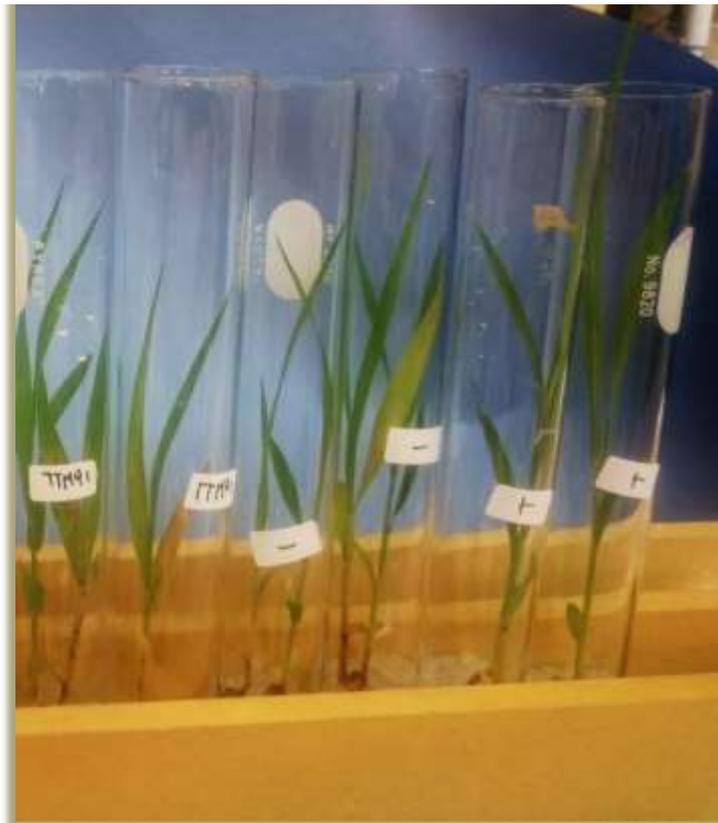


Facultad de Ciencias
Licenciatura en Bioquímica

Evaluación de características promotoras del crecimiento vegetal en bacterias del género *Azoarcus*.



Agustín Bilat Damasco

Orientadores:

Dr. Federico Battistoni

MSc. Cintia Mareque

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay, 2019.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Cintia por el tiempo dedicado en ayudarme y orientarme en mis primeros pasos en la investigación durante el presente trabajo.

A Federico por darme la oportunidad de ingresar al grupo y por su apoyo constante.

A ambos por la paciencia, buena disposición, y por sus valiosas correcciones.

A todos los compañeros y compañeras de BIOGEM, por los ratos compartidos y por aportar de alguna forma a que pueda concluir este trabajo.

A todos aquellos con los que compartí distintas etapas de mi formación académica. A Javi por su buena onda que hicieron más ligeras todas esas horas de trabajo juntos. A mi amiga Stephy y los demás compas de Inmuno con quienes tuve mi primera experiencia en la docencia. A Guillermo por orientarme durante mis primeros pasos en un laboratorio.

A mis amigos de siempre, en especial a Leandro, Juan Andrés y los pibes del Cuerno por TODO lo compartido.

A los buenos amigos y amigas que la vida me sigue cruzando. En especial a mis compas y excompas del Vegan. A todos los que dedican su tiempo y energías en visibilizar el especismo y difundir formas de convivencia más conscientes y respetuosas con los demás animales.

A Nati. Por contradecirme y enseñarme. Por las alegrías compartidas. Por ser como sos. Por quererme como soy.

A toda mi familia.

En especial a mi hermana y mis hermanos. A mi sobrina, porque sos un ser muy muy especial en mi vida y en la de todos nosotros. A mi sobrinito por llenarnos con su luz.

A mi madre. Por tu amor. Por haber dado todo y aún más por nosotros cuatro. Porque este trabajo y todos los que vengan en el futuro son posibles gracias a vos. Gracias infinitas por todo.

A mi padre, abuelo y abuela cuyo amor sigue vivo en nosotros.

A la educación pública y gratuita de este país.

A quienes dejan lo mejor de sí para lograr avanzar hacia la construcción de una sociedad con mayor justicia social, respetuosa con nuestra Tierra y con los demás animales.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 4 |
| RESUMEN | 5 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1.1. IMPACTO AMBIENTAL DEL USO DE FERTILIZANTES QUÍMICOS..... | 6 |
| 1.2. RIZÓSFERA Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL..... | 6 |
| 1.3. ENDÓFITOS..... | 7 |
| 1.3.1. Definición..... | 7 |
| 1.3.2. Clasificación y estilo de vida..... | 8 |
| 1.3.3. Endófitos y Fijación Biológica de Nitrógeno en Gramíneas..... | 9 |
| 1.3.4. Ventajas del uso de Endófitos como Bioinoculantes en Sistemas Agrícolas..... | 9 |
| 1.4. MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL..... | 10 |
| 1.4.1. Fijación biológica de nitrógeno..... | 11 |
| 1.4.2. Solubilización de Fosfato..... | 12 |
| 1.4.3. Solubilización de Hierro..... | 13 |
| 1.4.4. Solubilización de Potasio..... | 14 |
| 1.4.5 Producción y modulación de fitohormonas..... | 15 |
| 1.5. EL GÉNERO AZOARCUS..... | 16 |
| 1.5.1. Diversidad biológica del género Azoarcus..... | 16 |
| 1.5.2. Grupo asociado a plantas..... | 17 |
| 1.5.3. Consideraciones sobre nicho ecológico y estilo de vida..... | 18 |
| 1.5.4. Los endófitos Azoarcus sp. BH72, Azoarcus communis y Azoarcus indigens..... | 19 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 21 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO..... | 21 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 21 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 3.1. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MECANISMOS PCV Y VINCULADOS A LA INTERACCIÓN PLANTA-ENDÓFITO..... | 22 |
| 3.1.1. Extracción de ADN genómico mediante lisado celular..... | 22 |
| 3.1.2. Confirmación de identidad de las cepas de estudio..... | 22 |
| 3.1.3. Detección de la presencia del gen <i>nifH</i> | 23 |
| 3.1.4. Detección de la producción de la fitohormona AIA..... | 24 |
| 3.1.5. Detección de la capacidad de solubilizar fosfato..... | 25 |
| 3.1.6. Detección de la capacidad de solubilizar potasio..... | 25 |
| 3.1.7. Detección de la capacidad de producir sideróforos..... | 25 |
| 3.1.8. Búsqueda de Probables Mecanismos de Infección (PMI)..... | 26 |
| 3.1.9. Detección de la formación de biopelículas..... | 27 |
| 3.2. ENSAYOS DE PCV EN SISTEMAS <i>GNOTOBIÓTICOS</i> | 27 |
| 3.3.1. Esterilización y germinación de las semillas..... | 27 |
| 3.3.2. Evaluación de la respuesta a la inoculación con Azoarcus sp. TTM91 en plantas de canola, festuca y sorgo dulce en condiciones gnotobióticas..... | 28 |
| 4. RESULTADOS | 30 |
| 4.0. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD DE LAS CEPAS DE ESTUDIO..... | 30 |
| 4.1. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> | 30 |
| 4.1.2. Evaluación de la presencia de PMI y formación de biopelículas en las cepas en estudio..... | 33 |
| 4.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE DISTINTOS CULTIVOS A LA INOCULACIÓN CON AZOARCUS SP. TTM91 EN ENSAYOS DE PCV EN CONDICIONES <i>GNOTOBIÓTICAS</i> | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 5. DISCUSIÓN | 37 |
| 5.1. EVALUACIÓN DE MECANISMOS DIRECTOS DE PCV | 37 |
| 5.1.1. <i>Fijación Biológica de Nitrógeno</i> | 37 |
| 5.1.2. <i>Solubilización de minerales</i> | 38 |
| 5.1.3. <i>Producción de AIA</i> | 39 |
| 5.2. EVALUACIÓN DE POSIBLES MECANISMOS DE COLONIZACIÓN E INFECCIÓN. | 40 |
| 5.2.1 <i>Colonización de la rizósfera y rizoplano</i> | 40 |
| 5.2.2 <i>Infección del hospedero</i> | 41 |
| 5.4. EVALUACIÓN DE LA PCV DE PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA POR LA CEPA <i>AZOARCUS</i> SP. TTM91..... | 42 |
| CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 44 |
| 6. ANEXO: | 46 |
| SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO | 46 |
| 6.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS:..... | 46 |
| 6.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA PLANTAS: | 48 |
| 6.3. SOLUCIONES Y REACTIVOS: | 48 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA: | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS:

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. ÁRBOL FILOGENÉTICO DEL GÉNERO <i>AZOARCUS</i> | 17 |
| FIGURA 2. SOLUBILIZACIÓN DE MINERALES | 31 |
| FIGURA 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL GEN <i>NIFH</i> | 32 |
| FIGURA 4. PRESENCIA DE PROBABLES MECANISMOS DE INFECCIÓN..... | 33 |
| FIGURA 5. ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS | 34 |

ÍNDICE DE TABLAS:

| | |
|--|----|
| TABLA 1. CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS. | 28 |
| TABLA 2. IDENTIDAD DE LAS CEPAS DE ESTUDIO..... | 30 |
| TABLA 3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN IN-VITRO. | 31 |
| TABLA 4. ENSAYO CANOLA | 35 |
| TABLA 5. ENSAYO FESTUCA..... | 35 |
| TABLA 6. ENSAYO SORGO DULCE | 35 |

ABREVIATURAS

AIA – Ácido indol-3-acético

BPCV – Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

FBN – Fijación biológica de nitrógeno

MPM – Marcador de peso molecular

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).

PCV – Promoción del crecimiento vegetal

PMI – Probables mecanismos de infección

Resumen

Actualmente, la mayor parte de la producción agrícola depende fuertemente del uso de fertilizantes químicos. Los mismos aportan nutrientes a las plantas aumentando así el crecimiento y la productividad de los cultivos, pero causando a su vez graves consecuencias en el medioambiente. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal constituyen una alternativa prometedora de cara a un manejo sostenible de los suelos agrícolas. Mediante diversos mecanismos tales como la biofertilización, bioestimulación o control biológico de fitopatógenos son capaces de promover el crecimiento de las plantas. Particularmente, las bacterias endófitas son aquellas capaces de colonizar los órganos internos de la planta sin causar infección aparente, siendo la cepa diazotrofa *Azoarcus* sp. BH72 uno de los modelos de endófitos más estudiados. Esta cepa tiene estrecha relación filogenética con *Azoarcus communis*, y *Azoarcus indigenes*, todas ellas aisladas del pasto Kallar (*Leptochloa Fusca*). A diferencia de la cepa BH72, no hay reportes sobre las características promotoras del crecimiento vegetal (PCV) de las mismas.

Como objetivo general se propuso estudiar las características PCV de las cepas *A. communis*, *A. indigenes* y de la cepa TTM91, también perteneciente al género *Azoarcus*. Se evaluaron *in vitro* diferentes posibles mecanismos de PCV y de infección de la planta. Los resultados mostraron, que las cepas de estudio presentaron el gen de la nitrogenasa (*nifH*) y fueron capaces de solubilizar sideróforos, si bien no se detectó actividad de enzimas vinculadas a los procesos de colonización e infección. Se profundizó en el estudio de la cepa *Azoarcus* sp. TTM91, evaluándose la respuesta a la inoculación en plantas de canola, festuca y sorgo dulce. Según las características evaluadas y en condiciones experimentales del presente trabajo no se observó PCV para la cepa TTM91. El presente trabajo constituye el primer estudio de las características PCV de las cepas evaluadas y de su potencial aplicación en distintos cultivos de interés. Este y otros estudios sobre las bacterias endófitas PCV constituyen un insumo fundamental de cara a encontrar nuevas estrategias para un manejo agrícola ambientalmente sostenible.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Impacto Ambiental del uso de Fertilizantes Químicos.

La mayor parte de la producción agrícola en la actualidad es altamente dependiente del uso de fertilizantes químicos. Los mismos mejoran la productividad de los cultivos gracias al aporte de nutrientes tales como el nitrógeno, fósforo y potasio (Souza *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de estos fertilizantes trae aparejadas graves consecuencias en el medio ambiente además del elevado coste económico. Un ejemplo a remarcar lo constituyen los fertilizantes nitrogenados cuyo uso se ha septuplicado en las últimas cuatro décadas (Ollivier *et al.*, 2011). Se calcula que cerca de la mitad del nitrógeno aplicado a los cultivos a nivel global, se pierde en el suelo por lixiviación, erosión del suelo, o emisión gaseosa. Esto trae como consecuencia la acidificación del suelo, la eutrofización, contaminación superficial y subterránea del agua, así como la pérdida de biodiversidad y producción de gases de efecto invernadero (Ollivier *et al.*, 2011).

Dadas las graves consecuencias medioambientales derivadas del uso de fertilizantes industriales, es necesario aunar los esfuerzos en la búsqueda y desarrollo de alternativas a los mismos que permitan un manejo sustentable de los suelos sin descuidar las demandas de producción actuales y futuras.

