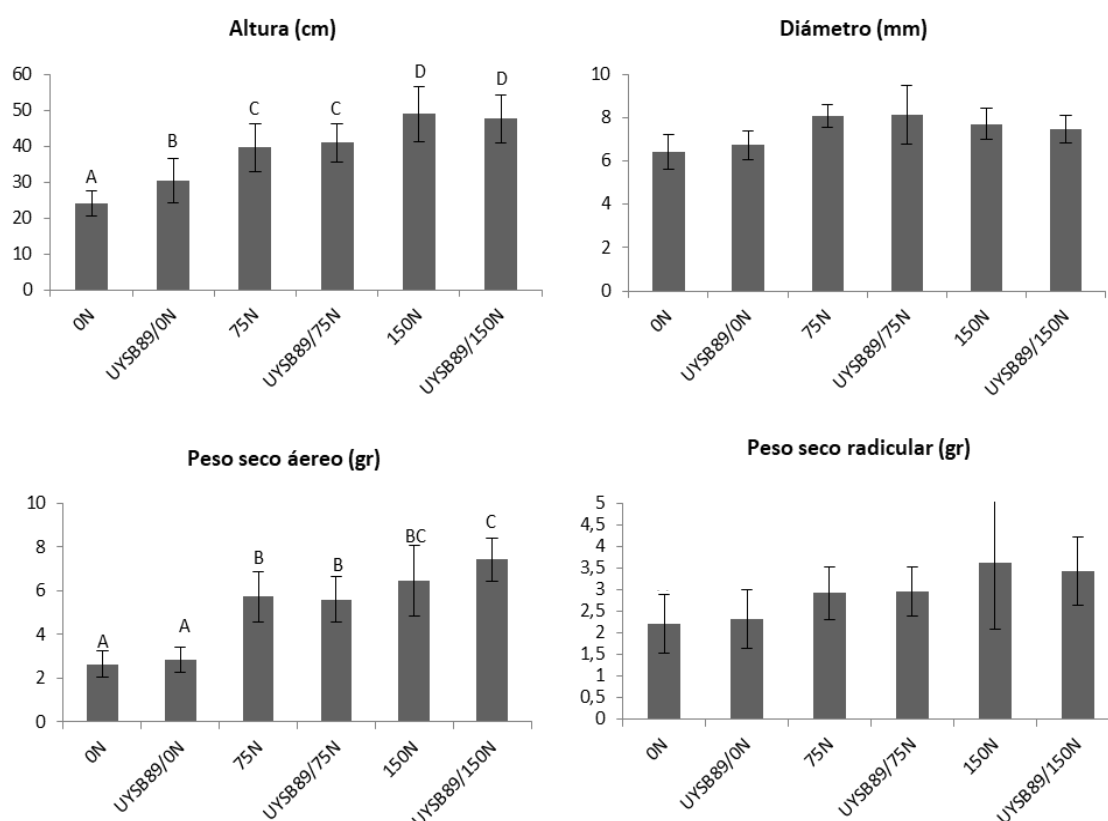


Figura 17. Ensayos de PCV de la cepa UYSB89 en plantas de sorgo dulce cultivar M81E crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: octubre 2017 a febrero 2018. Se muestra el promedio de 10 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test estadístico LSD (p. valor $\leq 0,05$).

Con respecto a la cepa UYSB139, los resultados del ANOVA (p. valor $\leq 0,05$) para todos los tratamientos fertilizados sin inocular, e inoculados con la cepa UYSB139 (Figura 18 y 19), mostraron que hubo diferencias significativas en la altura y peso seco aéreo. El tratamiento UYSB139/ON tuvo valores significativamente más altos que el tratamiento ON en la altura. Además, su valor de peso seco aéreo fue significativamente menor que el del tratamiento 75N, UYSB139/75N, 150N y UYSB139/150N, mientras que su altura fue significativamente menor que los tratamientos 150N y UYSB139/150N. Por otra parte, el tratamiento UYSB139/75N no presentó diferencias significativas con tratamiento 75N para ninguno de los parámetros evaluados y su altura y peso seco

aéreo fue significativamente menor que el tratamiento UYSB139/150N. Finalmente, el tratamiento UYSB139/150N tuvo una altura significativamente mayor que el tratamiento 150N. En conjunto los análisis estadísticos indican que la cepa UYSB139 es PCV de la cultivar M81E, tanto cuando es aplicada sola como cuando se aplica junto con fertilizante nitrogenado químico a dosis 150N.

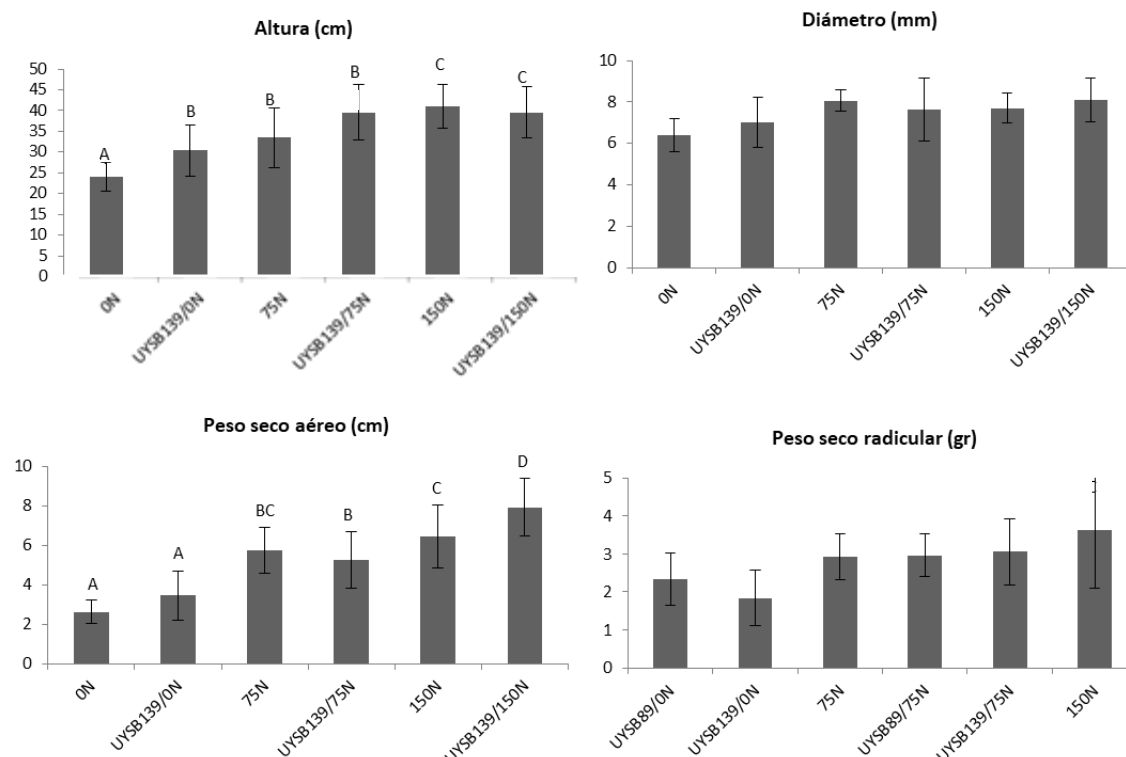


Figura 18. Ensayos de PCV de la cepa UYSB139 en sorgo dulce cultivar M81E crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: octubre 2017 a febrero 2018. Se muestra el promedio de 10 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test estadístico LSD (p. valor $\leq 0,05$).

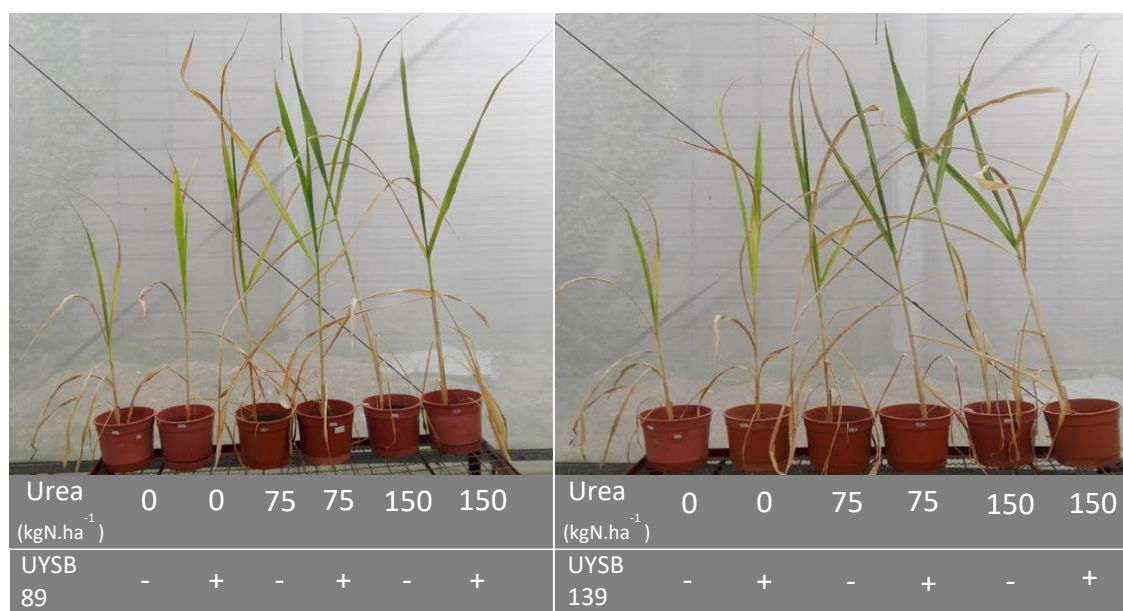


Figura 19. Fotografías del ensayo de evaluación conjunta de la respuesta de plantas de sorgo dulce (cv. M81E) a la inoculación bacteriana y diferentes niveles de fertilización química nitrogenada. (+) indica que la planta fue inoculada con la cepa. (-) indica que la planta no fue inoculada con la cepa. Período: octubre 2017 a febrero 2018.

Cultivar ADV2010

En cuanto al ensayo de respuesta a la fertilización química nitrogenada por parte de la cultivar ADV2010, el resultado del ANOVA (p valor $\leq 0,05$) mostró que el peso seco radicular varió significativamente entre los tratamientos 0N y 75N, mientras que la altura lo hizo entre los tratamiento 0N y 150N. En cuanto al peso seco aéreo, hubo diferencias significativas entre el tratamiento 0N y los tratamientos 75N y 150N. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el diámetro del tallo de los distintos tratamientos. Por otra parte, los tratamientos 75N y 150N no mostraron diferencias significativas entre sí, en ninguno de los parámetros biométricos estudiados (tabla 9, figura 22). Por lo tanto, se comprobó que la respuesta de la planta a la fertilización química fue parcial y que duplicar la concentración de fertilizante no repercutió sobre el desarrollo de la planta.

Tabla 9. Respuesta de plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010 a las diferentes dosis de urea aplicada.

	ON	75N	150N
Altura (cm)	20,28±3,09 A*	22,78±4,32 AB	24,06±4,11 B
Diámetro (mm)	5,71±0,76	5,89±0,72	6,20±0,88
Peso seco radicular (gr)	1,37±0,57 A	2,30±1,06 B	1,68±0,53 AB
Peso seco aéreo (gr)	1,93±0,66 A	3,03±1,25 B	3,08±1,05 B

*Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test estadístico LSD, p. valor $\leq 0,05$.

Con el fin de analizar el efecto de la inoculación en conjunto con el fertilizante químico nitrogenado, se realizaron análisis de contrastes de grupos para todos los parámetros evaluados (Tabla 10). Este estudio se realizó evaluando los tratamientos con las dos cepas. El análisis de contrastes del parámetro altura, mostró diferencias significativas (p. valor $\leq 0,05$) en los contrastes 1 y 2, es decir que la inoculación, tanto cuando se aplicó sola o en conjunto con fertilizante a dosis 75N, repercutió sobre la altura de la planta. Por otra parte, el análisis de contraste del diámetro del tallo mostró diferencias significativas en los contrastes 2 y 3, lo cual significa que la inoculación no repercutió sobre este parámetro cuando fue aplicada sola, pero si lo hizo cuando se aplicó en conjunto con el fertilizante químico. En cuanto al peso seco aéreo, no hubo diferencias significativas en ninguno de los contrastes, indicando que la inoculación no tuvo un efecto sobre este parámetro. Por último, el análisis de contrastes para el parámetro peso seco radicular mostró diferencias significativas positivas en los contrastes 1 y 3, por lo tanto, la inoculación tuvo un efecto sobre el peso seco radicular cuando fue aplicada sola o en conjunto con el fertilizante químico a dosis 150.

Tabla 10. Análisis de contrastes de grupos para estudiar el efecto de la interacción de la inoculación y la aplicación de urea sobre plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010.

Contraste			Altura (p. valor)	Diámetro (p. valor)	peso seco aéreo (p. valor)	peso seco radicular (p. valor)
1	sin inocular / 0N	vs. UYSB89 / 0N y UYSB139 / 0N	0,0369	0,0883	0,1936	0,0103
2	sin inocular / 75N	vs. UYSB89 / 75N y UYSB139 / 75N	0,0468	0,0023	0,6508	0,0799
3	sin inocular / 150N	vs. UYSB89 / 150N y UYSB139 / 150N	0,1291	0,0002	0,1918	0,0001

A continuación, se estudió el efecto de la inoculación con la cepa UYSB89 mediante un ANOVA (p. valor $\leq 0,05$), comparándose los tratamientos fertilizados sin inocular e inoculados con dicha cepa (Figura 20 y 22). Los resultados del análisis mostraron que los tratamientos se diferenciaron significativamente en los parámetros altura, diámetro y peso seco radicular. El tratamiento UYSB89/0N tuvo un valor de altura significativamente más elevado que el tratamiento 0N. Por otra parte, dicho tratamiento no mostró diferencias significativas con los tratamientos 75N y UYSB89/75N en ninguno de los parámetros evaluados y tuvo un valor de diámetro significativamente menor que el tratamiento UYSB89/150N. En cuanto al tratamiento UYSB89/75N, no tuvo diferencias significativas con el tratamiento 75N en ninguno de los parámetros evaluados, y mostró un diámetro del tallo significativamente menor que el tratamiento UYSB89/150N. Asimismo, el tratamiento UYSB89/150N mostró valores del diámetro del tallo y peso seco radicular significativamente mayores que el tratamiento 150N.

