



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA



FACULTAD DE QUÍMICA

PEDECIBA QUÍMICA

Tesis presentada para obtener el título de Doctor en Química

**Factores que afectan la composición y
diversidad de la comunidad de bacterias
endófitas en arroz (*Oryza sativa*)**

Lucía Ferrando Magnabosco

Tutora: Dra. Ana Fernández Scavino

Tribunal: Dra. Silvia Batista

Dra. Fátima Moreira

Dra. Margarita Sicardi

Montevideo, 17 de abril de 2013.

Agradecimientos

Apoyo Financiero

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar esta tesis con una beca de doctorado (POS_NAC_2009_2701) y un proyecto FCE modalidad III- tesistas (PR_FCE_2009_2701) que me permitió solventar los gastos de gran parte del trabajo realizado. Asimismo, agradezco a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la UdelaR y a la Comisión Académica de Posgrado por otorgarme una beca de Finalización de Posgrado que me permitió completar el trabajo y la escritura de esta tesis durante el último año y por financiar la asistencia a congresos para presentar mis resultados.

Apoyo Académico

Agradezco a los miembros del Tribunal por la gentileza y buena disposición de leer esta tesis.

Gracias a Matilde, Catedrática de Microbiología, por su apoyo que ha sido muy importante para que lograra realizar mi doctorado.

Gracias a mi tutora Ana, por tu apoyo incondicional y tu dedicación. Gracias por tu generosidad, por brindarme todas las oportunidades que han estado a tu alcance y por permitirme crecer académica y personalmente.

Apoyo técnico y mas...

Agradezco a todos los que colaboraron directamente con este trabajo. Gracias a Jimena Fernández que participó en los inicios de la línea de trabajo en bacterias endófitas, realizando muchas de las actividades incluidas en el artículo publicado.

Gracias a Gastón Rariz por su apoyo en el trabajo con plantitas y suelos y en los ensayos en fitotrón. Gracias por tu ayuda con el riego y mantenimiento de las plantitas. También a Adalgisa Martínez que participó en el último ensayo realizado.

Gracias a Andrea Martínez, que colaboró en el último tramo de este trabajo, realizando el trabajo de cuantificación de genes *nifH* en suelos y plantitas de arroz.

Agradezco a INIA Las Brujas en particular a Victoria Bonnacarrere que generosamente me introdujo en el cultivo de arroz en condiciones hidropónicas que fue el comienzo del trabajo con plantitas de arroz en ensayos de laboratorio. A INIA Treinta y Tres por el apoyo que siempre nos han brindado desde que empezamos a trabajar con el cultivo de arroz. A INIA Tacuarembó por la colaboración con el muestreo de suelos del norte y noroeste del país.

Gracias a Luciana Di Salvo por el apoyo y ayuda con el análisis estadístico.

Gracias a María Inés Siri por su ayuda en el comienzo del trabajo con plantas en fitotrón.

Gracias a Mariana Barraco por la paciencia y la dedicación al enseñarme a trabajar con ARN una y otra vez, y a Analía Sanabria por su generosidad a la hora de enfrentarse a mis dudas sobre Real Time PCR, por su buena onda y disposición.

Apoyo emocional

Gracias en general a toda la Cátedra de Microbiología por el apoyo y por permitirme completar mi formación académica.

En particular quiero agradecer a los compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, los que están actualmente y los que han estado en estos años: Ana F, Silvana T, Menes, Clau E, Inés B, Laura, Ada, Gastón, Andrea, Nacha, Ange Cabezas y Jorge. Todos ellos han colaborado en que yo terminara esta etapa, directamente en mi trabajo o generando un buen clima en el laboratorio sin el cual no hubiera podido llevar a cabo esta tesis.

En particular a Inés Bellini, mi compañera de doctorado!!! Mi apoyo en el lab y mi amiga. Gracias por estar, por tu apoyo técnico y emocional, hasta vía chat de gmail cuando estabas lejos ☺.

Gracias a mi familia y mis amigas que siempre alientan, se alegran y fomentan que una progrese, y que están para apoyar también en los malos momentos. En particular a María, mi hermana de la vida, y su familia que tanto me han apoyado y ayudado a desenchufarme y desestresarme con risas, juegos y demás.

A Pablo, gracias por el curso acelerado de Word con estilos. Gracias por la paciencia y el apoyo incondicional, por acompañarme y alentarme, y por hacerme ver la real dimensión de las cosas.

Lucía

Tabla de contenido

TABLA DE CONTENIDO	I
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
CAPÍTULO I	9
MOLECULAR AND CULTURE-DEPENDENT ANALYSES REVEALED SIMILARITIES IN THE ENDOPHYTIC BACTERIAL COMMUNITY COMPOSITION OF LEAVES FROM THREE RICE (ORYZA SATIVA) VARIETIES	9
ABSTRACT	11
INTRODUCTION	12
MATERIALS AND METHODS	13
<i>Field site and sampling</i>	13
<i>Surface disinfection of rice leaves</i>	14
<i>Enumeration and isolation of endophytic bacteria</i>	14
<i>Statistical Analysis</i>	14
<i>DNA extraction and 16S rRNA gene amplification</i>	15
<i>Screening of endophytic diversity by 16S rRNA gene T-RFLP</i>	15
<i>Cloning and phylogenetic analysis</i>	16
RESULTS	17
<i>Abundance and distribution of culturable endophytic bacteria in the three rice varieties</i>	17
<i>Molecular fingerprinting of the endophytic bacterial community in the three rice varieties</i>	20
<i>Phylogenetic analysis of the endophytic bacterial community</i>	21
<i>Phylogenetic assignment of the T-RFs (Terminal Restriction Fragments)</i>	26
DISCUSSION	29
ACKNOWLEDGEMENTS	31
CAPÍTULO II	32
SIGNIFICANT CHANGES ON DIAZOTROPHIC ENDOPHYTIC BACTERIAL COMMUNITIES INHABITING RICE (ORYZA SATIVA) PLANTS OCCURRED AFTER FLOODING	32
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	34
MATERIALS AND METHODS	36
<i>Greenhouse Experiment and Sampling</i>	36
<i>Surface disinfection of rice plants</i>	36
<i>DNA extraction and nifH gene amplification</i>	37
<i>Optimization of q-PCR for nifH gene and standard preparation</i>	37
<i>Abundance of nifH genes in roots and leaves of rice by q-PCR</i>	38