1.2. Rizósfera y bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La rizósfera es la estrecha zona del suelo que rodea y es influenciada por las raíces de las plantas (Laurent Philippot *et al.*, 2013, de Souza *et al.*, 2015). Allí, la concentración de bacterias es típicamente mucho mayor a la encontrada en el resto del suelo (Glick, 2012). Esto se debe a la presencia de nutrientes incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otras pequeñas moléculas exudadas por las raíces de las plantas y utilizadas como fuente de carbono por los microorganismos (Glick, 2012, Laurent Philippot *et*

al., 2013). La planta también afecta los niveles de oxígeno y agua en la rizósfera, así como el pH del suelo (Laurent Philippot *et al.*, 2013). De este modo, la actividad de las raíces afecta la composición de la microbiota rizosférica, la cual a su vez juega un rol central en el crecimiento, nutrición y salud de las plantas (Laurent Philippot *et al.*, 2013).

Los organismos atraídos a la rizósfera por los exudados de las raíces pueden tener efectos beneficiosos, neutrales o perjudiciales para las plantas (de Souza *et al.*, 2015). En particular, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), constituyen un grupo heterogéneo de bacterias beneficiosas capaces de incrementar el crecimiento de la planta a través de diversos mecanismos.

Las BPCV pueden establecer diferentes tipos de interacciones con las plantas. Algunas bacterias permanecen libres en la rizósfera, mientras que otras se adhieren a la superficie de las raíces. Otras bacterias son capaces de colonizar el interior de las raíces alojándose en los espacios intercelulares de los tejidos o en el interior de las células (Souza *et al.*, 2015). Dados los efectos beneficiosos de las BPCV en la salud y crecimiento de las plantas, su estudio resulta de gran interés de cara a un manejo más productivo y sustentable de los suelos agrícolas.

1.3. Endófitos.

1.3.1. Definición.

Los endófitos bacterianos son aquellos capaces de colonizar los tejidos internos de las plantas sin provocar síntomas de enfermedad. El aislamiento de “probables endófitos” se realiza a partir de tejidos de hojas, tallos y raíces de plantas esterilizadas en la superficie. Sin embargo, para ser definidos como “endófitos verdaderos” son requeridas pruebas adicionales que demuestren su localización en el tejido (mediante técnicas microscópicas), así como su capacidad de re-infectar plantas esterilizadas en la superficie (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). Es sabido que gran parte de los endófitos no son cultivables, lo cual imposibilita su aislamiento y utilidad

en aplicaciones biotecnológicas (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). En este sentido la metagenómica constituye una herramienta muy valiosa para estudiar la diversidad microbiológica asociada a distintos cultivos.

Algunos aspectos de la definición de endófitos han sido discutidos debido a las dificultades para establecer de forma definitiva el rol beneficioso o patógeno de los mismos. Ello se debe a la influencia de diversos factores que pueden modificar y determinar la funcionalidad de la bacteria según el contexto (Hardoim *et al.*, 2015). Mediante genómica comparativa, se han podido observar diferencias genómicas típicamente presentes en endófitos y no así en otras bacterias de la rizósfera, tales como la presencia de determinados genes vinculados a la regulación del metabolismo del carbono y nitrógeno, o a la respuesta al estrés, entre otros (Hardoim *et al.*, 2015).

1.3.2. Clasificación y estilo de vida.

Los endófitos pueden ser clasificados en distintas categorías dependiendo su estilo de vida. Los endófitos obligados son incapaces de proliferar fuera de la planta y son transmitidos de una generación a la siguiente por medio de las semillas (transmisión vertical) o los esquejes (Gaiero *et al.*, 2013). Los endófitos facultativos por su parte, pueden vivir en la rizósfera y colonizar a la planta por distintos mecanismos. La mayoría de los endófitos estudiados pertenecen a esta categoría, definiéndose su transmisión como transmisión horizontal. Este tipo de bacterias son capaces de colonizar la planta en forma activa mediante la degradación enzimática de celulosa y otros componentes presentes en la pared celular del hospedero. Otro grupo de endófitos es capaz de ingresar pasivamente a los tejidos de la planta a través de eventos estocásticos tales como la apertura de heridas en la zona de emergencia de los pelos radiculares o raíces laterales de la planta o bien en la zona de diferenciación y elongación de las raíces (Gaiero *et al.*, 2013; Hurek and Reinhold-Hurek, 2003).

Los endófitos bacterianos pueden también ser clasificados según su comportamiento o efecto en la planta hospedera. Los mutualistas son aquellos

que mejoran la salud y crecimiento de la planta, mientras que los comensales no tienen un efecto beneficioso ni perjudicial sobre esta o bien no se conoce su función. Estas definiciones no son absolutas, dado que el efecto ejercido por los endófitos sobre el hospedero suele ser variable en función de múltiples factores tales como el genotipo del hospedero, el estado fisiológico de la planta, el tipo de suelo o ambiente (Hardoim *et al.*, 2015). Así, un mismo endófito puede tener un efecto beneficioso en una planta y perjudicial en otra, o incluso en la misma bajo circunstancias distintas.

1.3.3. Endófitos y Fijación Biológica de Nitrógeno en Gramíneas.

El concepto de fijación biológica de nitrógeno (FBN) en endófitos es relativamente reciente (Baldani *et al.*, 2000). La introducción de este concepto ha contribuido a impulsar muchos estudios en las últimas décadas que condujeron al aislamiento y/o identificación de bacterias diazótroficas a partir de cultivos de gramíneas. Esto a su vez, impulsó múltiples investigaciones sobre el potencial de los endófitos para promover el crecimiento vegetal de dichos cultivos (Baldani *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2014; Bhattacharjee *et al.*, 2008; Hurek *et al.*, 2002). La presencia de BPCV ha demostrado ser la responsable del alto rendimiento en la productividad de ciertos cultivos de gramíneas provenientes de suelos aparentemente poco fértiles en los cuales no se había aplicado fertilizantes (Santos *et al.*, 2014).

1.3.4. Ventajas del uso de Endófitos como Bioinoculantes en Sistemas Agrícolas.

El uso de endófitos como bioinoculantes presenta múltiples ventajas con respecto a las bacterias que habitan en la rizósfera. Las bacterias endófitas viven en contacto íntimo con las células de la planta, lo cual les permitiría ejercer un efecto directo rápidamente (Santoyo *et al.*, 2016). Por otra parte, permanecer en el interior de los tejidos de la planta tales como el apoplasto, provee a los endófitos con una fuente constante de nutrientes. Así mismo, este

nicho les protege del ambiente hostil de la rizósfera, donde existe una gran competencia con otros microorganismos, así como diversos factores de estrés abióticos (Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014). Otra ventaja, consiste en su amplia distribución. De hecho, se piensa que los endófitos están presentes en todas las plantas, a diferencia por ejemplo de lo que ocurre con los rizobios, asociados a plantas leguminosas. Este dato no es menor, dado que los cultivos de mayor producción a nivel mundial tales como el arroz, maíz y el sorgo pertenecen a la familia de las gramíneas (<http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/>). Algunos cultivos de interés nacional como son el sorgo dulce y la canola también pertenecen a esta familia. Los bioinoculantes endofíticos constituyen así una buena alternativa para mejorar la productividad de distintos cultivos de interés en forma sustentable con el medio ambiente.

1.4. Mecanismos de Promoción del Crecimiento Vegetal.

Las BPCV contribuyen a mantener el buen estado sanitario de la planta e incrementar su crecimiento y productividad mediante diversos mecanismos. El conocimiento actual sobre los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PCV) utilizados por bacterias endofitas se basa en su mayor parte en estudios realizados con bacterias de la rizósfera (Santoyo *et al.*, 2016; Glick, 2012). Conceptualmente, los mecanismos de PCV suelen ser clasificados como directos (I) o indirectos (II).

I. Los mecanismos de PCV directos incluyen: 1) biofertilización o 2) fitoestimulación. Mediante la biofertilización las bacterias pueden incrementar el crecimiento vegetal aportando o facilitando la adquisición de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo, hierro o potasio cuando el crecimiento de la planta es limitado por las bajas concentraciones de dichos nutrientes. La fitoestimulación por su parte se da mediante la producción o modulación de distintas fitohormonas (u otros compuestos), siendo la producción de ácido indol-3-acético (AIA) uno de los más estudiados. (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014).

II. Los mecanismos de PCV indirectos ocurren en presencia de: 1) patógenos, 2) contaminantes y 3) otras condiciones de estrés (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). En presencia de fitopatógenos la bacteria inactiva o mata al mismo o bien protege a la planta mediante la inducción de la resistencia sistémica. En el segundo caso, el mecanismo consiste en la inactivación de contaminantes que impiden la germinación de la semilla o el crecimiento de la planta. Por último, la síntesis de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxylato (ACC) desaminasa promueve el crecimiento vegetal cuando el mismo es inhibido por condiciones de estrés (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014; Santoyo *et al.*, 2016).

1.4.1. Fijación biológica de nitrógeno

El Nitrógeno (N) es un nutriente esencial para la planta y limitante para su crecimiento y productividad. Se trata de un componente principal en la clorofila, los aminoácidos y otras biomoléculas de gran relevancia tales como el ATP y los ácidos nucleicos (Wagner, 2011).

Si bien el N se encuentra presente en cantidades abundantes en la atmósfera en su forma molecular (N_2), las plantas únicamente pueden utilizar formas reducidas de este elemento obtenidas a partir de procesos químicos naturales, industriales o bien mediante la conversión biológica (Vitousek *et al.*, 1997). La FBN es llevada a cabo por un grupo especializado de bacterias conocidas como diazótrofes, las cuales poseen la enzima nitrogenasa capaz de catalizar la conversión del N_2 atmosférico en amoníaco (NH_3) (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014; Glick, 2012). Este proceso consume una gran cantidad de energía en la forma de ATP e involucra la ruptura de un triple enlace covalente y la posterior adición de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno (Glick, 2012; Wagner, 2011). Los genes codificantes de la nitrogenasa (*nif*) se encuentran típicamente en un cluster de alrededor de 20-24Kb con siete operones los cuales codifican 20 proteínas diferentes.

La FBN puede tener lugar en diferentes bacterias siendo bien conocida la importancia que tiene dicho proceso en la interacción leguminosas-rizobios

formadores de nódulos. En comparación, el potencial uso de endófitos como bioinoculantes PCV es un concepto reciente en biología. El mismo se ha estudiado exhaustivamente a partir de los trabajos de Döbereiner con endófitos diazotrofos PCV aislados a partir de plantas de caña de azúcar en Brasil (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014).

1.4.2. Solubilización de Fosfato.

El fósforo es considerado el segundo nutriente más importante para el crecimiento de las plantas, luego del N, siendo un componente estructural clave en ácidos nucleicos y membranas fosfolipídicas además de cumplir importantes funciones en el metabolismo energético de la célula y la transducción de señales (Oteino *et al.*, 2015; White & Hammond, 2008).

A pesar de que la cantidad de fósforo presente en los suelos es alta, el mismo se encuentra mayoritariamente en forma de sales minerales o compuestos orgánicos insolubles y por lo tanto no disponibles para la planta (Glick, 2012; Oteino *et al.*, 2015; Rodríguez & Fraga, 1999). La baja biodisponibilidad del fósforo constituye así uno de los principales factores que limitan el crecimiento en los sistemas agrícolas (Oteino *et al.*, 2015).

La solubilización de fosfato es por tanto uno de los posibles mecanismos de PCV utilizados por las bacterias. Algunas son capaces de solubilizar compuestos de fosfato inorgánicos insolubles presentes en el suelo mientras que otras solubilizan fósforo a partir de compuestos orgánicos (mineralización). La solubilización de fosfato inorgánico se produce mediante la síntesis y liberación de ácidos orgánicos tales como el ácido glucónico, mientras que la mineralización de fósforo orgánico es catalizada por enzimas fosfatasas (Rodríguez & Fraga, 1999).

1.4.3. Solubilización de Hierro.

El hierro constituye otro de los elementos esenciales para el desarrollo de las plantas participando como cofactor en diversas vías metabólicas. Su deficiencia puede conducir a la disrupción de muchos procesos celulares incluyendo la respiración y fotosíntesis (Radzki *et al.*, 2013). Pese a ser el cuarto elemento más abundante presente en la corteza terrestre, en la naturaleza predomina como ión férrico (Fe^{3+}), el cual a menudo forma óxidos o hidróxidos poco solubles en agua. Así, la cantidad de hierro biodisponible para su asimilación por las plantas suele ser baja, constituyendo un factor limitante en sistemas agrícolas, excepto en suelos ácidos (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014; Radzki *et al.*, 2013).

La biofertilización con bacterias PCV constituye una posible estrategia para incrementar la biodisponibilidad del hierro en los cultivos agronómicos en forma amigable con el medioambiente, a diferencia de otras prácticas que involucran el uso de fertilizantes químicos o la aplicación sobre el suelo de sales de amonio o nitrato para modificar su pH (Radzki *et al.*, 2013). El mecanismo por el cual las bacterias solubilizan el hierro consiste en la síntesis y secreción de moléculas conocidas como sideróforos (Radzki *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2012; Fabiano & O'Brian, 2012). Los sideróforos comprenden a un conjunto estructuralmente diverso de compuestos de bajo peso molecular capaces de unirse al Fe^{3+} con muy alta afinidad y de manera reversible (Saha *et al.*, 2012). Si bien los sideróforos se diferencian ampliamente en su estructura general, la variación en los grupos de unión al hierro son más limitados (Fabiano & O'Brian, 2012). Una vez secretado, el sideróforo se une al hierro formando el complejo sideróforo- Fe^{3+} que ingresa así a la célula tras la unión a receptores de membrana externa (Saha *et al.*, 2012).