A partir de los resultados se demostró que la cepa UYSB89 es PCV de esta cultivar, logrando los mismos resultados que cuando se aplicó fertilizante químico nitrogenado, en ambas dosis ensayadas. Además, se obtuvieron mejores resultados inoculando con la cepa y aplicando fertilizante a dosis 75N, que cuando se aplica fertilizante a dosis 150N. Finalmente, se constató que al inocular con la cepa UYSB89 y aplicar en

conjunto 150N de fertilizante, se obtuvieron mejores resultados que al aplicarlas independientemente.

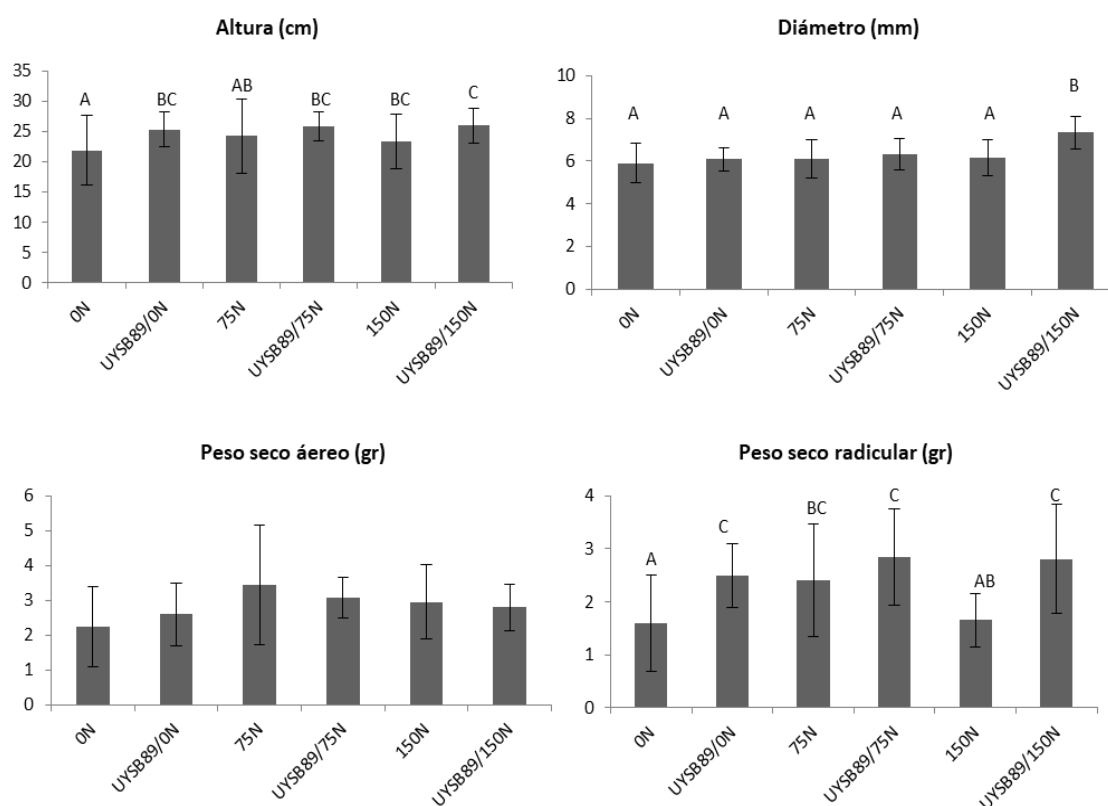


Figura 20. Ensayos de PCV de la cepa UYSB89 en sorgo dulce cultivar ADV2010 crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: setiembre 2018 a enero 2019. Se muestra el promedio de 10 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test estadístico LSD, p. valor $\leq 0,05$

Finalmente, se estudió el efecto de la inoculación con la cepa UYSB139, mediante un ANOVA (p. valor $\leq 0,05$), comparándose los tratamientos fertilizados sin inocular e inoculados con la cepa (Figura 21 y 22). Los resultados del análisis mostraron que los tratamientos se diferenciaron significativamente en todos los parámetros evaluados. En cuanto al tratamiento UYSB89/0N, el valor del diámetro del tallo fue significativamente mayor que del tratamiento 0N. Asimismo, se observó que dicho tratamiento presentó valores de peso seco aéreo y radicular significativamente menores que los tratamientos UYSB139/75N y UYSB139/150N. Por otra parte, el tratamiento UYSB139/75N tuvo un diámetro del tallo significativamente mayor que el

tratamiento 75N y su valor de peso seco aéreo fue significativamente menor que el del tratamiento UYSB139/150N. En cuanto al tratamiento UYSB139/150N, mostró valores significativamente mayores en el diámetro, peso seco aéreo y radicular que el tratamiento 150N. Estos resultados indican que la cepa UYSB139 es PCV de la cultivar ADV2010, incluso cuando la planta fue fertilizada con dosis elevadas de urea. Además, se observó que inocular con la cepa en conjunto con aplicar fertilizante a dosis 75N, tuvo mejores resultados que fertilizar a dosis 150N, en los parámetros diámetro del tallo y peso seco radicular.

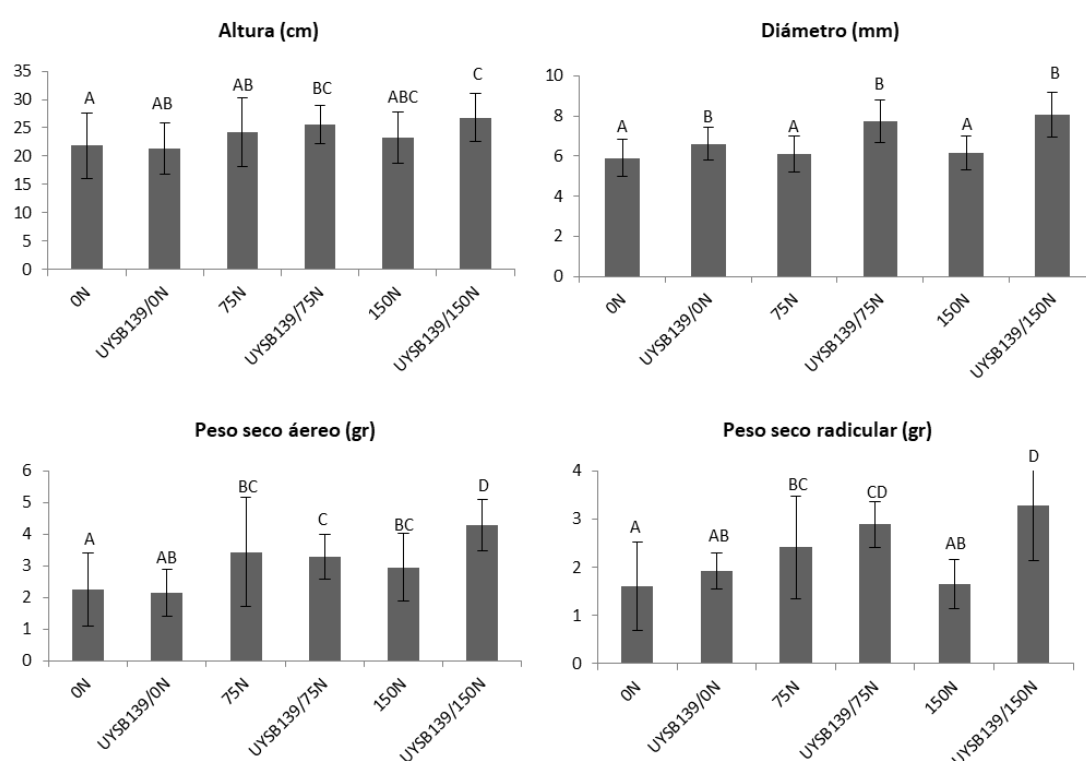


Figura 21. Ensayos de PCV de la cepa UYSB139 en sorgo dulce cultivar ADV2010 crecidas con diferentes dosis de fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo. Período: setiembre 2018 a enero 2019. Se muestra el promedio de 10 réplicas/tratamiento con su barra de desvío estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test estadístico LSD, p. valor $\leq 0,05$

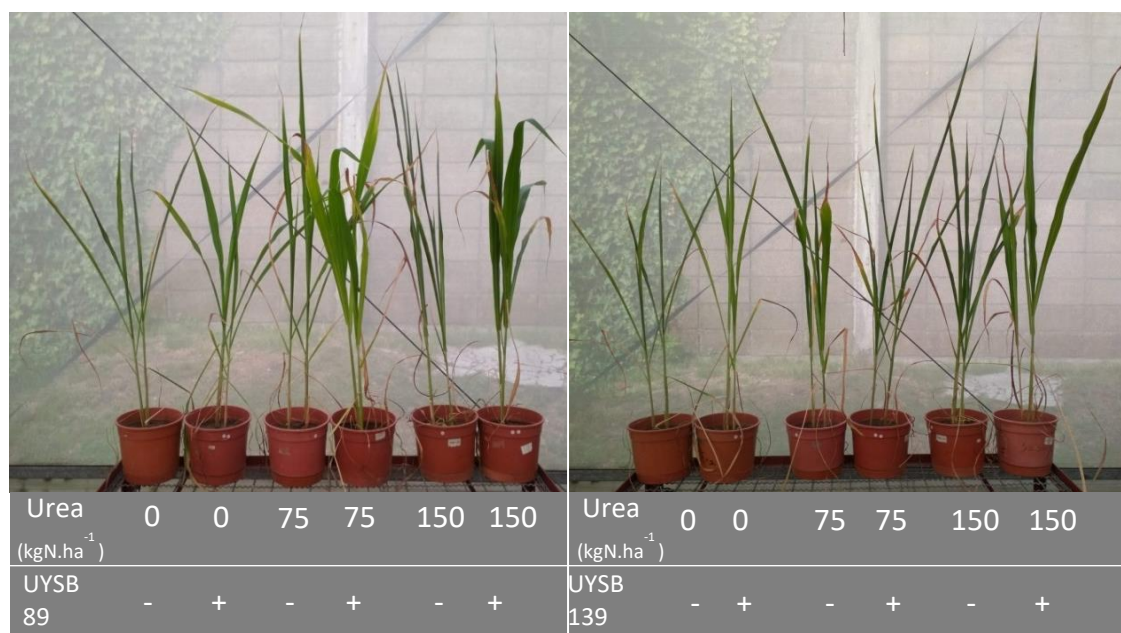


Figura 22. Fotografías del ensayo de evaluación conjunta de la respuesta de plantas de sorgo dulce (cv. ADV2010) a la inoculación bacteriana y diferentes niveles de fertilización química nitrogenada. (+) indica que la planta fue inoculada con la cepa. (-) indica que la planta no fue inoculada con la cepa. Período: setiembre 2018 a enero 2019.

3.4. COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE PLANTAS DE SORGO DULCE (CV. M81E) POR LA CEPAS *KOSAKONIA SP.* UYSB89, *BACILLUS SP.* UYSB119 Y *KOSAKONIA SP.* UYSB139

En esta actividad se estudió la naturaleza de la interacción entre plantas de sorgo dulce (cv. M81E) y las cepas *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y *Kosakonia sp.* UYSB139. Para esto, se analizaron imágenes de cortes de raíz inoculadas con cepas transformadas con el plásmido pH60, obtenidas mediante MCF. Asimismo se realizaron recuentos de las cepas inoculadas a partir de los tejidos internos de las raíces esterilizadas en su superficie.

3.4.1. CONJUGACIÓN DE LAS CEPAS CON EL PLÁSMIDO pHC60

Las cepas *Kosakonia* sp. UYSB89, *Bacillus* sp. UYSB119 y *Kosakonia* sp. UYSB139 incorporaron el plásmido pHC60, mediante conjugación. Para poder seguir el proceso de transformación, seleccionando las colonias que incorporaron el plásmido pHC60 el cual confiere resistencia a tetraciclina, se estudió previamente la sensibilidad natural de las cepas frente a distintas dosis de antibióticos (tabla 11).

Tabla 11. Resistencia/sensibilidad de las cepas a diferentes antibióticos.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Cepa			
		UYSB89	UYSB119	UYSB139	<i>E.Coli</i> S-17
Tetraciclina	10	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
Spectromicina	25	-	+	+	N.D
	100	-	+	-	N.D
Kanamicina	25	-	+	-	N.D
	100	-	+	-	N.D
Ampicilina	25	+	+	+	-
	100	+	+	+	-

(-) la cepa es sensible al antibiótico; (+) la cepa es resistente; (N.D) la resistencia no fue determinada.

En base a los resultados obtenidos, se realizó la selección de las cepas transformadas en medio de cultivo LB suplementado con el antibiótico tetraciclina (25 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). La tetraciclina permite seleccionar las cepas transformadas con el plásmido, ya que las cepas de la colección y *E.coli* demostraron ser sensibles a este, mientras que el plásmido confiere resistencia para este antibiótico, por lo cual

solamente las células que incorporaron el plásmido podrán sobrevivir. Por otro lado la ampicilina permite seleccionar a las cepas de la colección, ya que son resistentes a dicho antibiótico mientras que *E.coli* es sensible.