<i>T-RFLP of nifH genes</i>	38
<i>Cloning and phylogenetic analysis of nifH genes</i>	39
RESULTS	41
<i>Abundance of nifH gene copies in leaves and roots of rice</i>	41
<i>Diversity of diazotrophic endophytic bacteria from rice roots</i>	41
<i>Phylogenetic analysis of nifH genes</i>	47
DISCUSSION	53
ACKNOWLEDGEMENTS	56
CAPÍTULO III	57
EFFECTO DEL TIPO DE SUELO Y DE SU USO PREVIO SOBRE LA ABUNDANCIA DE DIAZÓTROFAS ENDÓFITAS ESTABLECIDAS EN HOJAS Y RAÍCES DE ARROZ	57
RESUMEN	59
INTRODUCCIÓN	60
MATERIALES Y MÉTODOS	63
<i>Muestreo y procesamiento de suelos</i>	63
<i>Análisis fisicoquímico de los suelos</i>	64
<i>Ensayo de crecimiento de plantas en condiciones controladas</i>	64
<i>Extracción y cuantificación de ADN</i>	65
<i>Abundancia de genes nifH en suelos, y en semillas, raíces y hojas de plantas de arroz</i> ..	66
<i>Análisis estadístico</i>	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
<i>Propiedades de los suelos</i>	67
<i>Producción de material vegetal de plántulas</i>	67
<i>Abundancia de genes nifH en suelos, semillas, raíces y hojas de arroz</i>	72
<i>Comparación de tratamientos en los parámetros evaluados en las plantas</i>	76
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	78
CAPÍTULO IV	80
BÚSQUEDA Y DETECCIÓN DE METANÓTROFAS ENDÓFITAS CON CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE ARROZ	80
RESUMEN	82
INTRODUCCIÓN	83
MATERIALES Y MÉTODOS	85
<i>Condiciones de crecimiento de plantas de arroz</i>	85
<i>Detección molecular de los genes nifH y pmoA</i>	87
<i>Cuantificación de pmoA en tejidos vegetales</i>	87
<i>Enriquecimientos de bacterias metanótrofas</i>	90
<i>Mantenimiento de enriquecimientos activos y aislamiento de bacterias metanótrofas endófitas</i>	90
<i>Caracterización molecular de los enriquecimientos</i>	91

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
<i>Detección y Abundancia de genes pmoA en semillas, raíces y hojas de arroz.....</i>	93
<i>Detección genes nifH en semillas, raíces y hojas de arroz.....</i>	94
<i>Enriquecimientos de bacterias metanótrofas</i>	94
<i>Aislamiento de metanótrofas endófitas</i>	97
<i>Caracterización molecular de los enriquecimientos</i>	97
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	100
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	102
ANEXO I	107
¿QUÉ INTEGRANTES DE LA COMUNIDAD DE DIAZÓTROFOS ENDÓFITOS ARROZ SE ENCUENTRAN ACTIVOS DENTRO DE LA PLANTA EN DIFERENTES CONDICIONES DE MANEJO DE AGUA? ESTUDIOS PRELIMINARES	107
OBJETIVOS	108
MATERIALES Y MÉTODOS	108
<i>Ensayo en fitotrón utilizando suelo.....</i>	108
<i>Muestreo, desinfección y procesamiento de plantas</i>	108
<i>Actividad fijadora de nitrógeno in planta</i>	109
<i>Extracción y cuantificación de ARN</i>	109
<i>Tratamiento con DNAasa y síntesis de cDNA.....</i>	110
<i>Cuantificación de la expresión de genes nifH</i>	110
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
<i>Actividad diazótropa in planta.....</i>	111
<i>Extracción y Detección de la expresión de genes nifH</i>	112
<i>Perspectivas</i>	113
ANEXO II: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA, GRÁFICOS Y FIGURAS ADICIONALES... 115	
CAPÍTULO II	116
<i>Optimización de la cuantificación de genes nifH por q-PCR.....</i>	116
CAPÍTULO IV.....	119
ANEXO III: MEDIOS DE CULTIVO	122
REFERENCIAS	126

Lista de figuras

Figure 1.1 UPGMA dendrogram showing clustering analysis and similarity percentage among T-RFLP profiles corresponding to the three treatments studied..	21
Figure 1.2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on <i>nifH</i> gene sequences corresponding to clones (empty triangles) and isolates (filled triangles) retrieved from endophytic communities inhabiting rice leaves.	23
Figure 2.1 Abundance of <i>nifH</i> sequences in leaves and roots of rice...	41
Figure 2.2 Composed and accumulative profiles of <i>nifH</i> T-RFLP from rice roots before (BFR) and after (AFR) flooding....	44
Figure 2.3 Clustering Analysis for <i>nifH</i> T-RFLP profiles including the two data sets (<i>AluI</i> and <i>HaeIII</i> restriction data).....	45
Figure 2.4 Principal Component Analysis of <i>nifH</i> T-RFLP profiles.....	45
Figure 2.5 Biplot graphic where relevant T-RFs involved in samples differentiation are indicated...46	
Figure 2.6 Diazotrophic composition of rice roots according to <i>nifH</i> gene sequences.....	48
Figure 2.7 Neighbor-joining phylogenetic tree of partial <i>nifH</i> sequences retrieved from rice roots before and after flooding.....	49
Figura 3.1 Distribución de la producción arrocería en Uruguay.....	60
Figura 3.2 Fotografías del ensayo en fitotrón.....	65
Figura 3.3 Resultados del ensayo de crecimiento de plantas de arroz en condiciones controladas (fitotrón) utilizando suelos de diferentes zonas del país.....	68
Figura 3.4. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los 8 suelos analizados según las diferentes características fisicoquímicas que presentan... ..	70
Figura 3.5 Parámetros de rendimiento de las plántulas. Resultados correspondientes a Longitud, Peso Fresco y Peso Seco de parte aérea y raíz de plantas de arroz de 25 días después de la siembra... ..	71
Figura 3.6 Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros determinados para las raíces y hojas de arroz... ..	76
Figura 3.7 Gráfico Biplot: Análisis de Componentes Principales e importancia de las variables en la distribución observada de los tratamientos.....	77
Figura 4.1 Porcentaje relativo de los diferentes T-RFs obtenidos por T-RFLP del gen <i>pmoA</i> con <i>MspI</i>	98
Figura AI-1 Controles realizados en la evaluación de la expresión de genes <i>nifH</i> por q-PCR...	111

Figura AII-1 Ejemplo de Curva de melting obtenida para los puntos de la curva de calibración (T_m de 87 a 93°C), los controles negativos, y las muestras analizadas.....	116
Figura AII-2 Ejemplo de curva estándar (CT vs concentración) obtenida para la cuantificación de los genes <i>nifH</i> por q-PCR.....	117
Figura AII-3 Ejemplo de curvas de cuantificación del gen <i>nifH</i> obtenidas mediante q-PCR para los puntos de la curva de calibración, los controles negativos y las muestras analizadas correspondientes a diluciones 0 y -1 de raíces y hojas del ensayo en invernáculo (escala lineal).....	117
Figure AII-4 Rarefaction curves of observed operational taxonomic units (OTU) based on <i>nifH</i> sequences retrieved from rice roots from the two water regimes.....	118
Figura AII-5 Ejemplo de curva de calibración (CT vs concentración) obtenida para la cuantificación los genes <i>pmoA</i> por q-PCR.....	119
Figura AII-6 Curva de melting obtenida para los puntos de la curva de calibración ($T_m=88,5^\circ\text{C}$) y los controles negativos (formación de dímeros aprox. $T_m= 76^\circ\text{C}$).....	119
Figura AII-7 Curva de melting obtenida para los puntos de la curva de calibración, ($T_m=88,5^\circ\text{C}$), los controles negativos (formación de dímeros aprox. $T_m= 76^\circ\text{C}$), y las muestras analizadas correspondientes a diluciones 0 y -1 de raíces y hojas del ensayo en invernáculo.....	120
Figura AII-8 Curvas de cuantificación del gen <i>pmoA</i> obtenidas mediante q-PCR para los puntos de la curva de calibración y los controles negativos (escala logarítmica).....	120
Figura AII-9 Curvas de cuantificación del gen <i>pmoA</i> obtenidas mediante q-PCR para los puntos de la curva de calibración, los controles negativos y las muestras analizadas correspondientes a diluciones 0 y -1 de raíces y hojas del ensayo en invernáculo (escala logarítmica).....	121