Es sabido que los endófitos producen comúnmente sideróforos en condiciones *in vitro* (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). Se ha hipotetizado que la síntesis de estos metabolitos en el interior de las raíces, donde la biodisponibilidad de hierro es muy baja, podría ser útil para desarrollar un estilo de vida endofítico (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). En cualquier caso, la

producción de sideróforos resulta fundamental para la adaptación a la rizósfera y poder colonizar la planta. Esto se debe a que la producción de sideróforos por las BPCV puede conferir una ventaja competitiva con respecto a otros microorganismos que lo produzcan en menores concentraciones o con menor afinidad por el hierro (Fabiano & O'Brian, 2012).

Algunos reportes sugieren que la producción de sideróforos por BPCV podría afectar positivamente la nutrición de la planta cuando el hierro es un factor limitante (Radzki *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2003). Adicionalmente, la producción de sideróforos juega un rol en el control biológico de fitopatógenos al limitar el Fe disponible en la rizósfera (Glick, 2012).

1.4.4. Solubilización de Potasio.

El potasio (K) es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Está involucrado en ajustar la presión osmótica celular, transportar agua y nutrientes a través del xilema así como en la activación de múltiples procesos metabólicos, tal como la fotosíntesis (Meena *et al.*, 2016; Zhang & Kong, 2014). También está involucrado en la resistencia de la planta a distintos factores de estrés bióticos y abióticos (Wang *et al.*, 2013). Su deficiencia puede causar que los bordes de las hojas adquieran un color amarillento, así como enlentecer el crecimiento de la planta o provocar un desarrollo radicular incompleto (Zhang & Kong, 2014).

El suelo tiene reservas ricas de K, mayormente en forma de minerales silicatos, que liberan K lentamente. Por el contrario, tan solo el 1-2% se encuentra disuelto (K^+) y disponible para ser directamente absorbido por la planta (Zhang & Kong, 2014). Algunos estudios han mostrado que una variedad de microorganismos son capaces de solubilizar potasio a partir de las reservas minerales presentes en el suelo tales como K-feldespatos, mica e illita (Zhang & Kong, 2014). Sin embargo la información disponible sobre bacterias rizosféricas solubilizadoras de potasio es aún escasa.

La solubilización de potasio se produce mediante la liberación de distintos ácidos orgánicos por las bacterias presentes en la rizósfera. Los

ácidos orgánicos pueden disolver el potasio directamente al favorecer la liberación de iones K del mineral gracias a la disminución del pH del medio. La solubilización también puede ocurrir en forma indirecta. En este caso la capacidad del ácido orgánico de quelar cationes de silicio, produce la disolución del mineral, liberando los iones K al suelo (Meena *et al.*, 2016). El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato podría ser una forma sustentable de mitigar las deficiencias de este mineral en distintos cultivos.

1.4.5 Producción y modulación de fitohormonas

Las bacterias son capaces de producir fitohormonas tales como auxinas, giberlinas y citokininas (Tsavkelova *et al.*, 2006). El etileno por su parte, suele asociarse principalmente a respuestas a condiciones de estrés (Glick, 2012). Una de las fitohormonas más estudiada en la interacción planta-bacteria es el AIA (Ramos Solano *et al.*, 2008; Tsavkelova *et al.*, 2006).

El AIA participa en la regulación de importantes procesos fisiológicos incluyendo la extensión y división celular, diferenciación de los tejidos, germinación, crecimiento del xilema y raíz, y crecimiento vegetativo. También inicia la formación lateral y adventicia de raíces y media las respuestas a la luz, gravedad y floración. Asimismo, afecta la fotosíntesis, formación de pigmentos y metabolitos, así como la resistencia a condiciones de estrés (Glick, 2012; Tsavkelova *et al.*, 2006).

Se estima que cerca del 80% de las bacterias presentes en la rizósfera son capaces de producir auxinas, de modo que el potencial de estos microorganismos de afectar los niveles endógenos, y por tanto los efectos en el crecimiento vegetal, son considerables (Ramos Solano *et al.*, 2008). La vía de síntesis del AIA puede ser dependiente o independiente de triptófano, siendo las más comunes las dependientes. El AIA producido por bacterias puede afectar en forma distinta la PCV dependiendo de múltiples factores tales como el hospedero, su estado fisiológico y el tipo de tejido (Ramos Solano *et al.*, 2008; Tsavkelova *et al.*, 2006; Spaepen *et al.*, 2007).

La producción de AIA por bacterias afecta el desarrollo y morfología de las raíces, como se ha demostrado utilizando mutantes de *Azospirillum* con su principal vía de síntesis de AIA bloqueada (Dobbelaere *et al.*, 1999). En estos estudios se observó una mayor formación de pelos radiculares a altas concentraciones de AIA. Sin embargo, no pudo observarse un aumento en el largo de las raíces, debido a que a altas concentraciones las auxinas suelen tener un efecto inhibitorio mientras que lo opuesto ocurre a concentraciones menores. Como sea, el incremento en el enraizamiento producido por el AIA aumenta el consumo de minerales por la planta y la exudación de las raíces lo cual estimula una mayor colonización bacteriana amplificando así el efecto de la inoculación (Spaepen *et al.*, 2007). Otros estudios realizados con *Pseudomonas putida* GR12-2 demostraron que la producción de AIA por la misma estimula la elongación de raíces en plantas de canola (Glick, 2012, Spaepen *et al.*, 2007).

1.5. El género *Azoarcus*.

1.5.1. Diversidad biológica del género *Azoarcus*.

En las últimas décadas ha habido considerable interés en el estudio de bacterias diazótroficas que interactúan positivamente con plantas no leguminosas, especialmente gramíneas (Faoro *et al.*, 2017). Diferentes especies bacterianas tales como *Azoarcus* sp. BH72, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae* 342 y *Burkholderia* spp., se han convertido en cepas modelos para el estudio de las interacciones entre endófitos diazótroficos y cultivos de gramíneas (Dixon & Hartmann, 2017). De todas ellas, la cepa BH72 perteneciente al género *Azoarcus*, constituye posiblemente el modelo más ampliamente estudiado (Dixon & Hartmann, 2017).

El género *Azoarcus* constituye un grupo diverso de bacterias gram negativas pertenecientes a la subclase β de las proteobacterias, concretamente al orden de los *Rhodocyclales*. Todas las cepas descritas hasta el momento

suelen agruparse, de acuerdo a la secuencia del gen *ARNr 16S*, en dos clados principales que se diferencian tanto a nivel filogenético como ecológico. Los mismos corresponden a: (I) un grupo de bacterias especializadas en su establecimiento como endófitos de gramíneas y aisladas a partir de plantas, y (II) un grupo que incluye a bacterias de vida libre aisladas a partir de aguas residuales y suelos contaminados, con capacidad de degradar compuestos aromáticos en condiciones anaeróbicas (Fernández Llamosas, 2018) (Figura 1).

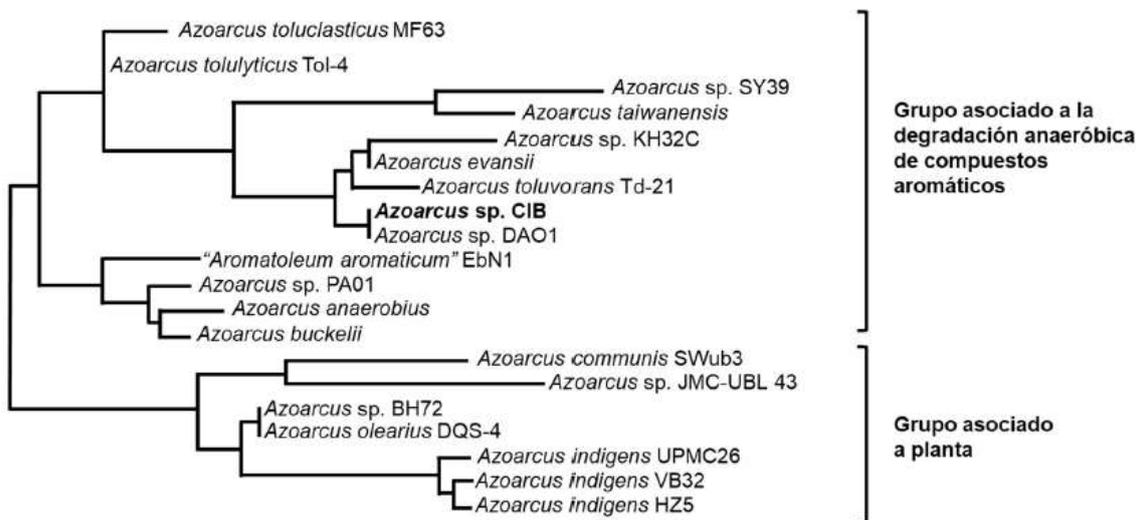


Figura 1. Árbol filogenético del género *Azoarcus*. Imagen tomada de Fernandez Llamosas (2018).

1.5.2. Grupo asociado a plantas.

La primera descripción del género *Azoarcus* se realizó a partir de cepas diazótroficas aisladas del interior de las raíces del pasto Kallar (*Leptochloa Fusca*) en la región de Punjab en Pakistan. El pasto Kallar es un cultivo que presenta buen crecimiento en suelos poco fértiles y con alta salinidad a los que no se aplican fertilizantes químicos, produciendo entre 20 a 40 toneladas de forraje verde por hectarea por año (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993).

El estudio de este cultivo llevó a la detección de actividad nitrogenasa en la rizósfera del mismo y posteriormente al aislamiento de probables endófitos bacterianos. Entre los aislamientos obtenidos a partir de la endorrizósfera del pasto Kallar, se encuentran la cepa BH72 antes mencionada, así como las especies *Azoarcus indigenes* VB32 y *Azoarcus communis* SWUb3, diferenciadas estas últimas por su requerimiento de vitaminas para el crecimiento o por su mayor tamaño celular, respectivamente (Reinhold *et al.*, 1986; Reinhold-Hurek *et al.*, 1993).

1.5.3. Consideraciones sobre nicho ecológico y estilo de vida.

Como se mencionó, otras especies del género *Azoarcus* han sido aisladas en vida libre a partir de suelos o agua contaminada, incluyendo a *A. anaerobius*, *A. evansii*, *A. taiwanensis*, *Azoarcus* sp. CIB, entre otras. Debido a la diferencias fenotípicas, filogenéticas y ecológicas se ha propuesto que el grupo asociado a plantas y el de las bacterias de vida libre sean separados en dos géneros distintos (Faoro *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que la cepa degradadora de compuestos aromáticos *Azoarcus* sp. CIB es capaz de actuar como endófito facultativo en cultivos de arroz (Fernández *et al.*, 2014). Mucho más interesantes aún son los resultados correspondientes a la caracterización genómica y fenotípica de la cepa *Azoarcus olearius* DQS-4^T, aislada recientemente a partir de un suelo contaminado con aceite cerca de una refinería en Taiwan (Chen *et al.*, 2013). Sorprendentemente, esta cepa mostró tener una identidad de secuencia nucleotídica de casi 99% con la cepa *Azoarcus* sp. BH72, a consecuencia de lo cual esta última ha sido incluida dentro de la especie *A. olearius*. Se demostró además en la cepa *A. olearius* DQS-4^T la presencia de múltiples genes relacionados a la colonización de la planta y a la promoción del crecimiento vegetal. También se describió un patrón de colonización endofítica idéntico al de BH72 así como la capacidad de PCV en festuca y arroz, posiblemente mediante la FBN (Faoro *et al.*, 2017). A la luz de estos resultados la división entre ambos grupos del género *Azoarcus* parece

no ser tan absoluta como se creía, al menos en términos del hábitat y comportamiento.

1.5.4. Los endófitos *Azoarcus* sp. BH72, *Azoarcus communis* y *Azoarcus indigenus*.

Como se mencionó, la cepa *Azoarcus* sp. BH72 constituye una especie modelo de estudio en lo que refiere a la colonización endofítica de gramíneas. Su secuencia genómica fue la primera correspondiente a un endófito diazótrofo en haber sido determinada (Krause *et al.*, 2006). Al igual que *A. communis* SWub3 y *A. Indigenus* VB32, se la considera un endófito obligado, no pudiendo ser aislado en vida libre. Por el contrario, la cepa DQS-4^T perteneciente a la misma especie, se encuentra en el suelo en vida libre.

La capacidad de la cepa BH72 de infectar y PCV de plántulas del pasto Kallar y arroz en sistemas *gnotobióticos* ha sido bien descrita (Hurek *et al.*, 2002; Hurek *et al.*, 1994). También se han descrito los sitios de infección y colonización dentro del hospedero (Hurek and Reinhold-Hurek, 2003), así como la importancia que los genes codificates de enzimas celulolíticas o de proteínas de pili tipo IV y del flagelo pueden tener en la infección de la planta (Hurek and Reinhold-Hurek, 2003). Más aún, se ha demostrado la capacidad de *Azoarcus* sp. BH72 de aportar N al pasto Kallar (Hurek *et al.*, 2002), si bien reportes previos mostraron que la FBN no parece estar involucrada en la PCV en arroz mediada por esta misma cepa (Hurek *et al.*, 1994).