3.4.2. RECuentOS DE BACTERIAS UYSB89, UYSB119 Y UYSB139 EN EL TEJIDO RADICULAR DE PLANTAS INOCULADAS

Los recuentos bacterianos fueron realizados a partir del material vegetal radicular de plantas inoculadas con las cepas UYSB89, UYSB119 y UYSB139. La cosecha de las plantas fue realizada a las 4, 19, 48 y 144 hs postinoculación (pi.). En los tres tratamientos evaluados se observó un incremento en la abundancia de bacterias en el tejido radicular conforme transcurrieron las horas. Para el tratamiento en el cual se inocularon las plantas de sorgo con la cepa UYSB139, a las 4hs pi la población bacteriana fue de $5,9 \times 10^3$ UFC/g de tejido de raíz, hasta llegar $7,2 \times 10^5$ UFC/g de tejido de raíz a las 144 hs pi (figura 23). Para el caso del tratamiento en el cual se inocularon las plantas con la cepa UYSB119, la población bacteriana paso de $1,9 \times 10^3$ UFC/mg de tejido de raíz a las 4hs pi a $1,2 \times 10^5$ UFC/g de tejido de raíz a las 144hs pi (figura 24). Finalmente, en el tratamiento con la cepa UYSB89, la población bacteriana fue de $2,1 \times 10^4$ UFC/g de tejido de raíz a las 4hs pi, y de $5,0 \times 10^5$ UFC/g de tejido de raíz a las 144 hs pi (figura 25). Los recuentos del control negativo fueron a todos los tiempos de cosecha 0 UFC/g de tejido de raíz.

3.4.3. ANÁLISIS DE MICROGRAFÍAS DE FLORESCENCIAS DE PLANTAS INOCULADAS

Los estudios de visualización del proceso de infección bacteriana a lo largo del tiempo lograron evidenciar la presencia de bacterias en el interior de los tejidos radiculares de las plantas inoculadas con las cepas UYSB89, UYSB119 y UYSB139.

Cepa *Kosakonia* sp. UYSB139

El análisis mostró la presencia de las bacterias distribuidas de forma dispersa sobre la epidermis radicular a las 4 hs pi (figura 23). Transcurridas 16 hs pi., la densidad de bacterias en la superficie radicular aumentó, y se observaron numerosas células bacterianas adheridas a la superficie de pelos radiculares y en los espacios intercelulares del córtex radicular. Posteriormente, a las 19 hs pi. se observaron acúmulos bacterianos adheridos a la superficie radicular, posiblemente formando biopelículas. Además, se visualizó un aumento en el número de bacterias colonizando los espacios intercelulares del córtex. Asimismo, a las 48 y 72 hs pi., aumentó el número de bacterias que colonizan los espacios intercelulares del tejido radicular, así como su dispersión en los tejidos. Por último, a las 144 hs pi., los cortes longitudinales mostraron que el tejido vegetal se encuentra densamente poblado por células bacterianas. En cortes transversales fue posible observar la presencia de bacterias colonizando el cilindro vascular.

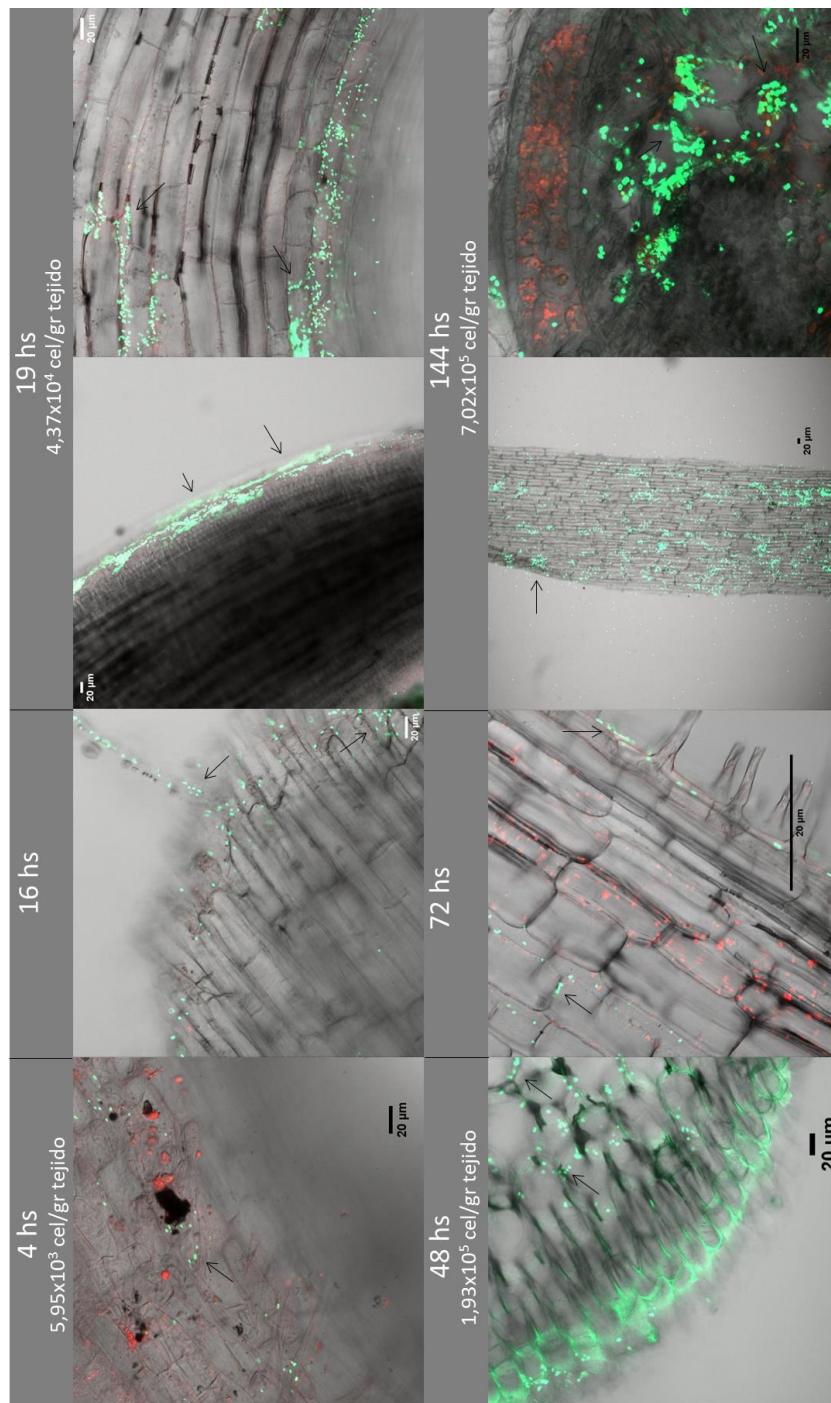


Figura 23. Colonización e infección de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, inoculadas con la cepa UYSB139. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un MCF, mientras que los doatos de abundancia bacteriana fue obtenida por recuento en placa. En verde se visualizan las bacterias (transformadas con el plásmido pH60-gfp), en rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la luz transmitida. Con flechas se señalan sitios donde es posible visualizar bacterias.

Cepa *Bacillus* sp. UYSB119

El análisis de las micrografías y del recuento bacteriano para la cepa UYSB119 mostró que en las primeras 4 hs pi. hubo una escasa presencia de las bacterias en la epidermis del tejido radicular (figura 24). En la imagen se puede apreciar una célula bacteriana adherida a la base de un pelo radicular, posiblemente el sitio por donde ingresará a los tejidos internos de la raíz. Transcurridas 16 hs pi. el número de bacterias aumentó considerablemente, observándose una gran cantidad adherida a la superficie y a los pelos radiculares. A las 19 y 24 hs pi., la cantidad de bacterias adheridas a la superficie continúa aumentando, observándose en cortes transversales la presencia de bacterias en los espacios intercelulares de las células del córtex radicular. Transcurridas 72 hs pi. se visualizó la presencia de bacterias colonizando densamente gran parte del tejido, inclusive en la región de los haces vasculares. Por último, a las 144 hs pi., en el corte longitudinal se observan las bacterias dispersas por todo el tejido, y se encontraron nuevamente en la región de los haces vasculares.

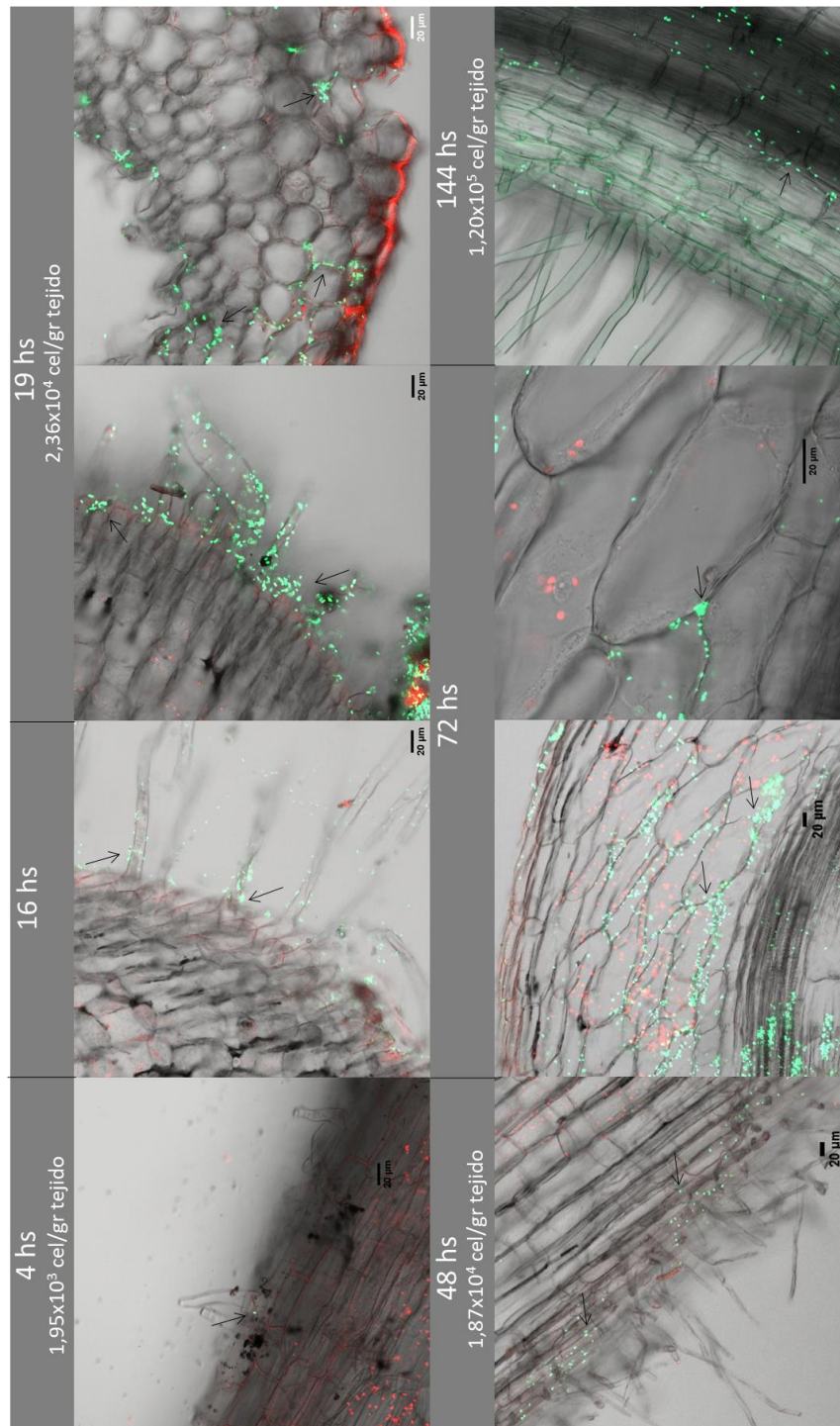


Figura 24. Colonización e infección de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, inoculadas con la cepa UYSB119. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un MCF, mientras que la densidad bacteriana fue obtenida por recuento en placa. En verde se visualizan las bacterias (transformadas con el plásmido pH60-gfp), en rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la luz transmitida. Con flechas se señalan sitios donde es posible visualizar bacterias.

Cepa Kosakonia sp. UYSB89

A partir del análisis de las imágenes del tejido radicular de plantas inoculadas con la cepa UYSB89, se puede apreciar como a las 4 hs pi. hay bacterias colonizando los espacios intercelulares del córtex radicular (Figura 25). Posteriormente, a las 48 hs pi., las células bacterianas forman una aparente biopelícula en la superficie de la epidermis de la raíz y también se observan adheridas a la base de los pelos radiculares. En dicha fotografía se señala con flecha una región en donde está interrumpida la continuidad de la epidermis y se localizan numerosas bacterias, probablemente intentando ingresar al tejido aprovechando la apertura de la epidermis. Por último, a las 144 hs pi. se observan acúmulos de bacterias en los espacios intercelulares del córtex.