Resumen

Las bacterias endófitas son bacterias que viven dentro de los tejidos vegetales sin causar daño al organismo hospedero. Se ha postulado que estas bacterias pueden aumentar la productividad de los cultivos por distintos mecanismos relacionados al aporte de nutrientes, producción de hormonas, y protección contra stress biótico y abiótico.

En esta tesis se llevó a cabo el estudio de las comunidades de bacterias endófitas presentes en los distintos tejidos vegetales de arroz utilizando principalmente herramientas moleculares independientes del cultivo de microorganismos en el laboratorio. Se seleccionó este cultivo porque es de gran importancia económica y social para nuestro país y porque la planta y el suelo experimentan un cambio drástico durante el ciclo, como es la inundación. Se estudiaron la comunidad total y dos grupos fisiológicos particulares con relevancia biotecnológica y ambiental (bacterias diazótrofes y metanótrofes) así como distintos factores que pueden afectarlas (variedad de arroz utilizada, inundación del cultivo, tipo de suelo y su historia agrícola).

Los resultados obtenidos revelaron que en las hojas de las tres variedades de arroz más sembradas en Uruguay la estructura de la comunidad de bacterias endófitas es muy similar. Mientras *Brevundimonas* fue el género dominante en el análisis molecular (clonado del gen 16S rRNA) *Pantoea ananatis* y *Pseudomonas syringae* fueron las especies más frecuentemente aisladas en las tres variedades de arroz y en las dos zafras analizadas.

Se observó que la inundación como práctica habitual de manejo del cultivo de arroz tiene efectos muy importantes sobre la abundancia, diversidad y composición de las comunidades de bacterias diazótrofes endófitas de raíz. La abundancia de genes *nifH*, codificante para la dinitrogenasa reductasa, y su diversidad aumentan sustancialmente después de la inundación. Mientras que antes de inundar prevaleció la clase *Gamaproteobacteria* (66% de genoteca del gen *nifH*, dominando *Stenotrophomonas* con el 49% de las secuencias de *nifH* recuperadas), luego de la inundación se observó una gran diversidad de secuencias de genes *nifH* de bacterias anaerobias estrictas y facultativas (*Spirochaetes*, *Chlorobi*, *Deltaproteobacteria* y diversos *Firmicutes*). Estos resultados sugieren que los diazótrofos anaerobios podrían tener un rol importante en la fijación de nitrógeno en este ecosistema una vez que el cultivo de arroz es inundado.

Asimismo, los diazótrofos endófitos de hoja se encuentran en una proporción casi 100 veces menor que en raíz y suelo de acuerdo a la cuantificación de genes *nifH* realizada por q-PCR. Las raíces de plantas de arroz sembradas en suelos de alta fertilidad con historia previa de cultivo de arroz presentaron una abundancia significativamente mayor que las raíces de las plantas sembradas en otros suelos, incluso mayor que aquellas sembradas en suelos similares que no habían sido utilizados previamente para el cultivo de arroz. La abundancia de las poblaciones diazótrofes endófitas de hoja parece ser independiente de las propiedades de los suelos en los que las plantas se cultivan. Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas en el número de copias del gen *nifH* en los distintos suelos, a pesar de sus características fisicoquímicas e historia de uso del suelo diferentes.

Por otra parte, las bacterias metanótrofas, de gran importancia porque contribuyen a mitigar las emisiones de metano producidas en el ecosistema arrocerero, fueron detectadas en bajo número tanto en hojas como en raíces de plantas de arroz crecidas en suelo. Para ambos tejidos se obtuvieron cultivos altamente enriquecidos en metanótrofas capaces de crecer en ausencia de nitrógeno agregado indicando que se trata de metanótrofas diazótrofes. Esta propiedad podría ser importante en la interacción de este grupo fisiológico con la planta. La caracterización molecular de estos enriquecimientos confirmó que *Methylosinus trichosporium*, una cepa metanótrofa C9 (aislada previamente de rizósfera de arroz en Uruguay) y *Methylocystis hirsuta*, se encuentran presentes en los tejidos internos de las hojas de arroz.

El estudio realizado permitió generar nuevos conocimientos sobre las comunidades de bacterias endófitas nativas de arroz y profundizar en los factores que las afectan aportando información relevante sobre la interacción bacteria- planta. Asimismo, los conocimientos generados podrían ser útiles en la búsqueda de nuevas cepas con potencial biotecnológico y en la racionalización del uso potencial de inoculantes en el cultivo de arroz.

Introducción General

Cultivo de arroz en Uruguay: producción sustentable con altos rendimientos

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los principales cereales que contribuyen a la alimentación de la población mundial. Aunque muchos países cultivan esta gramínea, Uruguay ha estado entre el 5° y el 6° lugar entre los exportadores de arroz en los últimos años. Si bien la contribución del arroz uruguayo al total del arroz exportado es relativamente baja, la significancia económica en la agricultura nacional es enorme porque más del 90% del arroz cultivado se exporta (www.aca.com.uy). Uruguay apuesta a mercados que valoran su producto por características especiales como el tamaño y consistencia del grano y por su calidad. Las condiciones de producción también tienen gran importancia para mantener y colocar el producto en nuevos mercados. El manejo del cultivo, único en el mundo, que alterna ciclos de arroz (generalmente de hasta dos años consecutivos) con gramíneas y leguminosas forrajeras (hasta cuatro años) brinda al productor cierto equilibrio en sus ingresos ante las oscilaciones del precio del arroz y del ganado. Se cree que este sistema particular de rotación contribuye a mantener los nutrientes del suelo y podría explicar parcialmente la alta productividad que se alcanza con una muy baja cantidad de agroquímicos utilizados.

Las tendencias actuales de la agricultura exigen un sistema de producción sustentable que minimice el uso de agroquímicos. Estos compuestos químicos aumentan el costo de producción, aumentan la dependencia de las importaciones a partir de los países productores, contribuyen a la contaminación ambiental por los residuos que liberan y disminuyen la calidad del producto si estos residuos quedan en el grano. Entre las estrategias más promisorias para sustituir total o parcialmente los agroquímicos y aproximarse a una agricultura sustentable se encuentra el uso de microorganismos (Tikhonovich & Provorov, 2011).