Por su parte, las cepas *Azoarcus communis* SWub3 y *Azoarcus indigenus* VB32, aisladas también del pasto Kallar, son las más cercanas filogenéticamente a la cepa *Azoarcus* sp. BH72 (a excepción de la cepa recién mencionada DQS-4^T). Curiosamente, no se ha realizado una caracterización fenotípica de estas cepas a fin de estudiar sus propiedades PCV, como sí se ha hecho con la cepa BH72. Un aporte en este sentido ha sido la secuenciación del genoma de *Azoarcus communis* SWub3 (Zorraquino *et al.*, 2018), lo cual puede dar pistas sobre sus propiedades PCV.

La presente tesina constituye el primer estudio sobre las características PCV de las cepas endófitas *Azoarcus communis* SWub3 y *Azoarcus indigens* VB32^T y la cepa *Azoarcus* sp. TTM91. Esta última fue recientemente aislada a partir de agua de río de Taiwan (Chen *et al.*, no publicado) y presenta una muy alta homología de secuencia del gen *ARNr 16S* con *Azoarcus indigens* VB32.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis de Trabajo.

Las cepas *Azoarcus* sp. TTM91, *Azoarcus communis* SWub3 y *Azoarcus indigenes* VB32 presentan diferentes características PCV y son promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de interés agronómico.

Objetivo General.

Aportar conocimientos en relación a las características PCV presentes en las cepas *Azoarcus indigenes* VB32, *Azoarcus communis* SWub3 y *Azoarcus* sp. TTM91 y de su potencial aplicación como bioinoculantes en cultivos de interés agronómico.

Objetivos Específicos.

1. Evaluar en las cepas en estudio la presencia *in vitro* de mecanismos directos de PCV incluyendo la capacidad de solubilizar fosfato y potasio, de producir sideróforos y AIA; así como determinar la presencia del gen *nifH* (codificante para una de las subunidades de la enzima nitrogenasa).
2. Evaluar en las cepas en estudio la presencia *in vitro* de probables mecanismos de infección (PMI) de la planta incluyendo la capacidad de producir proteasas, peroxidasas y celulasas; así como la producción de biopelículas.
3. Evaluar el efecto de la inoculación de las cepa TTM91 en plantas de canola (*Brassica napus*), festuca (*Festuca aurundinacea*) y sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), mediante ensayos *gnotobióticos* de PCV.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación *in vitro* de mecanismos PCV y vinculados a la interacción planta-endófito.

3.1.1. Extracción de ADN genómico mediante lisado celular.

El ADN genómico utilizado como molde para la amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) del gen *ARNr 16S* y del gen *nifH* se obtuvo mediante el método de lisado celular. Para esto se colectaron en condiciones de esterilidad, colonias puras a partir de placa de Petri con medio de cultivo TSA (Anexo) conteniendo las distintas cepas a estudiar. Las mismas se resuspendieron en 100µL de agua mQ estéril. La suspensión obtenida se mezcló por vortex y centrifugó a 10.000g por 2 minutos (min). descartando el sobrenadante. El pellet se suspendió en 100µL de NaOH 0.05M y se calentó durante 4 min. a 100 °C. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo por 2 min. Posteriormente, se agregaron 900µL de agua mQ y se centrifugaron a 10.000g por 2 min. Finalmente, se retiraron 700µL del sobrenadante los cuales se conservaron a -20°C para su futuro uso.

3.1.2. Confirmación de identidad de las cepas de estudio.

Para el presente trabajo se utilizaron las cepas *A. indigenes* VB32, *A. communis* SWub3 y *Azoarcus* sp. TTM91 así como también la cepa *Azoarcus Olearius* DQS-4^T previamente caracterizada (Faoro *et al.*, 2017). Una vez recibidas, se procedió a verificar la identidad de las mismas antes de realizar los experimentos planificados. Para ello se realizó la amplificación mediante PCR del gen *ARNr 16S* utilizando los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Para la PCR por cada tubo de reacción se utilizó un volumen final de 50µL en el cual se incluyeron: 25µL

de buffer Master Mix 2X (ThermoScientific DreamTaq Green PCR), 15µL de H₂O desionizada estéril, 2µL de cebador 1492r, 2µL de cebador 27f, 2µL de seroalbúmina bovina (1% v/v) y 4 µL del ADN molde, o agua desionizada estéril para el control. El ciclo del programa utilizado en el termociclador fue; 3 min a 95°C para la desnaturalización inicial, seguido de 30 repeticiones de la siguiente secuencia: 30s a 95°C, 30s a 59°C y 90s a 72 °C; correspondientes a las temperaturas de desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores a las hebras y a la extensión del ADN por acción de la polimerasa respectivamente. El último paso del programa fue de 7 min a 72°C.

Para confirmar la amplificación del gen se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó mezclando 50mL de buffer TAE (Anexo) y 0,4g de agarosa en un matraz, calentando en microondas hasta disolver. El gel se tiñó agregando el agente intercalante de ADN SYBRTM Safe DNA Gel Stain (InvitrogenTM by Thermo Fisher Scientific). Una vez preparado el gel, se colocaron 5µL de muestra por pocillo y marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 1 kb Plus (ThermoScientificTM). El gel se corrió a 90V por 40min y se visualizó en un transiluminador. Comparando con el MPM se verificó la presencia de una única banda del tamaño esperado para el amplicón del gen (1500pb). Las distintas cepas fueron enviadas a secuenciar a Macrogen Inc., Korea.

A partir de las secuencias obtenidas se realizó la identificación a nivel de género mediante el uso de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparando con las secuencias de la base de datos “16S ribosomal RNA sequences” (Bacteria and Archea) disponible en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.1.3. Detección de la presencia del gen *nifH*.

Se realizó una amplificación por PCR del gen *nifH* de las cepas *A. indigenis*, *A. communis*, *Azoarcus* sp. TTM91 y *A. Olearius* DQS-4^T utilizando los cebadores PolF (5´-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3´) y PolR (5´-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3´) (Poly *et al.*, 2001). Para cada tubo de

reacción se utilizó un volumen final de 25µL conteniendo una mezcla de 8.5µL de H₂O destilada estéril, 12.5µL de buffer Master Mix (2X), 1µL de cebador PolR, 1µL de cebador PolF y 2µL de ADN o H₂O destilada para el control negativo. Como control positivo, se utilizó la cepa *Azoarcus olearius* DQS-4^T.

El programa utilizado por el termociclador consistió en un paso inicial de desnaturalización de 30s a 95 °C, seguido de un ciclo de 30 repeticiones de la siguiente secuencia: 30 s a 95°C, 30s a 59°C y 30s a 72°C. Por último, se realizó un paso de elongación por 5min a 72°C. Posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa, realizando el mismo procedimiento descrito en punto 3.1.2, se comprobó la presencia de una única banda del tamaño esperado (360 pb) para el gen *nifH* (Poly *et al.*, 2001).

3.1.4. Detección de la producción de la fitohormona AIA.

La capacidad de producir **AIA** se evaluó únicamente para la cepa de estudio *Azoarcus* sp. TTM91, utilizando para ello el método colorimétrico en microplacas previamente descrito (Sarwar & Kremer, 1995). Para ello, las cepas fueron crecidas por triplicado en tubos de ensayo conteniendo medio DYGs (Neto *et al.*, 1986) (Anexo) suplementado con triptófano 100 µg/µL o sin triptófano. Tras 72h en agitación a 37°C el cultivo se centrifugó a 10.000g durante 10 min. Posteriormente se colocaron 150µL de cada sobrenadante en microplacas de 96-pocillos a los cuales se le agregó 100µl del reactivo revelador de Salkowsky (Gordon & Weber, 1951)(Anexo). Las placas fueron incubadas por 30 min. en la oscuridad a temperatura ambiente. Para la curva de calibración se realizó una curva estándar con diluciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 µM de AIA sintético incubándose 150µL de cada dilución junto a 100µL de reactivo de Salkowsky, por triplicado. Finalmente se midió la densidad óptica a 540nm (D.O._{540nm}) y los cálculos se normalizaron con los datos de la densidad óptica a 620nm (D.O._{620nm}) del cultivo inicial. La cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 fue utilizada como cepa referencia productora de AIA en presencia de triptófano (Lee *et al.*, 2004) y un medio de cultivo sin inocular como control negativo.

3.1.5. Detección de la capacidad de solubilizar fosfato.

La capacidad de las tres cepas en estudio de solubilizar **fosfato**, se evaluó en placas de Petri conteniendo 20ml de medio GL suplementado con fosfato de calcio (Anexo) (Sylvester-Bradley *et al.*, 1982). A partir de placas con medio TSA en las cuales se crecieron colonias aisladas de las distintas cepas a evaluar, se tomaron las colonias con ayuda de un multiansa y se sembraron las distintas cepas en puntos separados de la placa con GL. A continuación se incubó a 30°C durante 5 días. Los aislamientos positivos fueron visualizados por la presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia. Como cepa referencia se empleó *Pantoea* sp. UYSB45 (Mareque *et al.*, 2015). El ensayo se realizó por duplicado.

3.1.6. Detección de la capacidad de solubilizar potasio.

La capacidad de las tres cepas estudiadas de solubilizar **potasio** se evaluó en placas de Petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo Aleksandrov (Avakyan *et al.*, 1986)(Anexo). Las cepas a evaluar se sembraron en puntos separados de la placa con el medio Aleksandrov (mismo procedimiento que en 3.1.5). Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días. Como control positivo se utilizó la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 (Taulé *et al.*, 2012). Un resultado positivo se visualizó por la presencia de un halo translúcido rodeando la colonia. El ensayo se realizó por duplicado.

3.1.7. Detección de la capacidad de producir sideróforos.

La evaluación de producción de **sideróforos** de las tres cepas de estudio, se efectuó mediante el crecimiento de las mismas en placas de Petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo CAS (Schwyn & Neilands, 1987) (Anexo). Las cepas a evaluar se sembraron en puntos separados de la placa con el medio CAS (mismo procedimiento que en 3.1.5). Las placas se incubaron a 30°C por 5 días. Como control positivo se utilizó la cepa de

referencia *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (Rosconi *et al.*, 2013). Un resultado positivo se visualizó por la presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia. El ensayo se realizó por duplicado.

3.1.8. Búsqueda de Probables Mecanismos de Infección (PMI).

La presencia de las actividades enzimática **celulasa** y **peroxidasa** en las tres cepas de estudio, se evaluó utilizando placas de Petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo VMEtOH suplementado con distintas fuentes de carbono según la actividad a ensayar (Anexo). Las cepas a evaluar se sembraron en puntos separados de las respectivas placas por el mismo procedimiento que en 3.1.5. A continuación se incubaron durante siete días a 30°C, momento en el cual se retiraron las colonias con un algodón humedecido en una solución de NaCl 1 N y se lavaron con rojo Congo 0,05% (p/v). Posteriormente las placas se guardaron a 4°C durante 24 horas y se lavaron nuevamente con una solución de NaCl 1 N. Como control positivo para los ensayos de producción de celulasas se utilizó la cepa *Acinetobacter* sp. UYSB41 (Mareque *et al.*, 2015). Un resultado positivo se identificó por la aparición de un halo amarillento alrededor de la colonia.

Por otra parte, se evaluó la presencia de **proteasas** para las tres cepas en estudio, en placas de Petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo TSA diluido 1/100, suplementado con leche descremada 5% (p/v) (Martinez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Las cepas se sembraron mediante el mismo procedimiento que en las ocasiones anteriores. Luego se incubaron durante 48hs a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus* sp. UYFA144. Los aislamientos positivos se visualizaron por la presencia de un halo alrededor de la colonia.

Los ensayos de proteasas, peróxidasas y celulasas se realizaron por duplicado.

3.1.9. Detección de la formación de biopelículas.

Para el ensayo de formación de **biopelículas** se evaluó la cepa *Azoarcus* sp. TTM91. La misma se inoculó en tubos de 50ml conteniendo el medio líquido VMEtOH a 37°C durante 24hs. A partir de estos cultivos, se inocularon tubos conteniendo VMEtOH hasta obtener una D.O_{620nm} final de 0.2. En el interior de cada tubo se colocó un portaobjetos con un tercio del mismo sumergido en el cultivo, dejando incubar el sistema a 37°C por 48hs sin agitación. Posteriormente los portaobjetos se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) 1X y se incubaron por 20 min. en tubos conteniendo cristal violeta 0.1%. Por último se lavó con agua el exceso de tinción y se observó y registró la presencia o no de biopelículas sobre el portaobjetos. Como control positivo se inoculó la cepa DQS-4^T y como control negativo el medio VM+EtOH. El ensayo se realizó por triplicado.