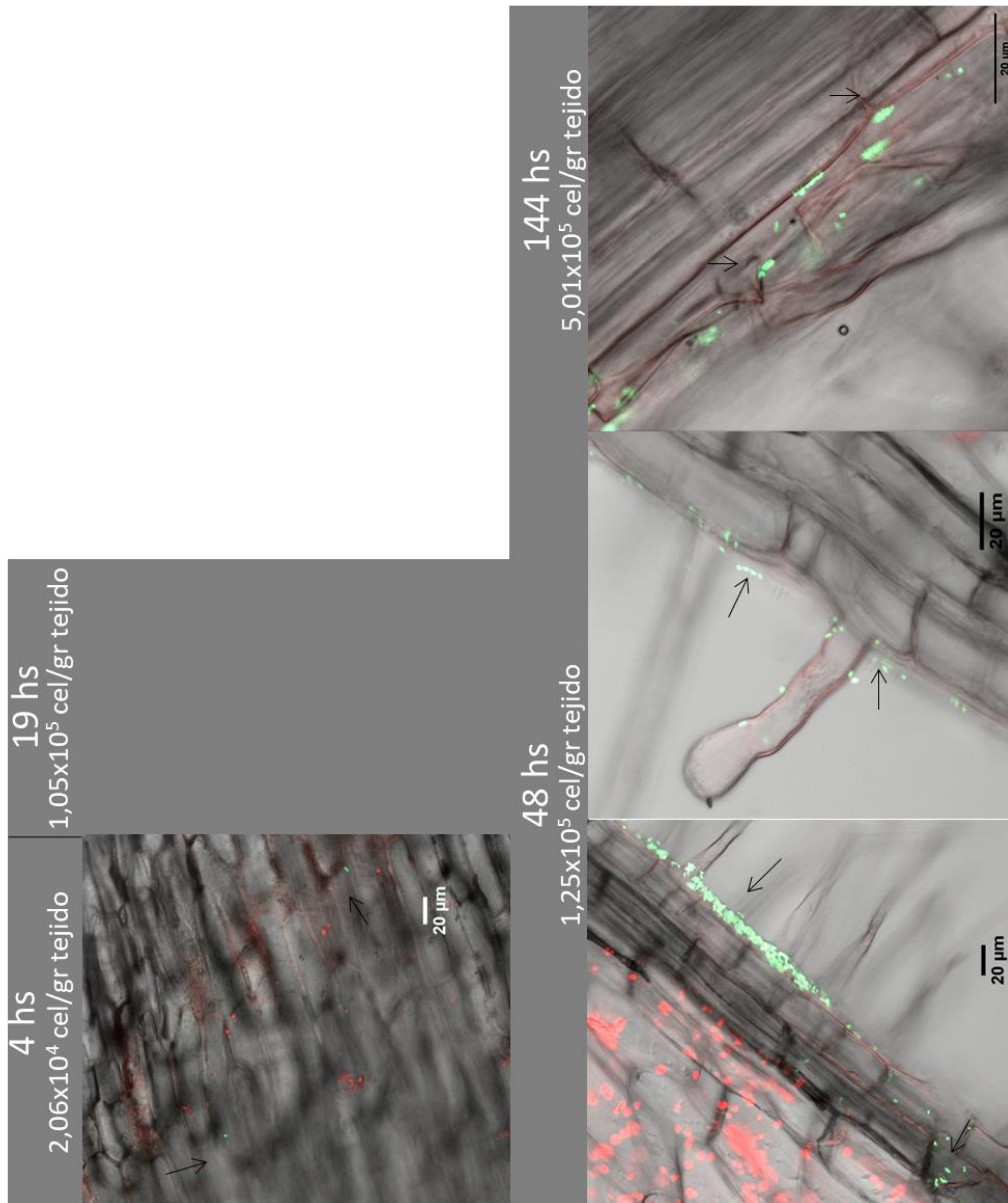


Figura 25. Colonización e infección de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, inoculadas con la cepa UYSB89. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un MCF, mientras que la densidad bacteriana fue obtenida por recuento en placa. En verde se visualizan las bacterias (transformadas con el plásmido pH60-gfp), en rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la luz transmitida. Con flechas se señalan sitios donde es posible visualizar bacterias.

3.4.3.3. Control negativo

Por otra parte, el análisis de las imágenes de los controles de plantas sin inocular mostraron la ausencia de bacterias marcadas (figura 26).

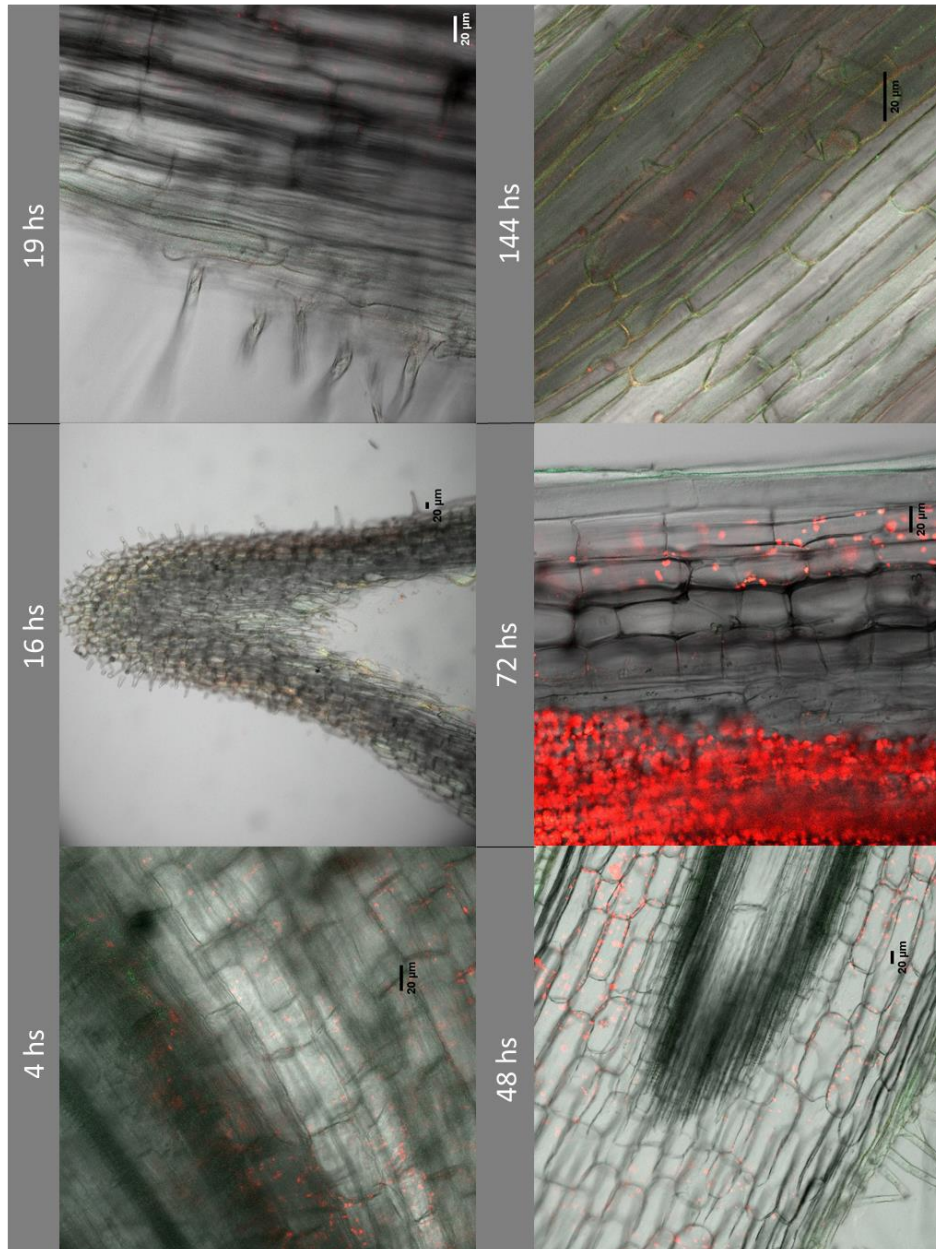


Figura 26. Imágenes del tejido radicular de plantas de sorgo dulce cultivar M81E sin inocular obtenidas mediante un MCF. En rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la luz transmitida.



4. DISCUSIÓN

Los cultivos han tenido un rol fundamental en el transcurso de la historia de la humanidad, posibilitando el desarrollo de la civilización tal como la conocemos en el presente. Sin duda, en ese sentido, las gramíneas (*Poaceae*) asumieron un papel protagónico que conservan hasta hoy en día, siendo la familia de plantas de mayor importancia económica mundial. En las últimas décadas, a partir del aumento exponencial de la población mundial, se incrementó la producción de muchos cultivos pertenecientes a esta familia, como el maíz, trigo, arroz, cebada, caña de azúcar y sorgo dulce. Consecuentemente, aumentó también el uso de paquetes tecnológicos basados en la aplicación de fertilizantes químicos, para la optimización de la producción de dichos cultivos. Desafortunadamente, la aplicación excesiva de fertilizantes químicos ocasiona grandes efectos negativos sobre los ecosistemas, como son el empobrecimiento de los suelos, la eutrofización de los cuerpos de agua, la pérdida de diversidad y el aumento en la emisión de gases de efecto invernadero (102). Este panorama hace necesaria la búsqueda de alternativas al modelo agrícola actual que logren mitigar el impacto de las actividades antropogénicas sobre el medio ambiente. En este contexto, el uso de bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal, particularmente las diazótrofes, es considerado una excelente alternativa para el suministro nutricional de cultivos pertenecientes a la familia *Poaceae* (9, 114). Es por eso que esta tesis se focalizó en el estudio de bacterias endófitas diazótrofes como posible inoculante de sorgo dulce.

4.1. DIAZOTROFÍA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ASOCIADOS A PLANTAS DE SORGO DULCE

El aislamiento y uso de bacterias diazótrofes en plantas no leguminosas ha sido un tema en boga en el campo de estudio de la FBN durante décadas, se ha reportado a lo largo de los años numerosos géneros bacterianos endófitos con actividad diazotrófica (8, 53, 164).

La técnica ARA, es un método simple, sensible y rápido que permite evaluar la actividad de la enzima nitrogenasa y cuantificar la capacidad FBN (73, 74). Para lograr determinar dicha actividad en las bacterias diazotróficas, es fundamental considerar las condiciones fisicoquímicas en las que se va a medir, principalmente el pH, la presión de oxígeno, la fuente de carbono y la concentración de nitrógeno del medio de cultivo (12, 83, 87, 117, 167).

En esta tesis, en primer lugar se evaluaron las condiciones óptimas en las que cada cepa presenta actividad nitrogenasa, para luego cuantificar dicha actividad mediante la técnica de ARA. En este sentido, las 8 cepas en estudio seleccionadas presentaban el gen *nifH* y crecían en forma de película en medio semisólido sin nitrógeno (75), por lo que era de esperar que se lograra medir la actividad nitrogenasa si se hallaban las condiciones óptimas de expresión. Los resultados mostraron que después de optimizar la técnica para cada cepa en particular, se pudo determinar la actividad para 7 de las 8 cepas estudiadas demostrando excelentes resultados.

Las cepas estudiadas pertenecen a los géneros *Kosakonia*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Staphylococcus*. Si bien en la mayoría de los géneros evaluados existen reportes previos de especies fijadoras de nitrógeno (34, 64, 92), no hay registros específicos de la capacidad de FBN por parte de cepas pertenecientes a las especies *Kosakonia cowani*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus megaterium* ni *Staphylococcus warrerii*. Particularmente, análisis genómicos y fisiológicos demostraron que cepas de la especie *Kosakonia radicincitans* presentan el operon *nif* (codificante para la enzima Fe-Mo-nitrogenasa), así como actividad nitrogenasa y que está involucrada en la promoción del crecimiento vegetal (149, 155).

De las cepas ensayadas, la única a la cual no se le pudo determinar las condiciones para la actividad nitrogenasa fue la cepa *Kosakonia sp.* UYSB139, a pesar de que dicha cepa logró crecer en medios de cultivo con ausencia de nitrógeno y a diferentes concentraciones de oxígeno. Para lograrlo, posiblemente se deban ensayar medios de cultivos con otras fuentes de carbono no evaluadas en esta tesis o suplementar con molibdeno y/o vanadio, elementos estructurales de los sitios activos de la nitrogenasa necesarios para una correcta funcionalidad de la enzima (76, 109).

Por otra parte, se debe tener en cuenta que si bien el ensayo de ARA es una técnica rápida, no es la más efectiva por presentar una elevada variabilidad. En este sentido,

sería recomendable calibrar el procedimiento de reducción de acetileno utilizando el método de N¹⁵, para validar la técnica como método para cuantificar la FBN (107).

4.2. BACTERIAS DIAZÓTROFAS PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL DE CULTIVARES DE SORGO DULCE

Dado que la eficacia de una bacteria para PCV depende de la especificidad de interacción con el huésped y de las condiciones físico-ambientales, es necesario emplear bacterias adaptadas a las cultivares y a las condiciones de plantación del cultivo específicas para cada lugar (14). El estudio *in vitro* de las características PCV de aislamientos bacterianos, combinados con experimentos de inoculación de plantas en diferentes condiciones, permite revelar el potencial uso biotecnológico de dichas bacterias como inoculantes.

En el caso del cultivo de sorgo dulce, diferentes estudios realizados en India, Brasil y Indonesia reportaron colecciones de bacterias PCV asociadas a e (15, 42, 52, 62). Particularmente en Brasil se ha reportado la capacidad de las cepas *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum seropedicae* e inoculantes combinados de *Burkholderia* sp. con *Herbaspirillum* sp., de ser PCV de sorgo dulce en condiciones de invernáculo y de campo (48, 114). Por otra parte, estudios en Namibia reportaron que bacterias asociadas a sorgo dulce, pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Paenibacillus*, fueron PCV *in vitro* y en invernáculo (67, 68). En Uruguay, bacterias aisladas a partir de plantas de sorgo dulce de la cultivar M81E, capaces de PCV *in vitro* y pertenecientes a diferentes géneros, incluyendo *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Herbaspirillum*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Chryseobacterium*, *Kocuria*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Staphylococcus*, demostraron potencialidad de ser utilizados como inoculantes para este cultivo (98).