Bacterias endófitas como potenciales herramientas biotecnológicas

Los microorganismos endófitos (hongos y bacterias) pueden permanecer activos y crecer en los tejidos de la planta sin causar síntomas de daño en ella, la mayor parte de las veces colonizando los espacios intercelulares (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Se cree que en este espacio encuentran condiciones favorables para su desarrollo. Es un ambiente rico en compuestos carbonados suministrados por la planta, protegido de predadores y eventuales competidores o antagonistas, con condiciones ambientales (tales como temperatura y humedad) estables dentro del ciclo luz-oscuridad (Senthilkumar et al., 2011). El alto número que alcanzan las bacterias endófitas en los tejidos vegetales y la asociación con cierto grado de especificidad, en la cual hay proximidad física y dependencia de la fisiología de la planta indican que estos microorganismos pueden ser herramientas biotecnológicas de gran potencial para mejorar el desarrollo de cultivos de interés agronómico. Desde hace más de una década se ha postulado que las bacterias endófitas pueden aumentar la productividad de los cultivos por mecanismos tales como la producción de fitohormonas (Hallmann et al., 1997), el antagonismo de patógenos (Sturz et al., 1999) o la fijación de nitrógeno atmosférico (Stoltzfus et al., 1997; Punschke et al., 2001; Prakamhang et al., 2009; Prakamhang et al., 2010). Por otra parte y más recientemente, se han publicado varios trabajos que

sugieren que las bacterias endófitas pueden conferir a la planta propiedades importantes para su sobrevivencia en condiciones ambientales adversas tales como la resistencia a la deshidratación (Ryan et al. 2008) o a contaminantes en suelos altamente degradados (de-Bashan et al., 2011).

La posibilidad de incrementar la productividad mediante la inoculación de bacterias con alguna propiedad promotora del crecimiento (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) como las que se han mencionado anteriormente se ha explorado desde hace unos 30 años. Los trabajos realizados por la doctora Johanna Döbereiner en Brasil fueron pioneros en la inoculación de gramíneas con PGPB. El aislamiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, una bacteria endófitas de caña de azúcar que estaría involucrada en el suministro de gran parte del nitrógeno necesario para el cultivo, fue un hito en el desarrollo de inoculantes bacterianos para gramíneas (Baldani et al., 2002).

Ciclo del cultivo de arroz: etapas y efectos sobre la comunidad endófitas

Durante el ciclo de cultivo, el arroz está sometido a diferentes condiciones ambientales (condiciones de irrigación, fertilización y aplicación de diferentes agroquímicos) y atraviesa diferentes estadios fisiológicos relacionados al crecimiento. Estos estadios se pueden dividir en 3 etapas principales: una etapa vegetativa que involucra la germinación y crecimiento del material verde de la planta, una etapa reproductiva y una etapa de maduración del grano hasta el momento de la cosecha (Yoshida, 1981). Cada una de estas etapas conlleva cambios fisiológicos (distintos requerimientos nutricionales, diferentes metabolitos producidos, producción de hormonas, etc) que provocan que el microambiente en el que habita la comunidad de bacterias endófitas cambie, y por lo tanto su estructura también pueda verse afectada. El cultivo de arroz se inunda aproximadamente a los cuarenta días de sembrado y permanece inundado hasta completar el ciclo, unos días previos a la cosecha. La inundación provoca cambios fisicoquímicos a nivel del suelo, generando un gradiente de potencial redox que hace que la flora microbiana que habita ese ecosistema se modifique (Kögel-Knabner et al. 2010). Paolino y Fernández (2006), realizaron estudios sobre el efecto de la inundación sobre la comunidad fijadora de nitrógeno en suelo de arrozales uruguayos. Mediante análisis molecular del pool de genes *nifH* se encontró que esta comunidad sufría cambios importantes luego de la inundación, predominando al inicio del ciclo de cultivo secuencias correspondientes a cianobacterias como *Nostoc punctiforme*, luego de la inundación desplazadas por bacterias anaerobias como *Geobacter* y *Clostridium*.

Según sabemos, el único estudio reportado hasta la fecha sobre el impacto de la inundación sobre la flora endófitas de arroz en condiciones restringidas de diversidad es el realizado por Hardoim et al. (2012). En este estudio se evaluó el efecto de la inundación sobre la población endófitas presente en raíces y parte aérea de plantas de arroz crecidas en condiciones asépticas sobre suelos esterilizados mediante radiación gama. Estos autores demostraron que, a pesar de las condiciones de diversidad restringida del estudio, las comunidades endófitas presentes en tejidos vegetales provenientes de plantas inundadas son significativamente diferentes a las presentes en tejidos de plantas sin inundar. Resulta relevante estudiar la influencia de la inundación sobre las comunidades de bacterias endófitas presentes en tejidos internos de plantas de arroz crecidas en las condiciones habituales de cultivo, donde la microflora del suelo y del ambiente juegan un papel importante.

Varios estudios han señalado que la variedad o tipo de cultivar de la planta puede afectar a las comunidades bacterianas endófitas, detectándose por ejemplo, endófitas específicas de ciertas variedades o tejidos de papa (Sessitsch et al. 2002). Asimismo, se ha reportado que la variedad tiene un efecto importante en la diversidad de endófitas que colonizan plantas de morrón (Rasche et al., 2006) y que afecta también a grupos fisiológicos particulares como a las bacterias oxidadoras de amonio (Briones et al. 2002) y las bacterias diazótrofes endófitas activas (Knauth et al. 2005) en plantas de arroz. Las distintas variedades de arroz uruguayo presentan diferentes propiedades fisiológicas, como resistencia a bajas temperaturas o a la presencia de patógenos, que hacen que puedan enfrentar con éxito diferentes condiciones ambientales u obtener mayores rendimientos de cultivo (Blanco et al. 2003). Esto hace que resulte interesante explorar los efectos de estas diferencias fisiológicas en las comunidades endófitas establecidas en sus tejidos.

Comunidad endófitas nativa de tejidos vegetales: origen e importancia

El origen de las bacterias endófitas ha sido un tema controversial durante mucho tiempo. Actualmente, se conoce que la semilla es una fuente importante de bacterias endófitas, especialmente en las primeras etapas de crecimiento de la planta, ya que las bacterias presentes en las semillas están adaptadas a los tejidos vegetales y colonizan rápidamente los brotes de arroz, ambiente menos competitivo que la raíz donde existe estrecho contacto con la abundante comunidad bacteriana rizosférica. Este grupo selecto de bacterias endófitas hospedadas por las semillas pueden volverse importantes en ciertas condiciones ambientales que estimulen su desarrollo (Hardoim et al. 2012). Asimismo, otros estudios han detectado especies bacterianas comunes en semillas y en tejidos maduros de la planta de arroz (Mano et al., 2007; Loaces et al., 2011; Ringelberg et al., 2012). Sin embargo, la principal fuente de bacterias endófitas es el suelo (Hallmann et al., 1997) a partir del cual sólo algunas bacterias pueden penetrar los tejidos de la raíz y dispersarse a través del xilema a otros tejidos vegetales. De esta forma se establece una comunidad de bacterias dentro de los tejidos vegetales diferente a las presentes en suelo y rizósfera. Esta característica se ha observado tanto para la abundancia de ciertos grupos fisiológicos (Loaces et al., 2011) como para la identidad de los principales grupos microbianos presentes (Gottel et al., 2011).