3.2. Ensayos de PCV en sistemas *gnotobióticos*

3.3.1. Esterilización y germinación de las semillas

Las semillas de canola, festuca y sorgo dulce se desinfectaron en su superficie previamente a ser inoculadas con las diferentes cepas en estudio. Para ello las mismas se incubaron en un frasco Erlenmeyer estéril conteniendo una solución de EtOH 70%. Posteriormente se lavó con agua estéril y se incubó con una solución de hipoclorito. Finalmente se realizaron 5 lavados con agua estéril de modo de remover el hipoclorito remanente. Las concentraciones de hipoclorito y etanol utilizadas así como los tiempos de incubación para cada variedad de semilla se especifican en la tabla 1. Para evaluar si la esterilización fue exitosa se frotaron con ayuda de un ansa estéril, 3 o 4 semillas, sobre una placa de Petri con medio de cultivo TSA. A continuación se descartaron esas semillas y se incubaron las placas a 30°C durante 48hs. En caso de no visualizarse crecimiento de colonias se consideró que la esterilización fue efectiva.

Para la germinación, las semillas desinfectadas se traspasaron a placas de agar-agua 0,8 % y se incubaron a la temperatura y tiempo óptimos para cada caso (tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de esterilización y germinación de las semillas.

| | Esterilización | | Germinación | |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|-------------|--------|
| | Etanol | Hipoclorito | Temperatura | Tiempo |
| Canola | 70% (v/v), 3 min | 4 % (v/v), 15 min | 30 °C | 7 días |
| Festuca (v. don tomás) | 70% (v/v), 3 min | 5 % (v/v), 45 min | Ambiente | 7 días |
| Sorgo dulce | 70% (v/v), 5 min | 4 % (v/v), 15 min | 30°C | 3 días |

3.3.2. Evaluación de la respuesta a la inoculación con *Azoarcus* sp. TTM91 en plantas de canola, festuca y sorgo dulce en condiciones *gnotobióticas*.

Una vez que germinaron las semillas, se traspasaron a tubos de crecimiento conteniendo 15mL de medio Jensen (Vincent, 1970) (Anexo), y un soporte sólido inerte de polipropileno. Se obtuvieron dos plántulas por tubo a excepción de sorgo dulce donde solo creció una plántula por tubo. A continuación se inoculó sobre las semillas de las plántulas 1×10^7 u.f.c (unidades formadoras de colonias) de la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 a ser evaluada, así como de las cepas *Azoarcus olearius* DQS-4^T y la cepa promotora de referencia para cada planta. Las mismas fueron previamente crecidas en medio líquido por 24 horas, y se calculó su concentración midiendo la D.O. del cultivo a una longitud de onda de 620nm. A continuación se centrifugaron las células a 10.000 g por 2 minutos, y se resuspendió el pellet en NaCl 0.9% (p/v). Como control negativo se inoculó NaCl 0.9% (p/v) y como control positivo se utilizó KNO₃ a una concentración final de 0.05% (p/v). Las cepas utilizadas como referencia de PCV para sorgo dulce, canola y festuca son la *Azospirillum brasilense* Sp7 (Mareque *et al.*, 2015), *Pseudomonas* sp. UYBN151 (Ferrari Fructos, 2017) y *Spreptomyces* sp. UYFA156 (De los Santos *et al.*, 2016) respectivamente. Las plántulas fueron incubadas en un fotoperíodo controlado de 16/8 horas de

luz/oscuridad a 26 °C. Se realizaron diez réplicas para cada inóculo. Tras 14 días post-inoculación se detuvo el ensayo y se midieron los parámetros biométricos de peso seco y altura de la planta. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y se evaluó si los datos son normales mediante el test de Shapiro-Wilks (modificado). Mediante los test de Tukey y el Test de Fisher se determinó si existen diferencias significativas entre las medias obtenidas para peso seco y altura utilizando un p-valor de 0.1.

4. RESULTADOS.

4.0. Confirmación de Identidad de las Cepas de Estudio.

Previamente a realizar los ensayos de caracterización *in vitro* se confirmó la identidad de las cepas de estudio, *Azoarcus communis* SWub3, *Azoarcus indigenes* VB32 y *Azoarcus* sp. TTM91, mediante la metodología anteriormente descrita. La secuencia del gen *ARNr 16S* de esta última cepa aún no ha sido subida al NCIB dado que fue aislada recientemente por un grupo con el cual se mantiene colaboración, siendo por lo tanto identificada por su alta homología de secuencia con *Azoarcus indigenes* VB32 tal como nos fue indicado. Nuestros resultados para *Azoarcus* sp. TTM91 presentaron un 97% de identidad nucleotídica para el *ARNr 16S* con *Azoarcus indigenes* VB32, coincidiendo con lo esperado (resultado no mostrado). En la tabla 2 se muestran los resultados del BLAST para *A. communis* SWub3 e *A. indigenes* VB32 así como para *A. olearius* DQS-4^T.

Tabla 2. Identidad de las cepas de estudio

| Género | Nombre | Índice de Cobertura | Índice de identidad | NCBI Reference Sequence |
|----------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| Azoarcus | <i>A. communis</i> SWub3 | 1 | 0.992 | NR 024850.1 |
| | <i>A. indigenes</i> VB32 | 0.99 | 0.996 | NR 024851.1 |
| | <i>A. olearius</i> DQS-4 | 0.99 | 1 | NR 108183.1 |
| | | | | |

4.1. Caracterización *in vitro*.

Los mecanismos de PCV evaluados en condiciones *in vitro* fueron la capacidad de solubilizar fosfato y potasio, de producir sideróforos, así como la de producir la fitohormona AIA y la presencia del gen *nifH* en su secuencia genómica. Asimismo, se evaluaron los PMI incluyendo la presencia de las actividades proteasas, celulasas y peroxidasas, así como la capacidad de formar biopelículas sobre una superficie abiótica. Los ensayos anteriores se realizaron

para las tres cepas de estudio: *Azoarcus communis* SWub3, *Azoarcus indigens* VB32 y *Azoarcus* sp. TTM91 exceptuando la formación de biopelículas y la producción de AIA evaluados únicamente para la cepa *Azoarcus* sp. TTM91. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la caracterización in-vitro.

| CEPA | Características PCV | | | | | PMI | | | |
|---------------------------|---------------------|-------|-------|-----|------|--------------|-------|------|-----|
| | Sid | Sol P | Sol K | AIA | nifH | biopelículas | perox | prot | cel |
| <i>Azoarcus</i> sp. TTM91 | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| <i>A. communis</i> SWub3 | + | - | - | *** | + | *** | - | - | - |
| <i>A. Indigens</i> VB32 | + | - | - | *** | + | *** | - | - | - |

Resultados positivos (+) y negativos (-) para los mecanismos de PCV y de infección evaluados. No evaluado***.

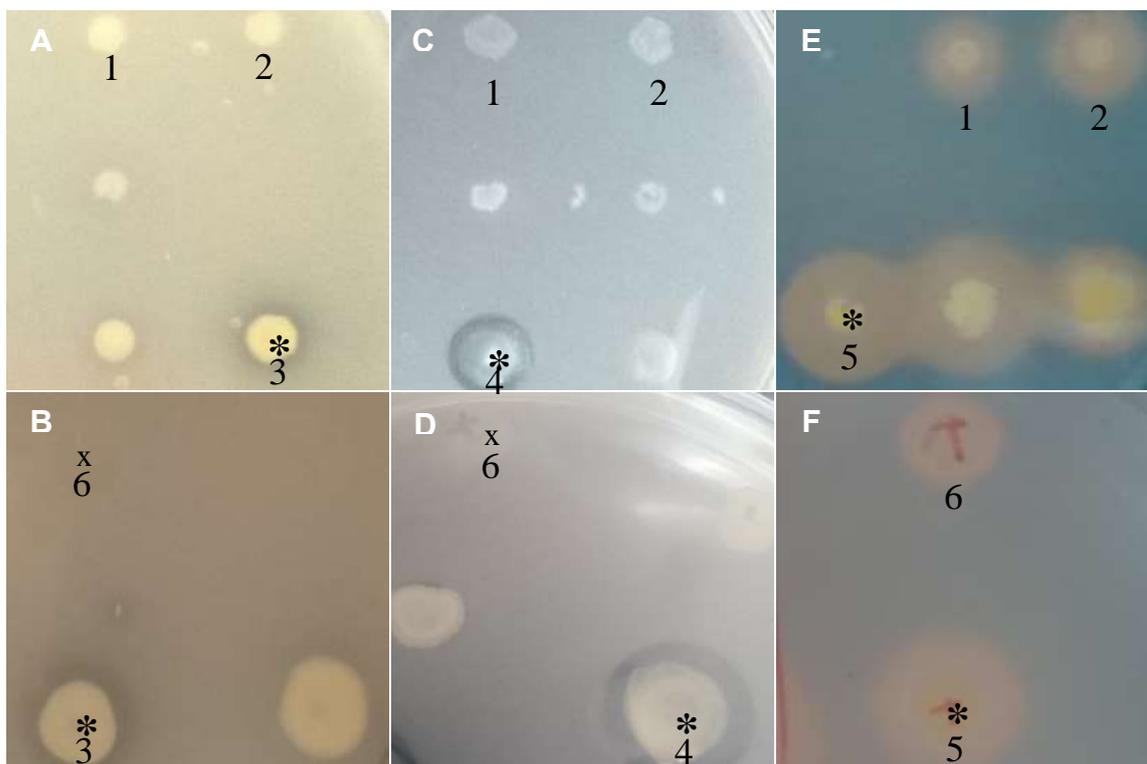


Figura 2. Solubilización de minerales. A,B: Solubilización de P. **C,D:** Solubilización de K. **E,F:** Capacidad de producir sideróforos. 1: *Azoarcus communis* SWub3, 2: *Azoarcus indigens* VB32, *3: *Pantoea* sp. UYSB45, *4: *Kosakonia* sp. UYSO10, *5: *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 6: *Azoarcus* sp. TTM91.*control positivo

4.1.1. Evaluación de la presencia de mecanismos de PCV en las cepas en estudio.

Las cepas *Azoarcus communis* SWub3, *Azoarcus indigenus* VB32 y *Azoarcus* sp. TTM91 fueron capaces de producir sideróforos mientras que ninguna de las mismas fue capaz de solubilizar fosfato o potasio (Tabla 3, Fig. 2).

Por otra parte, las tres cepas en estudio mostraron una única banda del tamaño esperado correspondiente al gen *nifH*, como puede observarse en el gel de agarosa de la figura 3 para la cepa TTM91 (Tabla 3, Fig. 3).

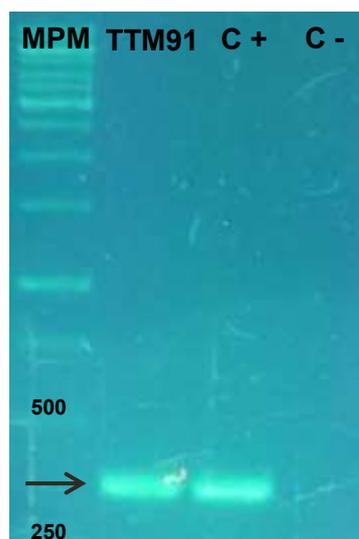


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del gen *nifH*

C+: *A. olearius* DQS-4^T

C-: Agua deionizada

En cuanto al ensayo de producción de AIA los resultados mostraron que tanto en medio DYGs suplementado con triptófano o no, la cepa TTM91 no fue capaz de producir la fitohormona en las condiciones estudiadas (Tabla 3).

4.1.2. Evaluación de la presencia de PMI y formación de biopelículas en las cepas en estudio.

Los resultados mostraron la ausencia de las actividades enzimáticas evaluadas para las tres cepas estudiadas (Tabla 3, Fig. 4).

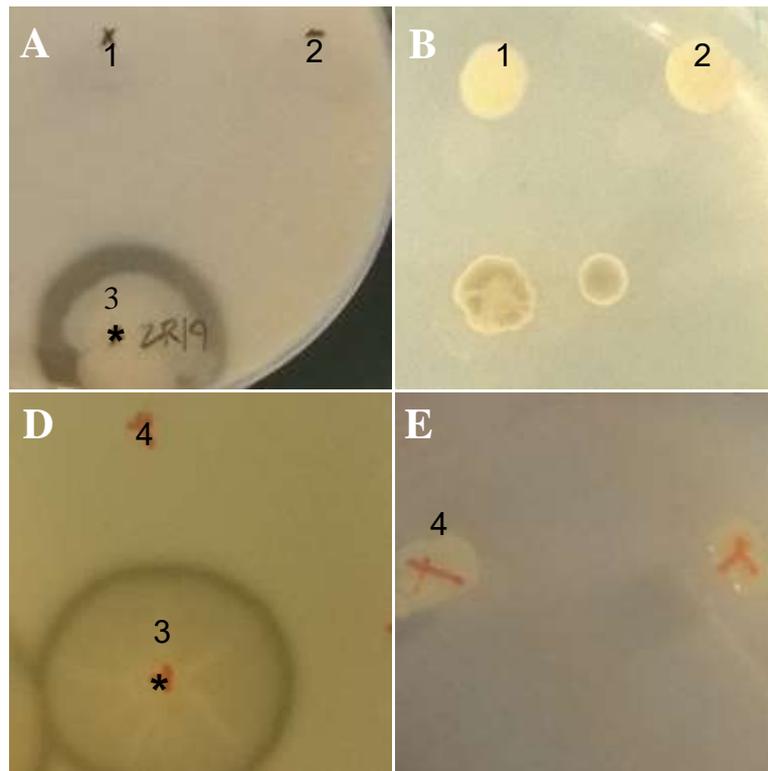


Figura 4. Presencia de PMI. A,D: actividad proteasa. **B,E:** actividad peroxidasa. 1: *Azoarcus indigenes* VB32, 2: *Azoarcus communis* SWub3, 3: *Bacillus* sp. UYFA144, 4: *Azoarcus* sp. TTM91, * control positivo

Por otra parte se detectó la capacidad de formar biopelículas en una superficie abiótica, en la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 (Tabla 3, Fig. 5).