En esta tesis se estudió la capacidad de PCV en plantas de sorgo dulce, por parte de aislamientos bacterianos. Dichos aislamientos pertenecen a una colección de bacterias aisladas a partir de los tejidos internos de plantas de sorgo dulce cultivar M81E,

cultivadas en Bella Unión, Uruguay (75), los cuales fueron seleccionadas en base a sus características PCV *in vitro* y su filiación filogenética.

Como primera aproximación, se buscó simplificar el sistema lo máximo posible y evaluar el efecto PCV de plantas de sorgo dulce, por parte de las cepas, bajo condiciones controladas de laboratorio. Una vez conocidos los efectos de la inoculación en condiciones *gnotobióticas*, se pasó a un sistema más complejo en condiciones de invernáculo, donde el desempeño de las bacterias inoculadas se ve influenciado por la comunidad de microorganismos que habita el sustrato. Los resultados de estos estudios sentaron las bases para futuros ensayos en sistemas más complejos, por ejemplo a nivel de campo.

Se seleccionaron 38 aislamientos para ser evaluados como inoculantes en plantas de sorgo dulce cv. M81E bajo condiciones *gnotobióticas*. La medición de las variables biométricas de la planta a los 20 días post-inoculación mostró que 4 aislamientos promovieron significativamente el crecimiento de las plantas en al menos uno de los parámetros evaluados. Teniendo en cuenta las caracterizaciones *in vitro* realizadas previamente (75), se podría especular que la capacidad PCV de las cepas *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y UYSB93, podría deberse a su capacidad de FBN y/o a la producción de auxinas. Es de destacar que la cepa *Kosakonia sp.* UYSB139 fue aislada a partir de semilla, lo cual es indicativo de su capacidad de dispersión dentro de la planta y de transmitirse verticalmente a las siguientes generaciones, ambos factores son relevantes a la hora de seleccionar cepas para el desarrollo de inoculantes. Por otra parte, la capacidad PCV de la cepa *Kosakonia sp.* UYSB106, puede deberse a su capacidad FBN y de solubilización de fosfatos. Sin duda, es necesario realizar experimentos adicionales para corroborar dichas hipótesis.

A partir de los resultados de PCV en condiciones *gnotobióticas*, se seleccionaron tres cepas para ser evaluadas en condiciones de invernáculo: *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y *Kosakonia sp.* UYSB139. En esta instancia el ensayo se realizó en dos cultivares de sorgo dulce cultivadas en Uruguay, M81E y ADV2010. La cultivar M81E es a partir de la cual se construyó la colección bacteriana (75, 98), y era la utilizada en Uruguay para la producción de bioetanol (101, 105). Actualmente, su uso por parte de la empresa ALUR S.A. ha decaído, ya que comenzaron a emplear la

cultivar ADV2010, por lo que se decidió realizar nuestros estudios también en esta cultivar.

Los resultados mostraron que a los 4 meses pi, las cepas UYSB89, UYSB119 y UYSB139 fueron PCV en algunas de las variables biométricas evaluadas. En términos generales, el ensayo realizado en la cultivar M81E mostró rendimientos más bajos que el realizado en la cultivar ADV2010, inclusive para el control positivo.

La cepa UYSB89 estimuló el desarrollo radicular de las plantas de las dos cultivares ensayadas, ya que el peso seco radicular fue significativamente más alto que el del control sin inocular. Por su parte, la cepa UYSB139, cuando fue inoculada en la cultivar M81E promovió el aumento del peso seco radicular, mientras que en la cultivar ADV2010 promovió el desarrollo de la planta en general, al observarse diferencias significativas con respecto al control en todos los parámetros evaluados (peso seco radicular y aéreo, la altura y del diámetro). La diferencia en el efecto que la cepa tiene sobre las cultivares puede deberse a que los distintos genotipos de las cultivares determinan distintos tipos de interacción con la bacteria (32), siendo la interacción de la cepa UYSB139 con la cultivar ADV2010 mas benéfica que la interacción de la cultivar M81E. A su vez, el aumento en el desarrollo del sistema radicular en ambas cultivares, cuando fueron inoculadas con las cepas UYSB89 y UYSB139, puede ser debido al efecto de la auxina exógena secretada por las bacterias (75). Como consecuencia de estos efectos, es probable que la planta tenga una mayor posibilidad de adquirir agua y nutrientes en el suelo (113). Ambas cepas mencionadas fueron identificadas como pertenecientes al género *Kosakonia* (75). Debido a los cambios en la taxonomía bacteriana del género *Enterobacter* y a procesos de reclasificación, muchas de las cepas que integraban el género *Enterobacter* ahora pertenecen al recientemente definido género *Kosakonia* (22). Tal es el caso de las cepas antiguamente conocidas como *E. radicincitans* (81) y *E. cowanii* (21), ahora nombradas como *K. radicincitans* y *K. cowanii* respectivamente (22). Estudios previos han reportado el efecto PCV de cepas de *K. radicincitans* al ser inoculadas en diferentes cultivos de interés agronómico en condiciones de invernáculo y campo incluyendo: repollo (*Brassica oleracea* (53), tomate (*Solanum lycopersicum*) (16), rabanito (*Raphanus sativus*) (17), pepino (*Cucumis sativus*) (149) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (155). Sin embargo, no se han encontrado reportes de cepas de *K. cowanii* que las describan como PCV.

Particularmente en plantas sorgo dulce, estudios en Brasil reportaron el aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Kosakonia* a partir de tejidos internos de este cultivo, y su efecto PCV al ser inoculadas en condiciones de invernáculo (42).

En cuanto a la cepa *Bacillus sp.* UYSB119, los ensayos de PCV no fueron concluyentes en la cultivar M81E, ya que no se obtuvo un número suficiente de réplicas que permitiera realizar el análisis estadístico, por lo que el tratamiento se descartó. Posiblemente el bajo número de plantas sobrevivientes se deba a la baja calidad de las semillas de esta cultivar. Sin embargo, cuando dicha cepa fue inoculada en la cultivar ADV2010, las plantas mostraron un incremento en el peso seco aéreo y radicular. Nuevamente, se podría especular que el incremento del desarrollo vegetativo se deba a la producción de AIA y al aumento en la disponibilidad de nitrógeno que le provee la bacteria a la planta (75). Estudios previos demostraron el efecto PCV de una cepa de *Bacillus subtilis* al ser inoculada a plantas de sorgo dulce, la cual mejora la germinación, el índice de vigor y la calidad nutricional de las semillas, así como también el contenido de proteínas y de carbohidratos (119). Asimismo, se ha reportado la capacidad de *Bacillus sp.* SLS18 de ser PCV en condiciones de invernáculo y de captar Mn y Cd, al ser inoculada a plantas de sorgo dulce, poke indio (*Phytolacca acinosa Roxb*) y tomatillo (*Solanum nigrum L.*) (96). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería interesante profundizar en el estudio del efecto de la inoculación sobre la calidad de las semillas de sorgo dulce y estudiar la capacidad de la cepa UYSB119 de tolerar y captar metales pesados como posible uso en la remediación de suelos contaminados.

Con respecto a la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 empleada como referencia en estos experimentos, si bien ha sido reportada previamente como PCV de sorgo dulce en varios trabajos (10, 146), en los ensayos realizados en esta tesis exhibió bajos rendimientos. Dicha cepa mostró efectos significativos de PCV solamente en el peso seco aéreo en la cultivar M81E y ningún efecto en la cultivar ADV2010. Mismos resultados fueron reportados previamente en estudios realizados en Uruguay, donde plantas de sorgo dulce cv. M81E inoculadas con la cepa Sp7, no mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo en condiciones *gnotobióticas* (98). La diferencias en el efecto que tiene la cepa Sp7, al ser inoculada en diferentes cultivares y condiciones, puede deberse a una incompatibilidad entre los genotipos planta-bacteria o debido a que la cepa es mala compitiendo con la microbiota nativa del

suelo, no logrando colonizar efectivamente las raíces (90). De esta forma, queda en evidencia la relevancia de desarrollar inoculantes que estén adaptados a las cultivares y condiciones de cultivo en el país, para lograr tener rendimientos óptimos.

Considerando lo mencionado anteriormente, se puede concluir que los tres aislamientos nativos ensayados presentan potencialidad para ser utilizados como inoculantes de sorgo dulce en las cultivares utilizadas en Uruguay. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos resultados fueron obtenidos a partir de ensayos bajo condiciones controladas, por lo que en experimentos de campo, donde las condiciones no son controladas y donde se encuentran expuestos a mayores adversidades, los resultados podrían ser diferentes.

4.3 LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITROGENADA AFECTA LA PCV DE LAS BACTERIAS DIAZÓTROFAS

En condiciones de campo el efecto de la PCV de los inoculantes puede verse afectado por las condiciones ambientales, la composición fisicoquímica del suelo o la competencia con otros microorganismos, entre otros factores (50). En este sentido, cuando se trabaja particularmente con bacterias diazótrofes es preciso evaluar la óptima relación fertilizante nitrogenado-bacterias diazótrofes, ya que la actividad de la enzima nitrogenasa es inhibida cuando hay excesiva disponibilidad de nitrógeno mineral en el medio (55, 91, 166). Sin embargo, si bien un alto nivel de suministro de nitrógeno cambiando podría inhibir la FBN en algunas especies diazotróficas, esto no sucede en todas las especies ni en todas las condiciones (91, 126, 129). Por lo tanto, la PCV de microorganismos diazótrofes en condiciones de disponibilidad de nitrógeno, debe ser estudiada para cada caso en particular (55).

En este sentido, se realizaron estudios de respuesta a la inoculación con las cepas *Kosakonia radicincitans* UYSB89 y *Kosakonia cowanii* UYSB139, conjuntamente con la aplicación de diferentes dosis de fertilizante químico nitrogenado (0N, 75N y 150N), en las dos cultivares de semillas, ADV2010 y M81E. El objetivo fue, por una parte, conocer si el efecto PCV de las cepas se ve afectado por la fertilización química nitrogenada. Por otra parte, evaluar si al aplicar una concentración más baja de fertilizante químico

en conjunto con la inoculación bacteriana se logra un efecto PCV similar al que se consigue con la aplicación de la dosis de fertilizante recomendada (150N). En estos experimentos el sistema fue diseñado buscando que se asemeje a las condiciones del suelo y de cultivo en el campo, por lo cual los resultados obtenidos son un insumo fundamental a la hora de considerar estas cepas como inoculantes bacterianos de sorgo dulce.

4.3.1 CULTIVAR M81E

Se constató que las plantas de la cultivar M81E respondieron positivamente al fertilizante químico nitrogenado, cuando fue aplicado en la dosis 75N, es decir, la mitad de la dosis recomendada por el proveedor de semillas. Sin embargo, al aplicar 150N de fertilizante se observó que el efecto sobre el desarrollo de la planta fue similar a cuando se aplicó 75N, es decir que duplicar la dosis no significó obtener mejores resultados en los parámetros evaluados.

Por otra parte, se demostró que la inoculación bacteriana con las cepas UYSB89 y UYSB139 repercutió positivamente sobre el desarrollo de la planta, en ausencia de fertilizante químico. Sin embargo, los efectos de la cepa UYSB89 se vieron inhibidos cuando el inóculo fue aplicado en simultáneo con el fertilizante químico nitrogenado, con cualquiera de las dos dosis ensayadas. Este fenómeno puede deberse a que el principal mecanismo PCV de la cepa sea la FBN, la cual se pudo ver inhibida al haber disponibilidad de nitrógeno cambiando en el medio. En cuanto a la cepa UYSB139, sus efectos también se vieron inhibidos cuando se inoculó junto a 75N, sin embargo se observó PCV cuando fue inoculada junto con el fertilizante químico a dosis 150N. Debido a que es lógico esperar que si el efecto PCV no se inhibe frente a la dosis más alta de fertilizante, tampoco lo haga frente a la dosis más baja, sería necesario repetir el ensayo para constatar si el fenómeno se repite.

4.3.2 CULTIVAR ADV2010

Las plantas de la cultivar ADV2010 respondieron positivamente a la fertilización química nitrogenada. Sin embargo, su respuesta fue moderada y no homogénea, ya que no todos los parámetros biométricos evaluados respondieron. Además, se constató que duplicar la concentración de fertilizante no repercutió sobre el desarrollo de la planta bajo las condiciones ensayadas.

En cuanto a las cepas UYSB89 y UYSB139, se comprobó que la inoculación con las mismas estimuló el desarrollo vegetal, tanto en ausencia como en presencia de fertilizante químico nitrogenado. Por otra parte, se demostró que inoculando con las cepas en conjunto con la aplicación de fertilizante a dosis 75N, se obtuvieron mejores resultados para el peso radicular que cuando se aplica fertilizante a dosis 150N.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el uso de las cepas UYSB89 y UYSB139 como inoculantes microbianos para de la cultivar ADV2010, podría ser una práctica agrícola que permitiría reducir en un 50% la concentración de fertilizante químico aplicado actualmente, logrando incluso optimizar los rendimientos del cultivo. Si bien los resultados obtenidos son prometedores, hay que tener en cuenta que la relación entre los tratamientos exclusivamente fertilizados no fue demasiado clara, por lo que sería recomendable realizar una repetición de los ensayos para verificar estos resultados primarios. Por otra parte, los resultados en la cultivar M81E no fueron tan concluyentes. En dicha cultivar, la cepa UYSB139 mostró resultados prometedores.