Como ya fue mencionado, la inoculación de los cultivos con microorganismos promotores del crecimiento vegetal está muy extendida. En este marco, resulta importante conocer la estructura y dinámica de las comunidades endófitas nativas establecidas en los tejidos internos de los cultivos ya que éstas compiten directamente con los microorganismos inoculados y pueden participar activamente del éxito o del fracaso del tratamiento de inoculación. Este conocimiento, permitiría modificar las estrategias de inoculación utilizadas hasta el momento y optimizarlas.

Bacterias diazótrofes endófitas: grupo fisiológico de gran importancia agrícola

Las bacterias fijadoras de nitrógeno han sido ampliamente estudiadas en la microbiología aplicada a la agricultura. La asociación de las leguminosas con bacterias diazotrofas es la mejor conocida, pero también se han encontrado diversas bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a raíces de muchas gramíneas (James & Olivares, 1997). Las bacterias diazotrofas pueden colonizar y permanecer como endófitas en raíces, tallos y hojas de varios cereales (Olivares et al. 1996; Baldani et al. 1997; Peng et al.

2009). Probablemente allí quedan menos expuestas a la competencia, a las condiciones ambientales adversas y al oxígeno, que inhibe a la nitrogenasa, y por tanto pueden fijar eficientemente el nitrógeno atmosférico y liberarlo directamente a la planta (Stoltzfus et al. 1997). Asimismo, el ambiente que rodea las raíces de plantas anegadas podría ser particularmente apropiado para llevar a cabo este proceso debido a la formación de micronichos aerobios inmersos en suelo anóxico. Esto llevaría a tasas de fijación de nitrógeno altas tanto de diazótrofos aerobios como anaerobios siempre que el oxígeno esté presente (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005), lo que es posible por la presencia del aérenquima, tejido especializado en el intercambio gaseoso, que permite oxigenar las raíces de plantas inundadas.

Las bacterias endófitas más estudiadas en arroz son las fijadoras de nitrógeno debido al beneficio que se estima podrían obtener la planta de ellas (Prakamhang, 2009). Hay numerosos trabajos científicos que estudiaron el efecto y la localización de bacterias inoculadas (Verma et al. 2004; You et al. 2005; Feng et al. 2006; Pains Rodríguez et al. 2008). El gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa, parte del complejo nitrogenasa (enzima responsable de este proceso) ha sido ampliamente utilizado como marcador funcional para el estudio de las comunidades diazótroficas, a pesar de que la sola presencia de este gen no es concluyente respecto a su actividad. Las secuencias *nifH* pueden ser divididas en 49 subgrupos diferentes, 22 de estos subgrupos de secuencias no contienen ningún representante cultivado y muchos de los restantes subgrupos sólo presentan unos pocos miembros que se han podido cultivar exitosamente (Zehr et al., 2003). Por esto resulta de gran importancia abordar el estudio de este grupo por métodos que no dependan del cultivo de bacterias en el laboratorio. En este sentido, Gaby & Buckley (2011) realizaron un estudio de diversidad global de secuencias *nifH* basado en las secuencias de este gen disponibles actualmente en las bases de datos. Este estudio reveló que la diversidad de fijadoras de nitrógeno no está igualmente distribuida en los distintos grupos filogenéticos ni en los ecosistemas y que algunos de los más diversos ambientes, como los suelos, continúan estando pobremente caracterizados. Resulta sorprendente que el grupo de secuencias *nifH* correspondiente a los anaerobios estrictos (Cluster III de acuerdo a Zher et al. 2003), presentó la mayor diversidad de todos los linajes de *nifH* estudiados pero que a su vez es también el grupo cuya diversidad ha sido menos abordada.

Bacterias metanótrofas aerobias: relevancia ambiental en ecosistema arrocero

El metano es un gas de gran importancia ambiental dado que sus emisiones contribuyen al efecto invernadero, siendo los arrozales una de las principales fuentes antropogénicas (Le Mer & Roger, 2001). Las bacterias metanótrofas (oxidadoras de metano) cumplen un rol ecológico importante ya que contribuyen a disminuir estas emisiones, participando en el reciclado de carbono, oxígeno y nitrógeno (Le Mer & Roger, 2001). Estas bacterias están presentes en zonas donde coexisten el metano y el oxígeno, dado que oxidan aeróbicamente el metano (Hanson & Hanson 1996). Por esta razón, los arrozales representan un buen nicho ecológico para su desarrollo, encontrándose a nivel de la rizósfera y de la interfase suelo- agua, donde ambos compuestos están presentes. Las condiciones ambientales que presentan los tejidos internos de plantas de ecosistemas inundados brindan condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias metanótrofas ya que la presencia de tejidos especializados que permiten el intercambio de gases entre las raíces y la atmósfera permite que tanto el oxígeno como el metano se encuentren disponibles. Además, recientemente fue descubierto por Keppler et al. (2006), que muchas

plantas son capaces de producir metano aeróbicamente, así como también metanol, a partir del grupo metil éster de las pectinas que forman parte de las paredes de las células vegetales, por lo que independientemente del estado de irrigación, la oxidación de metano en tejidos internos de las plantas podría ser un proceso mucho más distribuido.

Muchas especies metanótrofas presentan además la capacidad de fijar nitrógeno (Lidstrom et al. 2006). Esta propiedad promotora del crecimiento vegetal, le aportaría una ventaja competitiva extra a este grupo bacteriano que podría contribuir a establecer interacciones benéficas con plantas.

La actividad y distribución de las bacterias metanótrofas que habitan en suelo, rizósfera e interfase suelo-agua de arrozales han sido muy estudiadas (Hoffmann et al. 2002; Eller & Frenzel, 2001; Gilbert et al. 1998). Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito especies metanótrofas como endófitas, a pesar de haberse evidenciado su actividad indirectamente (Parmentier et al. 2011; Kip et al. 2012) y detectado su presencia por métodos moleculares en musgos *Sphagnum* (Kip et al. 2012; Raghoebarsing et al. 2005). Asimismo, recientemente Sessitsch et al. (2012) suministraron evidencias sobre la presencia de metanótrofas endófitas en raíces de arroz (mediante estudios metagenómicos) ya que fueron detectados varios de los genes requeridos para la oxidación aerobia de metano. Por este motivo, resulta interesante abordar la búsqueda de este tipo de microorganismos.