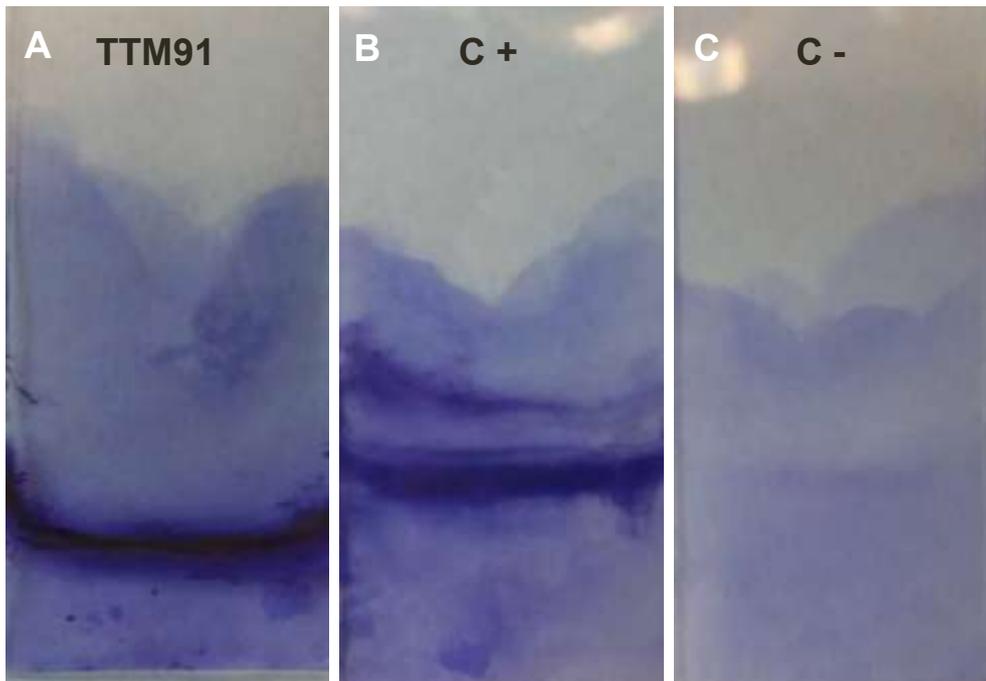


Figura 5. Ensayo de formación de biopelículas. Se visualiza por la técnica de cristal violeta la formación de biopelículas sobre portaobjetos para los ensayos correspondientes a las cepas **A:** *Azoarcus* sp. TTM91; **B:** *A. olearius* DQS-4^T y **C:** VM + EtOH

La tabla 3 resume los resultados obtenidos para la caracterización *in vitro* de las cepas *Azoarcus* sp. TTM91, *Azoarcus indigenes* VB32 y *Azoarcus communis* SWub3.

4.2. Evaluación de la respuesta de distintos cultivos a la inoculación con *Azoarcus* sp. TTM91 en ensayos de PCV en condiciones *gnotobióticas*.

En las tablas 4, 5 y 6 se muestran los resultados del peso seco y altura de las plantas de Canola, Festuca y Sorgo dulce tras levantar el ensayo a los catorce días luego de la inoculación con los distintos tratamientos. Se realizaron dos test estadísticos diferentes para evaluar si la media de los valores de peso seco y altura obtenidos para los distintos tratamientos presenta o no a diferencias significativas.

Tabla 4. Ensayo Canola

| Tratamiento | Peso seco (mg) | Altura (cm) |
|---|----------------------|----------------------|
| Control positivo (+) | 4.8 (± 0.5) ** | 5.4 (± 0.7) ** |
| <i>Pseudomonas</i> sp. UYBN151 | 4.3 (± 0.6) * | 4.0 (± 0.5) |
| <i>Azoarcus</i> sp. TTM91 | 4.0 (± 0.5) | 4.3 (± 0.5) |
| <i>A. olearius</i> DQS-4^T | 3.8 (± 1.0) | 4.2 (± 0.4) |
| Control negativo (-) | 3.5 (± 0.6) | 3.9 (± 0.6) |

Ref: cepa referencia; Control positivo (+): tratamiento sin inocular y suplementado con Nitrato 0.05%; Control negativo (-): tratamiento sin inocular y suplementado con NaCl 0.9%. Tratamientos que presentaron diferencias significativas con el test Tukey y Fisher ** $p < 0.1$ o únicamente con el test de Fisher*.

Tabla 5. Ensayo Festuca

| Tratamiento | Peso seco (mg) | Altura (cm) |
|---|----------------------|-----------------------|
| Control positivo (+) | 3.8 (± 0.1) ** | 13.1 (± 0.5) ** |
| <i>Spreptomyces</i> sp. UYFA156 | 3.2 (± 0.1) ** | 10.4 (± 0.4) |
| <i>Azoarcus</i> sp. TTM91 | 2.8 (± 0.1) | 9.7 (± 0.4) |
| <i>A. olearius</i> DQS-4^T | 3.0 (± 0.1) * | 10.7 (± 0.4) |
| Control negativo (-) | 2.7 (± 0.1) | 9.9 (± 0.4) |

Ref: cepa referencia; Control positivo (+): tratamiento sin inocular y suplementado con Nitrato 0.05%; Control negativo (-): tratamiento sin inocular y suplementado con NaCl 0.9%. Tratamientos que presentaron diferencias significativas con el test Tukey y Fisher ** $p < 0.1$ o únicamente con el test de Fisher*.

Tabla 6. Ensayo Sorgo dulce

| | Peso seco (mg) | Altura (cm) |
|---|------------------|----------------------|
| Control positivo (+) | 22 (± 1) | 5.1 (± 0.2) ** |
| <i>Azospirillum brasilensis</i> Sp7 | 27 (± 1) * | 4.6 (± 0.2) * |
| <i>Azoarcus</i> sp. TTM91 | 21 (± 1) | 4.1 (± 0.2) |
| <i>A. olearius</i> DQS-4^T | 23 (± 1) | 4.0 (± 0.2) |
| Control negativo (-) | 24 (± 1) | 3.9 (± 0.2) |

Ref: cepa referencia; Control positivo (+): tratamiento sin inocular y suplementado con Nitrato 0.05%; Control negativo (-): tratamiento sin inocular y suplementado con NaCl 0.9%. Tratamientos que presentaron diferencias significativas con el test Tukey y Fisher ** $p < 0.1$ o únicamente con el test de Fisher*.

Como se observa, los análisis estadísticos de los resultados empleando los test de Tukey y Fisher ($p < 0.1$), mostraron que la cepa en estudio, TTM91, no es promotora del crecimiento vegetal de ninguno de los cultivos ensayados (Tablas 4-6). Cabe resaltar que el tratamiento con la cepa tipo DQS-4^T mostró un aumento significativo del peso seco aéreo de plantas de festuca. Como era de esperar, los tratamientos con cepas de referencia *Pseudomonas* sp. UYBN151 y *Streptomyces* sp. UYFA156 también mostraron un aumento significativo en el peso seco de plantas de canola y festuca respectivamente; mientras que la cepa *Azospirillum brasilensis* Sp7 mostró asimismo un aumento significativo en la de las plantas de sorgo dulce.

5. DISCUSIÓN.

Dados los graves impactos ambientales derivados del uso de fertilizantes químicos así como los altos costos económicos de los mismos, es de gran interés encontrar alternativas a su uso. Los endófitos bacterianos constituyen una alternativa prometedora para el desarrollo de inoculantes capaces de mejorar la productividad de cultivos de interés agronómico en forma sustentable con el medio ambiente. Si bien existen varias cepas de BPCV comercializadas en la actualidad, su uso representa tan solo una pequeña minoría de las prácticas agrícolas en el mundo (Glick, 2012). En este sentido, la investigación básica resulta fundamental de cara a la búsqueda y evaluación de potenciales candidatos a ser utilizados como bioinoculantes en diferentes cultivos de interés.

El presente trabajo tuvo como propósito primario aportar información en relación a las propiedades PCV de las cepas *A. communis* SWub3, *A. indigenes* VB32 y *Azoarcus* sp.TTM91, para lo cual no hay reportes anteriores que sean de nuestro conocimiento. El interés práctico, radica en la generación de nuevos insumos de cara a un manejo sustentable de los suelos agrícolas. Mediante ensayos *in vitro* se evaluó la presencia de mecanismos PCV así como características vinculadas a los procesos de infección y colonización del hospedero. A su vez, se realizaron ensayos *in vivo* en condiciones *gnotobióticas* con el fin de evaluar el potencial del inoculante seleccionado de PCV en distintos cultivos de interés agronómico. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

5.1. Evaluación de mecanismos directos de PCV

5.1.1. Fijación Biológica de Nitrógeno.

La FBN constituye uno de los principales mecanismos utilizados por las bacterias para promover el crecimiento vegetal. Se ha demostrado que distintas bacterias endófitas son capaces de aportar cantidades significativas de N en cultivos de gramíneas como arroz o caña de azúcar (Baldani *et al.*, 2000).

Dos de las cepas caracterizadas en el presente trabajo, *A. communis* SWub3 y *A. indigena* VB32, fueron aisladas del pasto Kallar utilizando viales con medio de cultivo semisólido SM sin N (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993). El crecimiento en el medio de cultivo SM podría explicarse por la obtención del N atmosférico mediante fijación biológica. Nuestros resultados confirman que tanto estas dos cepas como la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 contienen el gen de la nitrogenasa (*nifH*). Particularmente para la cepa *Azoarcus communis* SWub3, el resultado coincide con los datos aportados por la secuenciación de su genoma (Zorraquino *et al.*, 2018). Por otra parte, la estructura del gen *nifH* para las cepas asociadas a plantas presenta considerables diferencias con respecto a las cepas de *Azoarcus* de vida libre (Faoro *et al.*, 2017). Queda por verse si los genes *nifH* de la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 aislada de vida libre, presenta tales diferencias con respecto a las otras dos cepas de estudio, aisladas del pasto Kallar. En cualquier caso, nuestros datos indican que las tres cepas de estudio son potenciales diazótrofes, restando aún por realizar el ensayo de reducción de acetileno para confirmarlo. Se ha demostrado ya la diazotrofia para otras cepas estrechamente emparentadas tales como la cepas *A. olearius* DQS-4^T y *Azoarcus* sp. BH72 (o *A. olearius* BH72). Para la cepa BH72 se atribuye a la FBN la capacidad de PCV en el pasto Kallar, si bien en otros cultivos como arroz otros mecanismos estarían involucrados en la PCV (Faoro *et al.*, 2017). En este sentido, de demostrarse que las cepas estudiadas son diazótrofes, no resultaría inmediato concluir que las mismas fuesen capaces de PCV mediante dicho mecanismo, sino que ello debería evaluarse para cada planta en particular.

5.1.2. Solubilización de minerales.

El fósforo, potasio y hierro son nutrientes esenciales para la buena salud y el crecimiento de las plantas. La capacidad de aportar dichos nutrientes a las plantas constituye un mecanismo por el cual los endófitos son capaces de PCV, en especial cuando la biodisponibilidad de dichos nutrientes en el ambiente es limitada (Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014).

Los resultados de este trabajo mostraron que ninguna de las cepas evaluadas fue capaz de solubilizar fosfato ni potasio. De igual forma, las cepas BH72 y DQS-4^T tampoco parecen solubilizar fosfato a juzgar por lo observado en sus secuencias genómicas. En forma consistente con dichos análisis, la cepa DQS-4^T no fue capaz de solubilizar fosfato en condiciones *in vitro* (Faoro *et al.*, 2017). En dichos ensayos al igual que en los nuestros se evaluó la capacidad de solubilizar fosfato de calcio. Ello no asegura que dichas cepas no sean capaces de solubilizar dicho nutriente a partir de otras fuentes tales como compuestos orgánicos, para los cuales la solubilización de fosfato ocurre mediante mecanismos diferentes. Por otra parte, las tres cepas evaluadas en este trabajo fueron capaces de producir sideróforos en placas con medio CAS. Estos resultados difieren de lo observado para la secuencia genómica de la cepa BH72 la cual sugiere que la misma es incapaz de producir sideróforos (Faoro *et al.*, 2017). Por el contrario, hay evidencia genómica y experimental de producción de sideróforos en la cepa *A. olearius* DQS-4^T (Faoro *et al.*, 2017). Dichas diferencias podrían relacionarse a adaptaciones a diferentes ambientes de las cepas BH72 y DQS-4^T. En cualquier caso, la producción de sideróforos constituye un factor importante para el proceso de infección y colonización de la planta hospedera al conferir una ventaja competitiva con respecto a otros microorganismos que habiten en la rizósfera (Fabiano & O'Brian, 2012; Compant *et al.*, 2010). La producción de sideroforos podría constituir asimismo un mecanismo de biocontrol de fitopatógenos (Glick, 2012) o bien de biofertilización al mejorar la nutrición de la planta cuando el hierro se encuentra en bajas concentraciones (Radzki *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2003).