En términos generales, es de destacar que la respuesta de las plantas, tanto a la fertilización química nitrogenada como a la inoculación bacteriana, fue diferencial según el genotipo del cultivar evaluado, se observó que en la cultivar ADV2010 la posibilidad de emplear las cepas como inoculantes es más viable que en la cultivar M81E. Posiblemente, el motivo de este comportamiento diferencial, sea debido a que la interacción planta-bacteria se encuentra fuertemente determinada por lo genotipos de ambos participantes de la interacción (32). Además, este trabajo ha demostrado que la eficacia de inoculación por las cepas está sujeta a la disponibilidad de nitrógeno

en el medio, por lo tanto fue acertado evaluar su contribución a la planta en combinación con distintos niveles de fertilización nitrogenada. En este sentido, se ha demostrado que la fertilización química nitrogenada en campo, afecta la composición de la comunidad bacteriana asociada a sorgo dulce de la cultivar M81E siendo el nitrógeno el factor principal que afecta la estructura de la comunidad bacteriana diazotrófica-endofítica (98). Teniendo en cuenta lo dicho previamente, es probable que el estado fisiológico de la planta, determinado por la disponibilidad de nutrientes en el medio, module la composición de la microbiota bacteriana asociada, reclutando bacterias específicas que atiendan sus deficiencias (30, 71). Asimismo, en ensayos realizados con dos genotipos distintos de sorgo dulce se observó que el tamaño de la población bacteriana diazótropa y el número de copias del gen *nifH* fueron menores en la rizósfera de aquellas plantas tratadas con elevadas concentraciones de fertilizantes nitrogenados que en las plantas sin fertilizar (38). En conjunto, estos trabajos resaltan el marcado efecto que la fertilización química nitrogenada tiene sobre la microbiota asociada a las plantas de sorgo dulce y sobre su efecto PCV.

Por otra parte, nuestros resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos al evaluarse el efecto combinado de la inoculación y la fertilización en sorgo dulce BR 501 y sorgo granífero linaje 9920044 de EMBRAPA (48). En dicho estudio el sorgo dulce tuvo menores rendimientos que el granífero y no respondió significativamente ni a la fertilización nitrogenada ni a la inoculación con el inoculante mixto compuesto por *Burkholderia kururiensis* y *Herbaspirillum seropedicae*. Por otra parte, el sorgo granífero respondió a la inoculación con el inoculante mixto y a la fertilización nitrogenada, cuando fueron aplicados separados o en conjunto. Los resultados en dicho cultivo indicaron que cuando se inocula, es posible reducir en un 80% la aplicación de fertilizante nitrogenado manteniendo la misma productividad de cultivo. Otros estudios en plantas de algodón demostraron que la inoculación con las cepas *Bacillus* sp. S10 y *Pseudomonas* sp. Z5, incrementó el rendimiento de la planta a niveles bajos de fertilizantes nitrogenados y potásicos, logrando superar a los rendimientos obtenidos cuando las plantas no fueron inoculadas y recibieron las dosis recomendadas de nitrógeno y potasio (165).

4.4. LAS CEPAS KOSAKONIA RADICINCITANS SP UYSB89, BACILLUS TOYONESIS SP. UYSB119 Y KOSAKONIA COWANII SP. UYSB139 SON ENDÓFITOS VERDADEROS.

En condiciones naturales las plantas se encuentran en contacto íntimo con bacterias endófitas, estableciendo interacciones que son benéficas para ambas partes. Las bacterias endófitas al colonizar las estructuras internas de las plantas, se encuentran menos expuestas a la competencia con otros organismos, están protegidas del estrés ambiental y disponen de elementos nutricionales que el hospedador les provee directamente (121). Además, al encontrarse en un ambiente con bajos niveles de O₂, se favorece la actividad óptima de la enzima nitrogenasa de aquellos endófitos diazotrofos, y pueden así beneficiar el crecimiento y desarrollo de la planta huésped a través del aporte de nitrógeno fijado (139). Aparte de la FBN, muchas bacterias endófitas diazotróficas poseen otros mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas, por ejemplo la biosíntesis y modulación de hormonas y la solubilización de minerales (40, 56, 94).

El proceso mediante el cual las bacterias adoptan el modo de vida endofítico ha sido muy estudiado, se han descrito las etapas y algunos de los mecanismos que operan para que la bacteria logre colonizar la planta. En términos generales, el proceso involucra la adhesión de las bacterias a la superficie de la raíz, la infección bacteriana de los tejidos y la dispersión bacteriana dentro de ellos (97). El conocimiento de la interacción entre los endófitos y las plantas permite aprovechar los efectos positivos de la interacción, con el fin de poder emplear a la bacteria como inoculante (152).

La visualización de bacterias marcadas mediante microscopía de fluorescencia ha sido reportada como una técnica sensible y rápida que permite estudiar la colonización bacteriana en raíces de plantas (61, 70). En la presente tesis, se utilizaron herramientas de biología molecular y microscopía de fluorescencia para estudiar la interacción de bacterias con la planta, concretamente investigar si la naturaleza de la interacción es endofítica. El primer paso del procedimiento consistió en marcar las bacterias con el gen reportero *gfp* codificante para la proteína GFP. La proteína GFP ha sido reportada

como un marcador apropiado para estudiar el comportamiento bacteriano en la rizósfera, como ser la colonización de la raíz (18, 156, 157). Su principal ventaja radica en que su uso no es invasivo ya que no requiere un tratamiento previo de la muestra para su visualización, lo cual permite el monitoreo *in vivo* preservando la integridad del material de estudio (18). La transformación de las bacterias con el gen *gfp* fue realizada utilizando como vector al plásmido pHCB60 (35). Dicho plásmido es de amplio espectro de huésped y estable en ausencia de presión selectiva, lo que lo hace utilizable para estudiar la interacción entre la bacteria y la planta (33).

Las cepas *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y *Kosakonia sp.* UYSB139 fueron las seleccionadas para estudiar y proponer un modelo de infección y colonización de las plantas de sorgo dulce, bajo las condiciones ensayadas.

4.4.1. COLONIZACIÓN DE LA SUPERFICIE RADICULAR

Para todas las cepas estudiadas, a las 4hs pi. se observaron bacterias adheridas en distintos sitios de la superficie radicular de la planta, distribuidas en forma dispersa pero frecuentemente localizadas sobre la base de los pelos radiculares. Particularmente, las cepas UYSB139 y UYSB89 a partir de las 16hs pi. formaron agregados bacterianos de gran tamaño e incluso aparentes biopelículas en la base de los pelos radiculares. La localización particular en esas zonas, se ve promovida por la presencia de elevadas concentraciones de exudados radiculares, los cuales son quimioatrayentes y fuente nutricional para las bacterias (66). Además, en la base de los pelos radiculares, el tejido se encuentra debilitado por estar en expansión, lo cual genera aberturas naturales que posibilitan el ingreso pasivo de las bacterias a la planta (121). Este tipo de mecanismos de ingreso, fue anteriormente observado para la cepa *Gluconabacter diazotrophicus* Pal 5 inoculada en plantas de sorgo dulce (95), así como para la cepa *K. radicincitans* UYSO10 en plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (154).

4.4.2. INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE LOS TEJIDOS INTERNOS

Luego de que las bacterias ingresaron a la planta, se observó que las cepas estudiadas colonizaron los espacios intercelulares del córtex de las raíces a las 19hs pi. En todos los casos, la colonización de las bacterias fue distribuida en todas las regiones de la raíz por igual, sin evidenciarse preferencia por alguna zona específica. Este tipo de colonización ha sido previamente descrito en plantas de sorgo dulce inoculadas con *Herbaspirillum rubrisubalbicans* o *Gluconacetobacter diazotrophicus* (79, 95). Particularmente para el caso del género *Kosakonia*, se ha demostrado que la cepa *K. radicincitans* UYSO10 coloniza los espacios intercelulares, de las raíces y la base del tallo de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (154). Asimismo la cepa *K. radicincitans* GXGL-4A, coloniza también exitosamente los espacios intercelulares de raíces de pepino, pero localizándose principalmente cercanas al anillo vascular de la raíz y rara vez cerca del límite de la raíz (149). Por otra parte, diferentes trabajos han reportado como endófito y colonizando los espacios intercelulares a aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* en raíces de plantas de la flor globo (*Platycodon grandiflorus*), y pimienta (*C. annuum* L.) (36, 82).

4.4.3. COLONIZACIÓN DEL TEJIDO VASCULAR

Una vez colonizados los tejidos internos de la planta, los endófitos bacterianos pueden colonizar los haces vasculares y dispersarse sistémicamente a otros órganos de la planta (97). Este sería el caso de las cepas UYSB139 a las 144hs pi. y UYSB119 a las 72hs pi.. Sin embargo, lo mismo no pudo ser observado para la cepa UYSB89 en ninguno de los tiempos observados, no puede descartarse que esta lo haga a mayores tiempos. La colonización de los tejidos vasculares de plantas de sorgo ha sido reportado también para las cepa *H. rubrisubalbicans* (80). Asimismo, en plantas de caña de azúcar, la cepa *K. radicincitans* UYSO10 logró colonizar el tejido vascular del tallo a las 24hs pi (154). En cuanto al género *Bacillus*, si bien cepas de este género

fueron capaces de colonizar la raíz de plantas de la campanilla china, no se encontró evidencia de su capacidad de colonizar el sistema vascular de la raíz, tal como se observó en este estudio (36). En cambio, en la planta de pimienta se detectaron células bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* en los tejidos de la hoja, evidenciando una dispersión sistémica (82).

En su conjunto y a partir de los resultados obtenidos, se pudo definir a las cepas *Kosakonia sp* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y *Kosakonia sp.* UYSB139 como “endófitas verdaderas”.



5. CONCUSIONES

Mediante las actividades desarrolladas, fue posible cumplir con todos los objetivos planteados en la presente tesis, se obtuvieron insumos valiosos para el futuro desarrollo de inoculantes bacterianos de sorgo dulce.

Concretamente, se logró poner a punto la técnica de reducción de acetileno y mediante ella clasificar como diazótrofos a 7 aislamientos pertenecientes a la colección. Luego, mediante ensayos de promoción del crecimiento vegetal en condiciones *gnotobióticas* y de invernáculo, se determinó que las cepas diazótrofes *Kosakonia sp.* UYSB89, *Bacillus sp.* UYSB119 y *Kosakonia sp.* UYSB139 promueven el crecimiento de plantas de sorgo dulce cv. M81E y ADV2010. Por otra parte, se demostró que plantas de la cv. ADV2010 fertilizadas con 75N e inoculadas con las cepas *Kosakonia sp.* UYSB139 o *Kosakonia sp.* UYSB89, tuvieron un mayor desarrollo que las plantas fertilizadas con una dosis mayor de fertilizante químico (150N), demostrando ser una alternativa que podría lograr reducir el uso de fertilizantes nitrogenados sin comprometer la productividad del cultivo. Sin embargo, los resultados del mismo ensayo en la cv. M81E no fueron tan concluyentes, el efecto PCV de la cepas se vio inhibido a causa de la fertilización química nitrogenada. Finalmente, los estudios de microscopia permitieron comprobar que dichas cepas establecen una interacción endofítica con plantas de sorgo dulce cv. M81E.

En este sentido, se puede concluir que las tres cepas endófitas-diazótrofes PCV ensayadas en la presente tesis presentan potencialidad para ser utilizadas como inoculantes de sorgo dulce en las cultivares empleadas en Uruguay. Particularmente, la cepa *Kosakonia sp.* UYSB139 demostró potencialidad de ser empleada como suplemento a la fertilización química nitrogenada, lo cual permitiría reducir la cantidad de fertilizante aplicado.



6. PERSPECTIVAS

- Considerando que la mayoría de las cepas estudiadas demostraron ser diazótrofes, sería interesante profundizar en el estudio de la actividad FBN de la bacteria cuando se encuentra asociada a la planta. Para ello, se propone determinar en plantas inoculadas, cuál es el porcentaje de nitrógeno proveniente de la FBN mediante técnicas isotópicas de ^{15}N . Otra propuesta complementaria, es realizar ensayos de PCV empleando cepas mutantes *nifH* y comparar sus resultados con el de las cepas no mutadas.
- Con respecto a los ensayos de PCV en condiciones *gnotobióticas* y de invernáculo, cabe resaltar que si bien fue posible determinar la capacidad promotora de las cepas, estos resultados fueron obtenidos bajo condiciones controladas. Es por ello que se propone realizar ensayos en condiciones de campo, para conocer cómo responden las plantas a la inoculación bacteriana cuando están expuestas a las condiciones reales de su cultivo. Además, sería interesante continuar investigando el efecto de la inoculación sobre otros parámetros que sean de interés agronómico, es decir que estén relacionadas al uso antropogénico que se le da a la planta. Concretamente, se propone estudiar el efecto de la inoculación sobre la calidad nutricional de las semillas, el porcentaje de azúcares en el tallo y la tolerancia a estrés ambiental y biológico.
- Con respecto al estudio del efecto PCV de las cepas cuando se aplican junto con el fertilizante químico nitrogenado, se propone repetir los ensayos evaluando menores dosis de fertilizante, buscando reducir al mínimo la cantidad de fertilizante aplicado sin comprometer los rendimientos. Por otra parte, para comprender si la actividad nitrogenasa está operando cuando se inoculan plantas con diferentes niveles de disponibilidad de nitrógeno químico, se propone realizar estudios de cuantificación de la expresión del gen *nifH* mediante RT-qPCR, e investigar cuál es el porcentaje de nitrógeno en la planta que proviene de la FBN, mediante técnicas isotópicas de ^{15}N .
- En cuanto a los estudios de interacción planta-bacterias, se propone optimizar la técnica de microscopia mediante el marcaje de las bacterias con el gen *gus*. Esto permitiría realizar una identificación primaria de los sitios en donde se localizan las bacterias para seleccionar específicamente las regiones de la raíz

en donde realizar los cortes, de este modo se obtendría un mejor material de trabajo con información más precisa. Además, la información obtenida se podría complementar realizando observaciones de imágenes en tres dimensiones utilizando microscopía electrónica de barrido. Esta aproximación podría profundizar en la comprensión de los mecanismos de adhesión e infección por parte de las bacterias endófitas.