Metodologías para el estudio de comunidades endófitas: del cultivo a la metagenómica

La flora cultivable presente en hoja, semilla y raíces de arroz ha sido poco estudiada. Uno de los pocos autores que estudió esta dinámica a lo largo del proceso de maduración de la planta de arroz (Mano et al. 2006; Mano et al. 2007) muestra que la flora endófitas recuperada por cultivo de hoja y semilla es muy similar entre sí, y diferente de la que se encuentra en raíz. En esos estudios se observó un incremento de las bacterias Gram negativas a medida que avanza el proceso de maduración de la planta, mientras que en raíz la recuperación de este grupo disminuye, aumentando la proporción de bacterias formadoras de endosporas como las del género *Bacillus*. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la densidad de endófitas heterótrofas en hojas de arroz no se incrementó significativamente a lo largo del ciclo de cultivo de arroz (Loaces et al., 2011). Sin embargo, se observó que a medida que la planta crece se seleccionan bacterias productoras de sideróforos dentro de la comunidad endófitas de hoja de arroz, ya que el porcentaje de este grupo bacteriano se incrementa significativamente durante el ciclo para este tejido.

La dificultad de recuperar microorganismos que habitan diferentes ambientes por métodos de cultivo es bien conocida. En particular, en el caso de la comunidad bacteriana que vive como endófitas de distintas plantas, esto es más evidente ya que no resulta sencillo emular las complejas condiciones nutricionales que están presentes dentro de los tejidos vegetales. Por esta razón, el abordaje molecular de su estudio, aunque no carente de sesgos también conocidos, aporta una visión diferente y complementaria de la comunidad de endófitos.

En los últimos 20 años, los métodos moleculares mas utilizados para determinar la composición de comunidades bacterianas endófitas han sido métodos de fingerprinting como DGGE (Denaturant Gradient

Gel Electrophoresis) y T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism) o el clonado y análisis de bibliotecas tanto de genes universales como funcionales (Sun et al. 2008; Tian et al. 2007; Wu et al. 2009).

En los últimos años, se han comenzado a aplicar metodologías mas modernas que permiten determinar la abundancia de genes (PCR en tiempo real) y la composición de las comunidades (secuenciación masiva, metagenómica) obteniendo mucha más información y con una mayor sensibilidad, pudiendo detectar miembros minoritarios de las comunidades. Por ejemplo, estudios metagenómicos realizados recientemente han permitido revelar que unos pocos phyla predominan en las filósferas de diferentes plantas y que factores de la planta estarían involucrados en moldear las comunidades microbianas de la filósfera, lo cual implica adaptaciones específicas y exhibe relaciones multipartita tanto con la planta hospedero como entre los miembros de la comunidad microbiana allí establecida (Vorholt 2012). La comunidad de la filósfera de arroz parece estar dominada por alfa proteobacterias y actinobacterias según estudios metagenómicos llevados a cabo por Knief et al. 2012. En el caso de la endorizosfera de arroz, ésta es un microhabitat exclusivo que requiere numerosas adaptaciones por parte de las bacterias que la colonizan y allí se establecen, de acuerdo a los análisis metagenómicos realizados por Sessitsch et al. (2012). Según este estudio, las bacterias endófitas de raíz estarían involucradas en todos los procesos del ciclo del nitrógeno.

Trabajo de tesis

En este trabajo se realizó el estudio de las comunidades de bacterias endófitas de diferentes tejidos de arroz abarcando diferentes grupos bacterianos (bacterias totales, diazótrofes y metanótrofes) utilizando principalmente un abordaje molecular. Se estudió la diversidad, abundancia y composición de estas comunidades así como algunos factores que las afectan (variedad de arroz, inundación y propiedades fisicoquímicas de los suelos utilizados).

Capítulo I

Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties

Autores: Ferrando, Lucía; Fernández Mañay, Jimena; Fernández Scavino, Ana.
Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química, Universidad de la
República. Gral. Flores 2124, Código Postal 11800. Montevideo, Uruguay

Keywords: bacterial endophytes, community composition, rice leaf, T-RFLP

Publicado en: FEMS Microbial Ecology

Cita:

Ferrando L, Fernández J, Fernández Scavino A (2012) Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties. FEMS Microbial Ecology 80(3): 696-708

Contribución a este capítulo

Mi contribución al artículo publicado en FEMS Microbial Ecology consistió en:

La optimización de las técnicas de amplificación de gen 16S rRNA a partir del ADN total extraído de hojas de arroz desinfectadas superficialmente mediante las dos estrategias empleadas para evitar la interferencia de los organelos de la planta durante la amplificación.

Puesta a punto del T-RFLP del gen 16S rRNA (Terminal Restriction Length Polymorphism) de la comunidad de endófitas de hoja presente en tres variedades de arroz y entrenamiento de la estudiante Jimena Fernández Mañay en el uso de esta técnica y en el análisis de resultados.

Análisis e interpretación de resultados obtenidos por T-RFLP.

Clonado de pool de genes 16S rRNA correspondiente a la comunidad bacteriana endófitas de hoja de arroz, depuración, análisis de resultados, depósito de secuencias obtenidas en base de datos del NCBI. Análisis filogenético del gen 16S rRNA.

Discusión de resultados.

Escritura del manuscrito, envío para su publicación y respuesta a revisores.

Abstract

The endophytic bacterial communities of the three most important rice varieties cultivated in Uruguay were compared by a multiphasic approach. Leaves of mature plants grown in field experiments for two consecutive crop seasons were studied. No significant differences were found in the heterotrophic bacterial density for the three varieties. *Pantoea ananatis* and *Pseudomonas syringae* constituted 51% of the total of the isolates. These species were always present regardless of the variety or the season. Molecular analysis based on the 16S *rRNA* gene was performed by T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism) and cloning. T-RFLP analysis revealed that bacterial communities grouped according to the variety, although the three varieties presented communities that showed 74% or higher similarities. *Brevundimonas*, the dominant genus in the clone library (18% of the clones), which might be present in all varieties according to T-RFLP profiles, was not recovered by cultivation. Conversely, bacteria from the genus *Pseudomonas* were not detected in the clone library. These results indicate that communities established in leaves of physiologically different rice varieties were highly similar and composed by a reduced group of strongly associated and persistent bacteria that were partially recovered by cultivation.

Introduction

Rice (*Oryza sativa*), the most important cereal crop, feeds more than 50% of the world's population (Mano & Morisaki, 2008). The development of a sustainable production system is a major challenge for researchers and rice producers. Endophytes, as defined by Hallmann et al. (1997), are bacteria detected in surface-sterilized plants or extracted from inside plant tissues that do not have harmful effects on the host. Endophytic bacteria have been isolated from a diverse and broad spectrum of plant species and tissues (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Most studies on rice endophytes have been focused on diazotrophic bacteria (Pains Rodrigues et al., 2008) because of the benefit that plants can obtain from them. However, nitrogen-fixing bacteria represent a small fraction of the total endophytic population cultivated from stems and roots of rice in different crop stages (Barraquio et al., 1997; Stoltzfus et al., 1997). Diversity of culturable endophytes inhabiting cultivated rice has been successfully assessed by different authors which have isolated bacteria from seeds, roots, stems and leaves of the plant (Okunishi et al., 2005; Mano et al. 2006; Mano et al., 2007; Tian et al. 2007; Yang et al., 2008; Loaces et al., 2011).