5.1.3. Producción de AIA.

Más del 80 % de las bacterias presentes en la rizósfera son capaces de producir auxinas. La producción de auxinas por bacterias puede potencialmente modificar los niveles endógenos de dichas hormonas afectando así el crecimiento vegetal (Ramos Solano, *et al.*, 2008). En el presente trabajo se evaluó la capacidad de producir AIA únicamente en la cepa *Azoarcus* sp.

TTM91. En este ensayo se emplearon medios de cultivo suplementados o no con triptófano, de modo de evaluar tanto la vía de síntesis dependiente así como la independiente del mismo (Spaepen *et al.*, 2007). De acuerdo a los resultados de nuestros ensayos, tanto los realizados en presencia como en ausencia de triptófano, la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 no fue capaz de producir AIA *in vitro*. Este resultado coincide con los reportados para las cepas DQS-4^T y BH72, contrastando a su vez con lo reportado para la cepa *Azoarcus* sp. CIB capaz de sintetizar AIA *in vitro*, todos evaluados igualmente por el método de Salkowski (Faoro *et al.*, 2017). Aún resta por evaluar la producción de AIA para las cepas *Azoarcus indigens* VB32 y *Azoarcus communis* SWub3.

5.2. Evaluación de posibles mecanismos de colonización e infección.

En muchos casos, las BPCV son incapaces de producir los efectos deseados cuando son aplicadas en el campo. Esto puede deberse a una insuficiente colonización de la rizósfera y/o la planta, los cuales constituyen requisitos importantes para obtener los efectos deseados tras la inoculación (Compant *et al.*, 2010). Es por ello que resulta fundamental no solo estudiar los posibles mecanismos de PCV sino también aquellos involucrados en los procesos de colonización e infección del hospedero.

5.2.1 Colonización de la rizósfera y rizoplano.

Las tres cepas estudiadas en este trabajo fueron capaces de producir sideróforos. Como ya se mencionó, la producción de sideróforos juega un rol importante en la colonización e infección del hospedero al otorgar una ventaja competitiva para la colonización de la rizósfera y posteriormente de la superficie de la raíz (Compant *et al.*, 2010). Allí, las bacterias pueden adherirse a la superficie de células rizodermales formando biopelículas (Compant *et al.*, 2010). La adhesión a la superficie es esencial para el inicio de la infección (Hurek and Reinhold-Hurek, 2003). De acuerdo a nuestros resultados la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 fue capaz de formar biopelículas sobre una superficie

abiótica. De estos resultados podría esperarse que la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 posee mecanismos favorables para la colonización de la rizósfera y el rizoplano, mientras que la producción de sideróforos podría favorecer la colonización de la rizósfera de las cepas *A. communis* SWUb3 y *A. indigens* VB32, restando aún por evaluar la capacidad de estas últimas de formar biopelículas.

5.1.2 Infección del hospedero.

Los mecanismos mencionados anteriormente refieren principalmente a la colonización de la rizósfera y el rizoplano. La colonización endofítica involucra otros mecanismos adicionales necesarios para el ingreso desde el rizoplano hacia el cortex del sistema radicular y posteriormente a través de la endodermis (Compant *et al.*, 2010). La penetración de la bacteria puede darse mediante la secreción de enzimas capaces de degradar la pared celular.

Para ninguna de las cepas evaluadas en este trabajo se detectó actividades proteasas, peroxidasas o celulasas. Estos resultados sugieren que estas cepas no serían capaces de infectar activamente a la planta mediante la secreción de dichas enzimas. Dichos resultados coinciden con los reportados para las cepas DQS-4^T y BH72 las cuales no poseen genes para enzimas degradadoras de pared celular ni tampoco presentan actividad de celulasa *in vitro* (Reinhold Hurek *et al.*, 2006; Faoro *et al.*, 2017) , y de acuerdo a lo evaluado para DQS-4^T, tampoco actividad peroxidasa, hemicelulasa ni proteasa (Faoro *et al.*, 2017). Sin embargo, ambas cepas poseen el gen *eglA* para endoglucanasa, el cual ha mostrado ser esencial para la colonización endofítica de BH72 en arroz (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006; Faoro *et al.*, 2017). Queda por verse si dicho gen está también presente en el genoma de *Azoarcus communis* SWub3 (Zorraquino *et al.*, 2018) y en las otras cepas y su rol durante la infección del hospedero. Las condiciones estudiadas en el presente trabajo no fueron adecuadas para la detección de dicha enzima. Independientemente de las anteriores consideraciones, existen también mecanismos pasivos por el cual las cepas podrían infectar al hospedero ya sea

a través del sitio de emergencia de las raíces laterales, la zona de elongación y diferenciación radicular, así como roturas o heridas provocadas por insectos u otras causas (Hurek and Reinhold-Hurek, 2003; Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014).

En suma, las cepas estudiadas presentan características favorables para la colonización de la superficie de las raíces, mientras que la colonización endofítica estaría posiblemente dada por mecanismos pasivos. Restan por evaluar la presencia del gen *eglA* y otras propiedades vinculadas a dicho proceso, tales como la presencia del pili tipo IV, movilidad tipo "twitching", presencia de lipopolisacáridos y de flagelo (Compant *et al.*, 2010).

5.4. Evaluación de la PCV de plantas de interés agrícola por la cepa *Azoarcus* sp. TTM91.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para los ensayos de respuesta de sorgo, canola y festuca a la inoculación con la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 se llevó a cabo utilizando los test de Tukey y de Fisher mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017). De acuerdo a los resultados obtenidos, en ninguno de los casos hubo diferencias significativas entre la cepa *Azoarcus* sp. TTM91 y el control negativo. Se puede concluir que la cepa evaluada no fue PCV de los cultivos en estudio. Por su parte, el análisis de los resultados de los tratamientos con nitrato y sin inocular, y de los tratamientos con las cepas de referencia dieron de acuerdo con lo esperado, validando así los ensayos realizados. La excepción a esto puede verse en los resultados de peso seco de sorgo dulce, donde el control positivo dio valores inferiores al control negativo, si bien la cepa de referencia mostró promoción de acuerdo a lo esperado. Esto podría deberse a un error de experimental en la inoculación del tratamiento con nitrato o a que se utilizaran semillas viejas. En cualquier caso, cabe mencionar que algunas diferencias significativas detectadas mediante el test de Fisher no fueron detectadas por el test de Tukey utilizando un mismo p-valor (<0.1), lo cual puede deberse a que este último test es más conservador (Hayter, 1984). Ello podría explicar que, contrastando con lo

reportado por Faoro *et al.* (2017), la PCV de Festuca por la cepa DQS-4^T no haya sido detectada mediante el test de Tukey mientras que sí pudo observarse dicha diferencia utilizando el test de Fisher. En este sentido, se debe ser más riguroso en próximos ensayos, en asegurarse de mantener muestras equilibradas para los análisis estadísticos, ya que el test de Tukey aplicado a muestras no equilibradas (es decir de distintos tamaños) requiere diferencias grandes para que resulte significativo, aumentando así la probabilidad de obtener falsos negativos. Si bien se realizó 10 réplicas para cada tratamiento, en algunos casos no se obtuvo buen enraizamiento de las semillas por lo que se obtuvieron tamaños de muestras variables entre 7 y 10 para las medidas de peso seco y altura; comparándose así muestras no equilibradas en algunos casos como se mencionó antes. Otra posible consideración a tener en cuenta, de acuerdo a lo propuesto por Saville (1990) sería utilizar el test LSD no restringido. Con ello podrían solventarse las inconsistencias que los métodos de comparación múltiples presentan (Saville, 1990). En cualquier caso, nuevos ensayos son necesarios para validar los resultados aquí presentados.

Resta aún por evaluar la capacidad de PCV de las cepas *A. communis* SWub3 y *A. indigenes* VB32 *in vivo*, lo cual no pudo ser realizado en los tiempos estipulados del presente trabajo. También sería interesante evaluar la PCV en otros cultivos de interés tales como el arroz, en cual ya se ha reportado que las cepas BH72 (Hurek *et al.*, 1994) y DQS-4^T (Faoro *et al.*, 2017) son PCV y que la cepa *Azoarcus* sp. CIB actúa como endófito facultativo (Fernández *et al.*, 2014).

Conclusiones y Perspectivas

El presente trabajo constituye el primer estudio en cuanto a la caracterización *in vitro* de las propiedades PCV de los endófitos *A. communis* SWub3, *A. indigenes* VB32 y de la cepa recientemente aislada *Azoarcus* sp.TTM91.

Los resultados obtenidos determinaron la presencia del gen *nifH* para las tres cepas evaluadas, por lo cual se las puede clasificar como potenciales diazotrofos. Para su confirmación se plantea a futuro la realización del ensayo de reducción de acetileno, ARA (*acetylene reduction assay*) con la finalidad de determinar la actividad de la enzima nitrogenasa.

Ninguna de las cepas fue capaz de solubilizar K o P-inorgánico *in vitro* en los ensayos empleados, como sí se ha reportado en otras cepas tales como la *Azoarcus* sp. CIB para el caso de P (Fernández *et al.*, 2014).

Todas las cepas fueron capaces de producir sideróforos *in vitro*, por lo que se postula que podría jugar un rol en la competencia por el establecimiento en la rizósfera, en el aporte de hierro a la planta, o como factor de biocontrol sobre fitopatógenos. De corroborarse la PCV en ensayos de invernáculo para alguna de las cepas, podría verificarse si dicha promoción se ve afectada para cepas mutantes en la producción de sideróforos; lo cual confirmaría la importancia de dichas moléculas en el proceso de infección y colonización del hospedero.

Con respecto a los posibles mecanismos de infección, los resultados sugieren posiblemente que el ingreso a la planta sea por otro tipo de actividad no ensayada o bien una entrada pasiva (por grietas naturales del crecimiento y elongación de las raíces). En particular, a juzgar por lo reportado para las cepas BH72 y DQS-4^T (Reinhold hurek 2006, Faoro *et al.*, 2017) sería interesante evaluar la presencia y rol del gen *egIA* en dicho proceso. En cuanto al ingreso pasivo, podría evaluarse mediante técnicas microscópicas si la colonización endofítica ocurre en los puntos de emergencia de las raíces laterales o en zonas de elongación y diferenciación celular tal como se ha visto con la cepa BH72 (Hurek *et al.*, 1994).

En suma, el presente trabajo constituye una primera aproximación a las propiedades PCV de las cepas evaluadas. Como perspectivas queda aún evaluar los mecanismos de PCV e infección para las cepas evaluadas, tales como la actividad nitrogenasa, o en el caso de *A. communis* SWub3 y *A. indigenes* VB32 la producción de AIA, así como la actividad hemicelulasa y formación de biopelículas. También restan por realizar ensayos de PCV para las cepas *Azoarcus communis* SWub3 y *Azoarcus indigenes* VB32 para los cultivos evaluados en este trabajo o bien otros posibles cultivos tales como arroz o maíz. Asimismo, el análisis del genoma de *Azoarcus communis* SWub3 ahora disponible (Zorraquino *et al.*, 2018) podrá servir de insumo para analizar los resultados obtenidos, tales como la presencia o no de enzimas involucradas en los procesos de colonización e infección, o de aquellas involucradas en los mecanismos de PCV.

El uso de endófitos bacterianos PCV constituye una alternativa prometedora de cara a un manejo sustentable de los suelos agrícolas. Así, este y futuros trabajos constituyen un precedente para evaluar la potencialidad de dichas cepas de ser utilizadas en sistemas de producción agrícola, constituyendo asimismo un aporte al estudio de las interacciones planta-endófitos.

6. ANEXO:

Soluciones y Medios de cultivo

6.1. Medios de cultivo para bacterias:

| Medio TSA y TSB | |
|---|--------------|
| TSB – Tryptic Soy Broth (Difco) | 15 g |
| Agua desionizada | c.s.p. 1,0 L |
| Observación: El medio TSA contiene agar 15 g/L. | |

| Medio DYGs (para AIA) | |
|---|-----------------------------------|
| Glucosa | 1,0 g |
| Ácido málico | 1,0 g |
| Bacto peptona | 0,75 g |
| Extracto de levadura | 1,0 g |
| K₂HPO₄ | 0,25 g (2,5 mL de sol. 10% (p/v)) |
| MgSO₄.7H₂O | 0,25 g (2,5 mL de sol. 10% (p/v)) |
| Glutamato | 0,75 g |
| H₂O | c.s.p. 500 mL |
| Se ajusta pH a 6.4 con NaOH | |

| Medio CAS | |
|--|--------------|
| Medio Base | |
| Solución salina* | 25 mL |
| PIPES | 7,56 g |
| Extracto de levadura desferrado | 0,25 g |
| MgCl 1M | 0,25 mL |
| CaCl 0,1 M | 0,25 mL |
| Manitol | 0,25g |
| Agar | 3,75 g |
| Agua desionizada | 187 mL |
| Observación: Se ajusta el pH a 6,8 con NaOH | |
| *Solución salina | |
| KH₂PO₄ | 0,075 g |
| NaCl | 0,125 g |
| NH₄Cl | 0,25 g |
| Agua desionizada | c.s.p. 25 mL |
| Solución colorante | |
| CAS | 15,12 mg |
| Agua desionizada | 14,75 mL |
| Procedimiento: La solución colorante se mezcla con 0,25 mL de FeCl ₃ .6H ₂ O | |

(135 mg/ 50mL, en HCl 0,01 N) y bajo agitación se adiciona gota a gota sobre una solución de HDTMA en (de 18,22 mg en 10 mL de agua desionizada).