- Teniendo en cuenta que se dispone del genoma secuenciado de la cepa UYSB139, sería interesante realizar un análisis bioinformático profundo, con la idea de identificar genes involucrados en el establecimiento de la interacción así como en la promoción del crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiese sido posible sin el apoyo de:

- La ANII, la cual me otorgó una beca de Maestría.
- La CAP, la cual me otorgó una Beca de Apoyo para la Finalización de Estudios de Posgrados
- PEDECIBA, quien me financió la pasantía en la Universidad Federal do Paraná
- IIBCE, donde pude desarrollar todo el trabajo experimental



ANEXO

Buffer GET (133)

Componente	Concentración
Glucosa	50 mM
EDTA	10mM
Tris-HCl pH 8	25 mM

Solución de lisis

Componente	Concentración
NaOH	0,2M
SDS	1% en agua ultra pura

Debe prepararse al momento de uso

Solución TSS (37)

Componente	Concentración
Medio de cultivo LB	
PEG (p.mol 6000)	10% (p/v)
DMSO	5% (v/v)
MgCl ₂	50mM

Filtrar la solución en filtro de poro 0,22µm antes de adicionar el DMSO. Ajustar el pH a 6.5

Reactivo de Bradford (20)

Componente	Cantidad por litro
Coomassie BBG	100 mg
Etanol 95%	48 ml
Ac. Fosfórico 85% (p/v)	100 ml
H₂O	c.s.p 1000 ml

Preparación:

1. Disolver el Coomassie en el etanol.
2. Agregar el Ac. Fosfórico y llevar a volumen con agua destilada.
3. Filtrar dos veces con papel de filtro Whatman N° 1 4.
4. Guardar en frasco oscuro en heladera.

Medio para plantas Jensen (161)

Componente	Cantidad por litro
Ca₃(PO₄)₂	1,0 g
K₂HPO₄	0,2 g
MgSO₄ 7H₂O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl₃ 6H₂O	0,17 g
Solución de micronutrientes	1,0 ml
H₂O	c.s.p 1000ml
Agar	8,0 g

Solución de micronutrientes para medio Jensen

Componente	Cantidad por litro
H_3BO_3	2,86 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,03 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g
Na_2MoO_4	0,09 g
H_2O	c.s.p 1000ml

Medio para plantas Murashinge-Skoog (MS) (111)

Componente	Cantidad por litro
NH_4NO_3	1650 mg
KNO_3	1900 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg
KH_2PO_4	170 mg
IK	0,83 mg
H_3BO_3	6,2 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6 mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg

EDTA	37,3 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg
H ₂ O	c.s.p. 1000ml

Medio de cultivo NFb (46)

Componente	Cantidad por litro
ácido málico	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .H ₂ O	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
solución de vitaminas	1 ml
solución de micronutrientes	2 ml
NH ₄ Cl	1,0 g
H ₂ O	c.s.p. 1000ml

Ajustar el pH a 6,5.

Solución de micronutrientes para medio Nfb

Componente	Cantidad por litro
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ .H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
MoO ₃ .H ₂ O	0,09 g

CuSO₄·5H₂O	0,08 g
H₂O	c.s.p. 1000ml

Solución de vitaminas para medio Nfb

Componente	Cantidad por litro
Biotina	0,01 g
Pyridoxal-HCl	0,02 g
H₂O	c.s.p. 1000ml

Buffer TAE

Componente	Concentración
EDTA	0,001 M
Tris-acetato	0,04 M

Ajustar el pH a pH 8,0

Medio de cultivo TSB

Componente	Cantidad por litro
Tripteína Soya Agar	15g
H₂O	c.s.p 1000l

Medio de cultivo TSA

Componente	Cantidad por litro
Tripteína Soya Agar	15g
H₂O	c.s.p 1000l
Agar	15 g

Medio de cultivo NFCC (5)

Componente	Cantidad por litro
Acido Málico	5,0 g
NaOH	4,7 g
K₂PO₄	0,1 g
KH₂PO₄	0,4 g
MgSO₄. 7H₂O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl₂	0,02 g
FeCl₃	0,01 g
NaMoO₄.2H₂O	0,002 g
Azul de Bromotimol	2,5 mg
H₂O	c.s.p. 1000ml

Ajustar pH a 6,8

Medio de cultivo Luria-Bertani liquido (LB) (132)

Componentes	Cantidad por litro
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	c.s.p 1000ml

Medio de cultivo Luria-Bertani solido (LA)

Componentes	Cantidad por litro
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	c.s.p 1000ml
Agar	15 g



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ali S, Charles TC, Glick BR (2014) Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:160–167.
2. Angus AA, Hirsch AM (2013) Biofilm formation in the rhizosphere: multispecies interactions and implications for plant growth. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere* 1:701-712.
3. Artschwager E (1948) *Anatomy and Morphology of the Vegetative Organs of Sorghum Vulgäre*. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin No. 957.
4. Azcón-Brieto J, Talón M (2008) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Interamericana de España: Universitat de Barcelona. Ed. McGraw-Hill.
5. Babur SM, Rodrigues LMJ (2012) Development of a Direct Isolation Procedure for Free-Living Diazotrophs under Controlled Hypoxic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 78:5542-5549.
6. Baetz U, Martinoia E (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense trends in plant science root exudates - the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* 19:90–98.
7. Bais H, Weir T, Perry L, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233–266.
8. Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry* 29:911–922.
9. Baldani JI, Reis VM, Videira SS (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384:413–431.
10. Bashan Y, De-Bashan, LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy* 108: 77-136.
11. Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The Isme journal* 5:908–917.

12. Beauchamp C, Lévesque G, Prévost D, Chalifour F (2006) Isolation of free-living dinitrogen-fixing bacteria and their activity in compost containing de-inking paper sludge. *Bioresource Technology* 97:1002-1011.
13. Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1673-1685.
14. Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68:1-13.
15. Bergamaschi C, Roesch LFW, Quadros PD de, Camargo FA de O (2007) Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural* 37:727-733.
16. Berger B, Brock AK, Ruppel S (2013) Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. *Plant Soil* 370:641-652.
17. Berger B, Wiesner M, Brock AK, Schreiner M, Ruppel S (2015) *K. Radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agronomy for Sustainable Development* 35:1521-1528.
18. Bloemberg GV, O'Toole GA, Lugtenberg BJJ, Kolter R (1997) Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4543-4551.
19. Bloemberg GV, Carvajal MMC (2006) Microbial interactions with plants: a Hidden World? *Microbial Root Endophytes* 321-336.
20. Bradford, MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
21. Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, de Vos P, Wingfield MJ, Telechea N, Coutinho TA (2009) Isolation of *Enterobacter cowanii* from Eucalyptus showing symptoms of bacterial blight and dieback in Uruguay. *Letters in Applied Microbiology* 49:461-465.
22. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P (2013) Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia*

- nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. Systematic and Applied Microbiology 36:309- 319.
23. Broadhead DM, Freeman KC, Zummo N (1981) 'M81E'---A New Variety of Sweet Sorghum. Info. Sheet 1309. USDA, ARS. U.S. Sugar Crops Field Station, Meridian, MS and MAFES, Starkville, MS.
 24. Bueno G, Cordovés M, Delgado G (2009). Sorgo dulce: sus potencialidades productivas. Revista ICIDCA: Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XLIII, 3: 15-21.
 25. Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91–95.
 26. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:807–838.
 27. Burdman S, Dulguerova G, Okon Y, Jurkevitch E (2001) Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Molecular Plant Microbe Interaction* 14:555–561.
 28. Burris RH. AND P. W. Wilson. 1957. Methods for measurement of nitrogen fixation. *Methods in Enzymology* 4:77-136. Ed.Academic Press.
 29. Canipbell NER, Dular R, Lees H, Standing KG (1967) The production of ¹³N, by 50 Mev protons for use in biological nitrogen fixation. *Canadian Journal of Microbiology* 13:587-99.
 30. Carvalhais LC, Dennis PG (2013) Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLoS One* 8:68555.
 31. Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, Ferreira PCG, Hemerly AS (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany* 65:5631– 5642.

32. Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, Ferreira PCG, Hemerly AS, Cheng Z, Silhavy TJ, Ruiz N, Kahne D, Rediers H, Bonnacarrère V, Rainey PB, Bonnacarre V, Hamonts K, Vanderleyden J, Peralta H, Aguilar A, Díaz R, Mora Y, Martínez-Batallar G, Salazar E, Vargas-Lagunas C, Martínez E, Encarnación S, Girard L, Mora J, Pankiewicz VCCS, Camilios-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passeti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM, Schmid F, Biol C, Chen X, Miché L, Sachs S, Wang Q, Buschart A, Yang H, Vera Cruz CM, Hurek T, Reinhold-Hurek B, Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, Ferreira PCG, Hemerly AS, Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B, Cambiaghi A, Ferrario M, Masseroli M, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankiewicz VCCS, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA, Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A, Hu J, Rampitsch C, Bykova N V. , Braun M, Silhavy TJ, Lodha TD, Hembram P, Basak NTJ, Cheng Z, Duan J, Hao Y, McConkey BJ, Glick BR, Alberton D, MullerSantos M, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Cordeiro FA, Yates MG, De Oliveira Pedrosa F, de Souza EM, Ferrari CS, Amaral FP, Bueno JCF, Scariot MC, Valentim-Neto PA, Arisi ACM (2016) Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. *Plant Molecular Biology* 90:561–574.
33. Chanway CP (1997) Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *Forest Science* 43:99–112.
34. Chen M, Zhu B, Lin L, Yang L, Li L (2014) Complete genome sequence of *Kosakonia sacchari* type strain SP1T. *Standards in Genomic Sciences* 20149:9031311.
35. Cheng HP, Walker GC (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of the infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 180:5183-519.
36. Cho SJ, Park SR, Kim MK, Lim WJ, Ryu SK, An CL, Yun HD (2002) Endophytic *Bacillus* sp. isolated from the interior of balloon flower root. *Journal of Bioscience and Biotechnology* 66:1270-5.

37. Chung CT, Niemela S, Miller R (1989) One-step preparation of *competent Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 2172-2175.
38. Coelho MRR, Marriel IE, Jenkins SN, Lanyon CV, Seldin L, O'Donnell AG (2009) Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizar. *Applied Soil Ecology* 42:48–53.
39. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 41:D633-D642.
40. Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka E (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth- promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1685-1693.
41. Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42(5): 669-678
42. Da Silva JF, da Silva TR, Escobar IEC, Fraiz ACR, dos Santos JWM, do Nascimento TR, Fernandes-Júnior PI (2018) Screening of plant growth promotion ability among bacteria isolated from field-grown sorghum under different managements in Brazilian drylands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34:186.
43. De los Santos Cecilia. Presentación aún pendiente. Tesis de grado en Ciencias Biológicas, Universidad de la Republica, Uruguay.
44. Dilworth MJ, Subramanian D, Munson TO, Burris RH (1965) The adenosine triphosphate requirement for nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 99:486-503.
45. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22:107–149.
46. Dobereiner J, Day JM (1976) Associative symbiosis and free-living systems. *Proceedings of the 1st International symposium on Nitrogen fixation*. Washington state University. Press. Pullman 518 – 538.
47. Doggett H. 1970. Sorghum. Tropical agricultura serie. Longman scientific and technical 403.

48. dos Santos CLR, Alves GC, de Matos Macedo AV, Giori FG, Pereira W, Urquiaga S, Reis VM (2017) Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. *Applied Soil Ecology* 113:96–106.
49. Downie JA (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Review* 34:150–170.
50. Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 911–920.
51. Ferrari E (2017) Construcción y caracterización de una colección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo de canola (*Brassica napus* L.) y el efecto de su inoculación en cultivos in vitro. Tesis de grado en Ciencias Biológicas, Universidad de la Republica, Uruguay.
52. Fretes CE, De Suryani R, Purwestri YA, Nuringtyas TR (2018) Diversity of endophytic bacteria in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and their potential for promoting plant growth. *Indian Journal of Science and Technology* 11:1–10.
53. Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321:35–59.
54. Frioni L (2011) Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Ed. Orientación Grafica.
55. Fritzsche C, Niemann EG (1990) Nitrogen fixation in activities continuous culture with NH_4Cl containing media. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1160–1123.
56. Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J (2005) Bacterial biofertilizers. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* 143–172. Ed. Springer.
57. Glick BR Pattern CL, Holguin G, Penrose DM (1999) Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. London: imperial College Press 1–13.
58. Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169:30–39.

59. Glick BR (2015) Stress control and ACC deaminase. Principles of Plant-Microbe Interactions 257-264. Ed. Springer.
60. Gnansounou U E, Dauriat A, Wyman CE (2005) Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic tradeoffs in the context of North China. Bioresource Technology 96:985-1002.
61. Götz M, Gomes NCM, Dratwinski A, Costa R, Berg G, Peixoto R, Hagler LM, Smalla K (2006) Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. FEMS Microbiology Ecology 56:207–218.
62. Govindasamy V, Raina SK, George P, Kumar M, Rane J, Minhas PS, Vittal KPR (2017) Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Antonie Van Leeuwenhoek 110:925–943.
63. Grönemeyer JL, Burbano CS, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2012) Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. Plant and Soil 356: 67–82.
64. Haahtela K, Wartiovaara T, Sundman V, Skujins J (1981) Root-Associated N₂ Fixation (Acetylene Reduction) by Enterobacteriaceae and Azospirillum Strains in Cold-Climate Spodosols. Applied and environmental microbiology 41: 203–206.
65. Haichar F, Marol Z, Berge C, Rangel-Castro O, Prosser JL, Balesdent JL, Achouak W (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. ISME Journal 2:1221–1230.
66. Haichar F, Santaella C, Heulin T, Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. Soil Biology and Biochemistry 77:69–80.
67. Haiyambo DH, Chimwamurombe PM, Reinhold-Hurek B (2015a) Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in East Kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics. Current Microbiology 71:566–571.
68. Haiyambo DH, Reinhold-Hurek B, Chimwamurombe PM (2015b) Effects of plant growth promoting bacterial isolates from Kavango on the vegetative growth of *Sorghum bicolor*. African Journal of Microbiology Research 9:725–729.
69. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43:895–914.