Endophytic bacterial diversity in rice plants has been partially assessed by using 16S *rRNA*-based techniques (Sun et al 2008; Prakamhang et al. 2009) or targeting specific taxa or functional genes (Tian et al. 2007; Wu et al. 2009). Chelius & Triplett (2001) designed primers targeting the 16S *rRNA* gene to overcome the undesirable interference of chloroplast and mitochondrial DNA from the host plant. However, the results obtained by applying this strategy to different plants were not always entirely successful (Idris et al., 2004; Rasche et al. 2006; Becker et al. 2008; Sun et al. 2008). Alternative strategies, like enrichment of bacterial cells from plant tissues before further culture- independent analyses, seem to be promising (Ikeda et al., 2009).

Several authors have shown that cultivar type may influence the associated bacterial communities in different plants. Sessitsch et al. (2002) reported the detection of plant tissue and variety specific endophytes in three potato varieties. Also, Rasche et al. (2006) showed that the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper was affected by chilling and cultivar type. Furthermore, it was observed that the rice variety influenced the ammonia-oxidizing community composition (Briones et al., 2002) and the expression of diazotrophic endophytic bacteria (Knauth et al., 2005).

The three Uruguayan most important rice varieties are distinguished by their different physiological properties which enable them to face successfully adverse environmental conditions (i.e low temperatures, presence of pathogens like *Rhizoctonia oryzae*) or to obtain higher crop yields (Blanco et al., 2003). We hypothesize that these characteristics could select different endophytic bacterial communities. Thus, the aim of this work was to elucidate and to compare the community composition of the endophytic bacteria inhabiting leaves of three Uruguayan rice varieties. T-RFLP analysis and 16S *rRNA* gene cloning were combined with enumeration and identification of the predominant isolates in order to elucidate and to compare the community composition of these rice varieties.

Materials and Methods

Field site and sampling

The irrigated rice system studied in this work consists of two annual crop seasons followed by four years of pastures for livestock feeding (unusual for temperate rice production) which is a typical management employed in Uruguay.

The experimental site was located at the National Agricultural Research Institute (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad Paso de la Laguna) in Treinta y Tres, southeast Uruguay (32°55'S and 54°50'W). Soil characteristics were: silty loam in texture, pH 5.2, N-NH₄⁺ 0.3 mmol L⁻¹, 3.0% organic C and 5.0% organic matter.

Three *Oryza sativa* varieties were studied: *O. sativa*, type Japonica, variety INIA Tacuarí (IT); *O. sativa*, type Indica, varieties INIA Olimar (IO) and El Paso 144 (EP).

The three rice varieties were obtained from local crossing (inbred varieties) and selected according to their different characteristics. These varieties, released in 1985 (EP), 1992 (IT), and 2002 (IO), represent 95% of cropped rice in Uruguay. The selection allowed to differentiate the varieties with high yields (IO), high cold tolerance (IT) or resistance to pathogens, specially *Rhizoctonia oryzae* (EP) (Blanco et al., 2003). The experiment was set out as a completely randomized design with three replicated plots (approximately 12m² each one) per treatment.

Standard conditions were used for rice cultivation. IT and EP were fertilized with 22, 30 and 30 kg N. Ha⁻¹ at seeding, tillering and booting, respectively. For IO nitrogen fertilization consisted of 14, 35 and 21 kg N. Ha⁻¹ at seeding, tillering and internode elongation, respectively. A mixture of herbicides Quinclorac, Clomazone and Propanil was applied at 1.4, 0.8 and 4.0 L.Ha⁻¹, respectively, at the post-emergence stage.

Samples were collected near harvest in 2005 and 2006, between 120 and 140 days after seeding. Three replicated plots were analysed separately for each treatment in both sampling years. Sampling was differently performed in the two successive years.

In 2005, one rice plant was collected from five different points randomly distributed in each replicated plot and then pooled. Then, the pools of leaves obtained from each replicated plot were disinfected and used for counts and molecular analyses.

In 2006, three different points randomly distributed within each replicated plot were sampled (triplicates) in order to study the intra plot count deviation. Five plants were collected from each of the three sampling points and mixed separately. The three pools of rice leaves obtained for each replicated plot were disinfected separately and then used for counts.

Surface disinfection of rice leaves

Collected rice plants were kept at 4°C until further processing. Pooled leaves from the different treatments obtained as was explained above were disinfected. Leaves were separated (5 cm upper from roots) and cut into fragments of 10- 15 cm length. Fragmented leaf pieces were brushed and washed with tap water and detergent. Distilled water was used for the last rinse. Two 100 mL successive washes were made with 5% sodium hypochlorite for 5 minutes with agitation, followed by 3 washes with sterile distilled water (Loaces et al., 2011). In order to verify surface disinfection efficiency, leaves' fragments were rolled on Nutrient Agar and R2A Agar and the plates were incubated at 30°C for 48 hours. No growth was observed.

Enumeration and isolation of endophytic bacteria

Disinfected plant material (5g) was macerated in a sterilized mortar with a 10mL sterile saline solution under aseptic conditions.

In the 2005 sampling, dilutions on sterile 0.9% NaCl solution prepared from macerates were plated out on R2A Agar (Difco) (incorporated seeding) and Nutrient Agar (Difco) (surface seeding) and incubated at 30°C for 72h. At least three colonies per observed morphotype (approximately 20 isolates) were randomly selected and picked from the highest dilutions and then purified and identified.

In the 2006 sampling, heterotrophic endophytic bacteria were counted on R2A as was described above, except that the triplicates of each replicated plot were analyzed separately. Additionally, heterotrophic siderophore-producing bacteria (SPB) were enumerated in R2A-CAS medium (Schwyn & Neilands, 1987) with PIPES final concentration reduced to 50 mM, for SPB. Plates were incubated at 30°C for 72 h. Siderophore production was confirmed by the formation of an orange halo in R2A-CAS medium. Diazotrophic bacteria were enumerated in vials by Most Probable Number (MPN) using RMR media (Elbeltagy et al., 2001) and confirmed by the Acetylene Reduction Assay (ARA) (Dilworth, 1966). Siderophore-producing bacteria and diazotrophic bacteria were counted pooling triplicate macerates from each replicated plot. Isolates were obtained from higher dilution plates or vials of different media utilized. At least 3 colonies were randomly picked from each morphotype. Redundant isolates, within each replicate, with similar colony morphology and ARDRA (Amplified Restriction DNA Ribosomal Analysis) profile were discarded.

Dry weight was determined for plant material by drying 10.0 g of each sample at 100°C until constant weight.

Statistical Analysis

Statistical analysis of data was performed using the free software Past 1.42 (<http://folk.uio.no/ohamer/past>). Bacterial counts were submitted to analysis of variance (ANOVA One way) and the Tukey test ($P < 0.05$) was used for comparison of means.