Procedimiento:

En condiciones de esterilidad se agregan al medio base 1,5 mL de EtOH puro filtrado y luego la mezcla del colorante con HDTMA y se preparan las placas.

Medio GL suplementado con fosfato inorgánico

Medio GL

| | |
|--|--------------|
| Glucosa | 2,0 g |
| Extracto de levadura | 0,4 g |
| Agar | 3,0 g |
| Agua desionizada | c.s.p 200 mL |
| Procedimiento: A los 200 mL de medio GL previamente autoclavado, se agregan a 50°C 10 mL de solución estéril de K ₂ PO ₄ 10% y 20 mL de solución estéril de CaCl ₂ %. | |

Medio Aleksandrov

| | |
|--|---------------|
| Sacarosa | 2,0 g |
| K₂HPO₄ | 0,3 g |
| MgSO₄. 7H₂O | 0,1 g |
| CaCO₃ | 0,2 g |
| Agar | 3,0 g |
| Agua desionizada | c.s.p. 200 mL |
| Ajustar a pH = 7,5 | |

Medio VM-EtOH

| | |
|-----------------------------|------------|
| Doberainer Base* | 10 mL |
| Fe₃EDTA | 10 mL |
| Bacto Peptona | 3 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| NaCl | 1 g |
| NH₄Cl | 0.5 g |
| Agar | 15 g |
| Agua desionizada | c.s.p. 1 L |

Observación: Luego de autoclavar se agregan en campana de flujo laminar 4mL de solución KPO₄ y 6mL de EtOH 95% previamente filtrado.

***Doberainer Base**

| | |
|--|--------------|
| MgSO₄. 7H₂O | 1 g |
| NaCl | 0,5 g |
| Na₂MoO₄.2H₂O | 0,01 g |
| MnSO₄ | 0,05 g |
| CaCl₂ | 0,1 g |
| Agua desionizada | c.s.p. 50 mL |

| Medio para Celulasas (Kim et al., 2008) | |
|---|--------------|
| Carboximetil Celulosa (CMC) | 0,4 g |
| Agar | 3,0 g |
| VMEtOH | c.s.p. 200mL |

| Medio para Peroxidasas (Hofrichter et al., 1997). | |
|---|--------------|
| ABTS | 50 mg |
| Agar | 3,0 g |
| VMEtOH | c.s.p. 200mL |

| Medio para Proteasas | |
|---------------------------|--------------|
| Leche descremada en polvo | 10 g |
| TSA 1/100 (0,15g/L) | c.s.p. 200ml |

6.2. Medios de cultivo para plantas:

| Medio Jensen | |
|--|------------|
| CaHPO ₄ | 1,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 0,2 g |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0,17 g |
| Solución de micronutrientes* | 1,0 ml |
| Agua desionizada | c.s.p. 1 L |
| Ajustar pH a 6,8- 7,0 | |
| *Solución de micronutrientes (cantidad por litro) | |
| H ₃ BO ₃ | 2,86 g |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 2,03 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,22 g |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,08 g |
| MoO ₃ .H ₂ O | 0,09 g |

6.3. Soluciones y Reactivos:

| Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 1 X | |
|------------------------------------|---------|
| Tris-Acetato | 0.04 M |
| EDTA (pH = 8) | 0.001 M |

| Reactivo de Salkowsy | |
|---|--------|
| FeCl ₃ .6H ₂ O 0,5 M | 1,0 ml |
| HClO ₄ 35 % (p/v) | 50 ml |
| Observaciones: El ácido perclórico se agrega sobre el cloruro férrico. Se prepara en cámara de gases con las debidas precauciones de seguridad. | |

7. BIBLIOGRAFÍA:

Ambrosini, A., de Souza, R., & Passaglia, L.M.P. (2016). Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. *Plant Soil*, 400(1-2), 193-207.

<https://doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7>

Avakyan, Z.A., Pivovarova, T.A., & Karavaiko, G.I. (1986). Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya*, 55, 477-482.

Baldani, V.L.D, Baldani, J.I., & Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice with the endohytic diazotrophs *Herbaspirillum serpedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 485-491.

Bhattacharjee, R.B, Singh, A., & Mukhopadhyay, S.N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 199-209.

<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1567-2>

Chen, M.H., Sheu, S.Y., James, E.K., Young, C.C., & Chen, W.M. (2013). *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of systematic bacteriology*, 63, 3755–3761.

De los Santos, M.C., Taulé, C., Mareque, C., Beracochea, M., & Battistoni, F. (2016). Identification and characterization of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Annals of Microbiology*, 63(1),329-342. Doi: 10.1007/s13213-015-1113-2

Di Rienzo, J.A., Casampves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C.W. (2017). *InfoStat, versión 2017*. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Dixon, R., & c Hartmann, A. (2017). Novel insights into ecological distribution and plant growth promotion by nitrogen-fixing endophytes – how specialized are they?. *Environmental Microbiology Reports*,9(3), 179-181. doi:10.1111/1758-2229.12529

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. & Vanderleyden J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212: 155-164.

Fabiano E., O'Brian M.R. (2012) Mechanisms and Regulation of Iron Homeostasis in the *Rhizobia*. In: Expert D., O'Brian M. (eds.) *Molecular Aspects*

of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Dordrecht.

Faoro, H., Menegazzo, R.R., Battistoni, F., Gyaneshwar, P., do Amaral, F.P., Taulé, C.,... James, E.K. (2017). The oil-contaminated soil diazotroph *Azoarcus olearius* DQS-4^T is genetically and phenotypically similar to the model grass endophyte *Azoarcus* sp. BH72. *Environmental Microbiology Reports*, 9(3), 223-238.

Fernández, H., Prandoni, N., Fernández-Pascual, M., Fajardo, S., Morcillo, C., Díaz, E., & Carmona, M. (2014). *Azoarcus* sp. CIB, an Anaerobic Biodegrader of Aromatic Compounds Shows an Endophytic Lifestyle. *PLoS ONE*, 9(10), e110771. doi:10.1371/journal.pone.0110771

Fernández Llamosas, H. (2018). Adaptación de *Azoarcus* sp. CIB a diferentes condiciones ambientales (tesis doctoral). Universidad autónoma de Madrid, Madrid, España.

Ferrari Fructos, E.A. (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). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S., & Dunfield, K.R. (2013). INSIDE THE ROOT MICROBIOME: BACTERIAL ROOT ENDOPHYTES AND PLANT GROWTH PROMOTION. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750.

Glick, B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 15 pages. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

Gordon, S.A., & Weber, P.R. (1951). COLORIMETRIC ESTIMATION OF INDOLACETIC ACID. *Plant physiology*, 26(1), 192-195.

Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A.,... Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.

Hayter, A. (1984). A proof of the conjecture that the Tukey-Kramer Multiple comparisons procedure is conservative. *The annals of statistics*, 12(1), 61-75.

Hofrichter, M., Bublitz, F., & Fritsche, W. (1997). Fungal attack on coal II. Solubilization of low-rank coal by filamentous fungi. *Fuel Processing Technology*, 52, 55-64.

Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Montagu, M.V., & Kellenberger, E. (1994). Root Colonization and Systematic Spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in Grasses. *Journal of Bacteriology*, 176(7), 1913-1923.

Hurek, T., Handley, L.L, Reinhold-Hurek, B., & Piché Y. (2002). *Azoarcus* Grass Endophytes Contribute Fixed Nitrogen to the Plant in an Unculturable State. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), 233-242.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.233>

Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, 106, 169-178.

Kim, S.J., Lee, C.M., Han, B.R., Kim, M.Y., Yeo, Y.S, Yoon, S.H.,...Jun, H.K. (2008). Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 282(1), 44-51.

Krause, A., Ramakumar, A., Bartels, D., Battistoni, F., Bekel, T., Boch, J.,...Goesmann, A. (2007). Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Nature Biotechnology*, 24: 1384-1390.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E., & Goodfellow, M., (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.

Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Gacía-Flores, L., Escarnilla, J.E. & Kennedy, K. (2004). Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of bacteriology*, 186(16), 5384-5391.

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.

Martínez-Rosales, C., & Castro-Sowinsky, S. (2011). Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Research*, 30(1), 1–8.
<https://doi.org/10.3402/polar.v30i0.7123>

Meena, V.S., Bahadur, I., Maurya, B.R., Kumar, A., Meena, R.K., Meenam S.K., & Verma, J.P. (2016). Potassium-solubilizing microorganism in evergreen agriculture: an overview. In: V.S. Meena *et al.* (eds.), *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 1-20). Varanasi, India: Springer.

Mercado-Blanco, J., & Lugtenberg, B.J.J. (2014). Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Current Biotechnology*, 3(1): 60-75.
DOI: 10.2174/22115501113026660038

Ollivier, J., Töwe, S., Bannert, A., Hai, B., Kastl, E.M., Meyer, A.,...Schloter, M. (2011). Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(1), 3–16.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01165.x>

Oteino, N., Lally, R.D., Kimanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, KJ., & Dowling, D.N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(745). doi: 10.3389/fmicb.2015.00745

Poly, F., Monrozier, L. J., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95-103

Radzki, W., Mañero, F.J.G., Algar, E., García, J.A.L., García-Villaraco, A., & Solano, B.R. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 321-330. DOI 10.1007/s10482-013-9954-9

Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., & Gutiérrez Mañero, F.J. (2008). Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: I. Ahmad, J. Pichtel, S. Hayat (eds.), *Plant-bacteria interaction: concepts and technologies for promoting plant growth* (pp. 46-50). New York, USA: Wiley VCH.

Reinhold, B., Hurek, T., Niemann, E., & Fendrik, I. (1986). Close Association of *Azospirillum* and Diazotrophic Rods with Different Root Zones of Kallar Grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3), 520-526.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., & De Ley, J. (1993). *Azoarcus* gen. Nov., Nitrogen-Fixing Proteobacteria Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and Description of Two Species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3), 574-584. doi: 10.1099/00207713-43-3-574

Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435-443.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>

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 interactions*, 19(2), 181-188.

Rodrigues Neto, J., MALAVOLTA, J.R., VICTOR, O. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12:16.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.

Rosconi, F., Dayvt, D., Martínez, V., Martínez, M., Abin-carrquiry, J.A., Zane, H.,...Fabiano, E. (2012). Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environmental Microbiology*, 15(3), 916-927.

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., & Bestervelt, L.L. (2012). Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1-15. DOI 10.1002/jobm.201100552

Santos, A.F.D., Martins, C.Y.S., Santos, P.O., Corrêa, E.B., Barbosa, H.R., Sandoval, A.P.S.,...Soares, A.C.F. (2014). *Plant Soil*, 385:37-48. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2202-x>

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008

Sarwar, M., Kremer, R.J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, 20(5), 282-285. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x>

Saville, D.J. (1990). Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution. *The American Statistician*, 44(2), 173-180.

Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Souza, R.D., Ambrosini, A., & Passaglia L.M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x

Sylvester-Bradley, R., Asakawa, N., Torraca, S.L., Magalhaes, F.M.M., Oliveira, L.A., & Pereira, R.M. (1982). Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, 12(1), 15-22.

Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V. M., Sicardi, M., & Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil*, 356(1–2), 35–49.

Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., & Netrusov, A.I. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.
DOI: 10.1134/S0003683806020013

Vincent, J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacterial. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. Blackwell Scientific.

Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, D.W., Schlesinger, W.H., & Tilman, D.G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7(3), 737-750. DOI: 10.2307/2269431

Voget, S., Steele, S.H., & Streit, W.R. (2006). Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal of Biotechnology*, 126(1), 26-36. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.02.011

Wagner, S.C. (2011). Biological nitrogen fixation. *Nature education Knowledge*, 3(8), 15. *Recuperado de*
<http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419>

Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., & Guo, S. (2013). The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 7370-7390. doi:10.3390/ijms14047370

White, P.J., & Hammond, J.P. (2008). Phosphorus nutrition of terrestrial plants. In White, P.J., Hammond, J.P. (eds.), *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. *Plant Ecophysiology*, 7, 51-81. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5_4

Zhang, C., & Kong, F. (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, 82, 18-25.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.002>

Zorraquino, V., Toubiana, D., Yan, D., & Blumwald, E. (2018). Draft Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing Endophyte *Azoarcus communis* SWub3. *Microbiology Resource Announcements*, 7(13), e01080-18.
<https://doi.org/10.1128/MRA.01080-18>