70. Hallmann J, Hallmann AQ, Miller WG, Sikora RA, Lindow SE (2001) Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology* 91:415–422.
71. Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:1745-1753.
72. Hardy RWF, Burns RC (1968a) Biological Nitrogen Fixation. *Annual Review of Biochemistry* 37:331-58.
73. Hardy RWF, Knight E (1968b) The biochemistry and postulated mechanisms of N₂ fixation. *Progress in Phytochemistry* 387-469. Ed. John Wiley and Sons.
74. Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD (1973) Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5:47–81.
75. Heijo G (2015) Construcción y caracterización de una colección bacteriana de probables endófitos diazótrofos nativos asociados a plantas adultas de la cultivar M81E de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Tesis de grado en Ciencias Biológicas, Universidad de la Republica, Uruguay.
76. Hurek T, Reinhold-Hurek B (2003) Azoarcus sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Jacobs Journal of Biotechnology and Bioengineering* 106:169–178.
77. Hurek T, Reinhold-Hurek B (2005) Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plant: hidden activities of unknown bacteria. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and Environment* 173–198. Ed. Springer.
78. INIA (2014) Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de sorgo para silo y sorgo dulce para producción de etanol. http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_CV/Ano2014/PubSorgoSiloDulce2014.pdf
79. James EK, Olivares FL (1997a) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17:77–119.
80. James EK, Olivares FL, Baldani JL, Döbereiner J (1997b) *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue 3 *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany* 48(3):785-798.

81. Kämpfer P, Ruppel S, Remus R (2005) *Enterobacter radicincitans* sp nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. Systematic and Applied Microbiology 28:213-221.
82. Kim JD, Jeon BJ, Han JW, Park MY, Kang SA, Kim BS (2015) Evaluation of the endophytic nature of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GYL4 and its efficacy in the control of anthracnose. Pest Management Science 72:1529–1536.
83. Klassen G, Pedrosa F, Souza E, Funayama S, Rigo L (1997) Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. Canadian Journal of Microbiology 43:887-891.
84. Lagunas B, Schäfer P, Gifford ML (2015) Housing helpful invaders: The evolutionary and molecular architecture underlying plant root-mutualist microbe interactions. Journal of Experimental Botany 66:2177–2186.
85. Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA secuencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics 115-175. Ed. E. Stackebrandt, and M. Goodfellow, Wiley, New York.
86. Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. Plant Soil 321:513–535.
87. Limmer C, Drake HL (1998) Effects of carbon, nitrogen, and electron acceptor availability on anaerobic N₂-fixation in a beech forest soil. Soil Biology and Biochemistry 30:153-158.
88. Lipton D, Blanchar RW, Blevins DG (1987) Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from PSufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings. Plant Physiology. 85:315–317.
89. Liu H, Carvalhais L, Crawford M, Singh E, Dennis P, Pieterse C, Schenk P (2017b) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. Frontiers in Microbiology 8:2552.
90. Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. PLoS One 3:2702.
91. Lovell CR, Piceno YM, Quarttro JM, Bagwell CE (2000) Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth Cordgrass, *Spartina alterniflora*. Applied and Environmental Microbiology 66:3814-3822.

92. Lucy Seldin, Van Elsas JD, Penido EGC (1983) *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant and Soil* 70(2):243-255.
93. Lugtenberg B, Dekkers LC (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1:9-13.
94. Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013) Microbial control of plant root diseases. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere* 391–403. Ed. Oxford.
95. Luna MF, Galar ML, Aprea J, Molinari ML, Boiardi JL (2010) Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 32:1071–1076.
96. Luo S, Xu T, Chen L, Chen J, Rao C, Xiao X, Wan Y, Zeng G, Long F, Liu C, Liu Y (2011) Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus*
97. Malfanova N, Lugtenberg B, Berg G (2013) Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there? *Molecular microbial ecology of the rhizosphere* 391–403. Ed. John Wiley and Sons.
98. Mareque C, Taulé C, Beracochea M, Battistoni F (2015) Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology* 65:1057–1067.
99. Mareque C, Freitas da Silva T, Estebanez Vollú R, Beracochea M, Seldin L, Battistoni F (2018) The Endophytic Bacterial Microbiota Associated with Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor*) Is Modulated by the Application of Chemical N Fertilizer to the Field. *International Journal of Genomics* 11:1-10.
100. Mark GL, Dow JM, Kiely PD, Higgins H, Haynes J, Baysse C, O’Gara F (2005) Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:17454–17459.
101. Martínez Marques, A. Cámara de Comercio Uruguay-Estados Unidos <<http://www.ccuruguayusa.com/cgibin/admin/articlefiles/CouncilMarques.doc>>[Consulta: 07julio 2008]].
102. Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ (1997) Agricultural intensification properties. *Science* 227: 504-509.

103. Meneses CHSG, Rouws LFM, Simoes-Araujo JL, Vidal MS, Baldani JI (2011) Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 24:1448–1458.
104. Mercado-Blanco J (2015) Life of microbes inside the plant. *Principles of Plant-Microbe Interactions* 25-32. Springer, Cham.
105. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Diea (2018) Anuario estadístico agropecuario:https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf
106. Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, TadraSfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2012) *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil* 356:175–196.
107. Montoya J, Voss M, Kahler P, Capone D (1996) A simple, highprecision, high-sensitivity Tracer Assay for N₂ Fixation. *Applied and Environmental Microbiology* 62:986-993.
108. Monza J, Marquez A (2004) El metabolismo del nitrógeno en las plantas. *Cordoba, Almuzara Estudios, Microbiology* 42:207–220.
109. Morel MA, Ubalde MC, Braña V, Castro-Sowinski S (2011) *Delftia* sp. JD2: a potential Cr (VI) -reducing agent with plant growth-promoting activity. *Archives of Microbiology* 193:63-68.
110. Mortenson LE (1964) Ferredoxin and ATP requirements for nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 52: 272-79.
111. Murashige T, Skooge F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497.
112. Nicholas DJD, Silvester DJ, Fowler JF (1961) Use of radioactive nitrogen in studying nitrogen fixation in bacterial cells and their extracts. *Nature* 189:634-36.
113. Patten C, Glick B (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42:207– 220.

114. Pereira JAR, Cavalcante VA, Baldani JI, Döbereiner J (1989) Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum seropedicae*. Nitrogen Fixation with Non-Legumes 219-224. Ed. Springer.
115. Perrott KW, Sarathchandra SU, Dow BW (1992) Seasonal and fertilizer effects on the organic cycle and microbial biomass in a hill country soil under pasture. Australian Journal of Soil Research 30:383-394.
116. Peters JW, Fisher K, Dean DR (1995) Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. Annual Review of Microbiology 49:335–366.
117. Pham D, Burgess B (1993). Nitrogenase Reactivity: Effect of pH on substrate reduction and CO inhibition. Biochemistry 32:13725-13761.
118. Poza-Carrión C, Echavarri-Erasun C, Rubio LM (2015) Regulation of nif gene expression in *Azotobacter vinelandii*. Biological nitrogen fixation 101– 107.
119. Prathibha KS, Siddalingeshwara KG (2013) Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescence* as *Rhizobacteria* on seed quality of sorghum. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2(3):11-18.
120. Quispel A (1992) A search of signals in endophytic microorganisms. In D. P. S. Verma (Ed.), Molecular signals in plant-microbe communications 471-491. Ed. Boca Raton.
121. Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. Critical Reviews in Plant Sciences 17:29-54.
122. Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T (2006) An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. Molecular plant-microbe Interaction 19:181–188.
123. Rejesus RM, Hornbaker RH (1999) Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. Agriculture, Ecosystems & Environment 75:41-53.
124. Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17(4-5):319-39.

125. Rolli E, Marasco R, Vigani G, Ettoumi B, Mapelli F, Deangelis ML (2015) Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology* 17:316–331.
126. Rosado AS, Duarte GF, Seldin L, Elsas JD (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2770-2779.
127. Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2006) Bacterial Endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19:827-837.
128. Rudrappa T, Biedrzycki ML, Kunjeti SG, Donofrio NM, Czymmek KJ, Paul W (2010) The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology* 3:130-138.
129. Ruppel S, Merbach W (1995) Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* spp. In bacterial pure culture: An investigation using ¹⁵N₂ and acetylene incubation. *Microbiological Research* 150:409-418.
130. 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.
131. Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278:1-9.
132. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
133. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
134. Sanchez F, Quinto C, López-Lara IM (2006) *Biology of Plant-Microbe Interactions* vol.5. Ed. International Society for Plant-Microbe Interactions.
135. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V,

- Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-82.
136. Schulz B, Boyle C (2006) What are Endophytes? *Microbial Root Endophytes, Soil Biology* 1-13.
 137. Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant Microbe Interaction* 25:28–36.
 138. Sevilla M, Kennedy C (2000) Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulation properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. En: *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process* 737-760. Ed. Horizon Scientific.
 139. Shamsinah Zhang X, Sherman DM, Sherman LA (2014) The uptake hydrogenase in the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain PCC 7822 protects nitrogenase from oxygen toxicity. *Journal of Bacteriology* 196(4):840-9.
 140. Sheibani-Tezerji R, Rattei T, Sessitsch A, Trognitz F, Mitter B (2015) Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *mBio* 6:00621-15.
 141. Shoebitz M, Ribaudó CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Curá JA (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1768-1774.
 142. Smith GA, Bagby MO, Lewellan RT, Doney DL, Moore PH, Hills FJ, Campbell LG, Hogaboam GJ, Coe GE, Freeman K (1987) Evaluation of sweet sorghum for fermentable sugar production potential 27:788-793. *Crop Science*.
 143. Smith P, House JI, Bustamante M, Sobocká J, Harper R, Pan G (2016) Global change pressures on soils from land use and management. *Global Change Biology* 22:1008–1028.
 144. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* 31:425–448.
 145. Spaepen S (2015) Plant hormones produced by microbes. *Principles of Plant-Microbe Interactions* 247–256 .Ed. Springer.

146. Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Review* 24:487–506.
147. Su F, Jacquard C, Villaume S, Michel J, Rabenoelina F, Clément C (2015) *Burkholderia phytofirmans* PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 6:810.
148. Subramanian P, Mageswari A, Kim K, Lee Y, Sa T (2015) Psychrotolerant endophytic *Pseudomonas* sp. strains OB155 and OS261 induced chilling resistance in tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.) by activation of their antioxidant capacity. *Molecular Plant Microbe Interaction* 28:1073–1081.
149. Sun S, Chen Y, Cheng J, Li Q, Zhang Z, Lan Z (2018) Isolation, characterization, genomic sequencing, and GFP-marked insertional mutagenesis of a high-performance nitrogen-fixing bacterium, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A and visualization of bacterial colonization on cucumber roots. *Folia Microbiologica* 63(6):789-802.
150. Tadra-Sfeir MZ, Souza EM, Faoro H, Müller-Santos M, Baura VA, Tuleski TR, Rigo LU, Yates MG, Wassem R, Pedrosa FO, Monteiro RA (2011) Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:2180–2183.
151. Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant physiology*, figura 12.12, 3rd Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc.
152. Tanaka K, Shimizu T, Zakria M, Njoloma J, Saeki Y, Sakai M, Yamakawa T, Minamisawa K, Akao S (2006) Incorporation of a DNA sequence encoding Green Fluorescent Protein (GFP) into endophytic diazotroph from sugarcane and sweet potato and the colonizing ability of these bacteria in *Brassica oleracea*. *Microbes Environmental* 21:122-128.
153. Taule´, C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis VM, Sicardi M, Battistoni F (2012) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356>35–49.

154. Taulé C, Castillo A, Villar S, Olivares F, Battistoni F (2016) Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant Soil* 403: 403.
155. Taulé C, Luizzi H, Beracochea M, Mareque C, Platero R, Battistoni F (2019) The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYSO10 are necessary for growth promotion of sugarcane. *Annals of Microbiology* 69: 741-750.
156. Tombolini R, Unge A, Davey ME, de Bruijn FJ, Schleifer KH (1997) Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 22:17-28.
157. Tombolini R, van der Gaag DJ, Gerhardson B, Jansson JK (1999) Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA32 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3674-3680.
158. Vanbleu E, Vanderleyden J (2010) Molecular genetics of rhizosphere and plant-root colonization. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations 85–112. Ed. Springer.
159. Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157:423–447.
160. Vandamme P, Goris J, Ming Chen W, de Vos P, Willems A (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Systematic and Applied Microbiology* 25(4):507-12.
161. Vincent JM (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme by Blackwell Scientific N°15 manual.
162. Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132:44–51.
163. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(16):5261-5267.

164. Wei CY, Lin L, Luo LJ, Xing YX, Hu CJ, Yang LT, Li YR, An QL (2014) Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biology and Fertility of Soils* 50:657–666.
165. Yasmin S, Hafeez FY, Schmid M, Hartmann A (2013) Plant-beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. *Pakistan J Bot* 45:655–662.
166. You M, Nishigushi M, Saito A, Isawa T, Mitsui H (2005). Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum endophyte* in wild rice species: daily rhythm during the light dark cycle. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8183-8190.
167. Zhang Y, Burris R, Ludden P, Roberts G (1993) Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobic and ammonium in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 175:6781-6788.