DNA extraction and 16S rRNA gene amplification

Total DNA was extracted from rice material. The surface disinfected frozen samples were pulverized in sterilized pre-cooled mortars with liquid nitrogen and transferred into sterilized 1.5 mL tubes immediately. Disinfected pooled rice leaves (10 g) were extracted according to Doyle & Doyle, 1987. Briefly, pulverized plant material was treated with CTAB buffer (100 mM Tris.HCl pH 8.0; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 0.2% mercaptoethanol) and then incubated at 65°C for 45 min. After chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v) extraction, DNA was precipitated by isopropanol addition. DNA was centrifuged for 10 min at 10000 rpm, resuspended in TE buffer, and subjected to RNAase treatment (10 µg mL⁻¹ final concentration).

Pure cultures (1.5 mL) were centrifuged (10 min at 15000 g, 4°C) and the pellets were extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Extracted DNA from leaf samples and isolates were used as templates for 16S rRNA gene amplification with primers pair 8f and 1492r. All PCRs were carried out in 25 µL (total volume) mixtures containing approx. 100 ng of total DNA, 0.4 mmol L⁻¹ of each primer, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂, Taq buffer, 0.17 mmol L⁻¹ of each dNTP and 1.2 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The reactions were performed in a Perkin-Elmer, GeneAmpPCR System 2400 thermocycler using the following program: initial denaturation step at 94°C for 30 s, followed by 30 cycles at 92°C for 60 s, 60°C for 60 s and 72°C for 60 s, with a final extension step at 72°C for 5 min.

Screening of endophytic diversity by 16S rRNA gene T-RFLP

T-RFLP analysis of the endophytic bacterial community present in rice leaves of each one of the three replicated plots per treatment sampled in 2005 was performed. In order to avoid the amplification of the chloroplast or mitochondrial DNA, two different PCR approaches were used. Firstly, direct PCR amplification using primers 799f (position 781-799 according to *E. coli* number) and 1492r (position 1492-1510 according to *E. coli* number) was performed. Primer 799f was 5' labelled with 6- carboxyfluorescein (Sessitsch et al., 2002). PCR reactions were carried out in 50 µL (total volume) mixtures using the PCR conditions described above except for primers concentration (0.1 mmol L⁻¹ of each primer). Technical triplicates were performed and pooled after amplification. Secondly, a nested-PCR approach was assayed. First a PCR of 15 cycles with primers 8F and 23Sr FGPL132'-38R (position 110-140 according to *E. coli* number) (Normand et al., 1996) was carried out in 25 µL (total volume) mixtures containing 0.5 µM final primer concentration (the other conditions remained the same as those described above). Then, a 25 cycles PCR using primers 8f and 1492r and 1 µL of the first PCR product as template was performed (including controls without DNA from the first PCR). Technical duplicates and triplicates were done for the first and second PCR step, respectively. These replicates were pooled after PCR amplification and labelled PCR products were concentrated and desalted with MICROCON®100 columns (Amicon Inc., MA, USA). Approximately 300 ng of labelled PCR products were digested with AluI or HhaI (Fermentas).

After enzyme inactivation by heating at 65°C, 15 min, aliquots (4 µL) of the digest were mixed with a master mix (16 µL) containing deionized formamide, loading buffer (Applied Biosystems Instruments [ABI], Foster City, CA, USA), and 0.5 µL of a DNA fragment length standard (ROX 500, ABI). After denaturing of the DNA at 94°C for 5 min and immediate chilling on ice, they were loaded onto a capillary automated DNA sequencer (3100 Genetic Analyzer). After electrophoresis, the length of fluorescently labelled terminal restriction fragments (T-RFs) was analyzed by the GeneScan 3.1 software (ABI).

Terminal restriction fragment (T-RF) sizes between 40 and 445 bp with peak heights larger than 50 fluorescence units were considered for the analysis to obtain reproducible T-RF profiles (Osborn et al., 2000). Strategies used to prevent plant plastids interference were quite successful since not more than 30% of the total fluorescence signal gave T-RF sizes coincident with mitochondrial or chloroplast rice DNA.

The four data sets (amplicons retrieved from primers 8f or 799f restricted with *HhaI* or *AluI*) obtained for each replicated plot were run by duplicate. Total Intensity of Fluorescence present in each electropherogram was compared within each data set and T-RFLP data were standardized to the lowest quantity as was previously described (Dunbar et al., 2001). All profiles were aligned considering identical the T-RFs that differed by less than 3 bp. T-RF composite profiles were constructed by calculating the mean of peak heights from duplicate runs obtained from each replicated plot. Peaks that were absent in one duplicate run were omitted unless they were detected in both replicates of the remaining two plots from the same treatment. Data of relative abundance of each fragment were utilized to perform UPGMA clustering analysis with the Morisita similarity index using the Past 1.42 software (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). This analysis included the four data sets (accounting for 86 different T-RFs) for each replicated plot by treatment.

Cloning and phylogenetic analysis

The rice variety El Paso 144 sampled in 2005 was further selected for cloning because of its high diversity revealed in the T-RFLP analysis. Fingerprinting of plots B and C contained all peaks present in the three rice varieties studied, thus pooled DNA from these two replicated plots was utilized. The PCR product obtained as explained above (nested PCR approach) was cloned using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp.) following the protocol of the manufacturer. Clones were subjected to tooth pick PCR (115 clones), using primers T3- T7 provided with the cloning kit. The amplified products were digested with *MspI*–*RsaI* and grouped into 19 Operational Taxonomic Units (OTUs) based on their restriction patterns. At least two clones representative from each OTU group were sequenced with vector specific primers T3 and T7. All sequencing reactions were carried out at MacroGen Sequencing Service, Korea using an ABI PRISM 3730XL capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). About 60% of retrieved clone sequences corresponded to bacterial gene, the remaining sequences corresponded to mitochondria and chloroplast inserts.

Rarefaction analysis of the library was performed taking into account only bacterial sequences using the free software Analytic Rarefaction 1.3 (<http://www.uga.edu/~strata/software/>), developed by Steven Holland.

The 16S *rRNA* gene was partially sequenced for isolates obtained using the primer 8F described above. Nucleotide sequence data reported in this paper has been deposited in the EMBL GenBank, and accession numbers corresponding to clones and isolates are shown in Figure 1.2.

At least one representative of each clone and isolate per OTU was used to construct the phylogeny. For 16S *rRNA* phylogenetic analysis, alignments and phylogenetic distance dendrograms were constructed using the neighbour-joining algorithm (Saitou & Nei, 1987) as implemented in MEGA4 (Tamura et al., 2007). Evolutionary distances were calculated using Jukes-Cantor method (Jukes & Cantor, 1969).

Results

Abundance and distribution of culturable endophytic bacteria in the three rice varieties

Heterotrophic counts, corresponding to the 2006 rice crop, were performed in triplicates taken from each replicated plot. The abundance of heterotrophic bacteria was not significantly different among the three rice varieties (Table 1.1). Similar results were obtained on the pooled leaves from each replicated plot of the 2005 harvest, being the heterotrophic numbers in the same range for the two media utilized (data not shown). Heterotrophic siderophore- producing bacteria (HSPB) counts (expressed as Log N bacteria (g fw)⁻¹) were 2.42 ± 0.31 , 3.49 ± 0.67 and 3.72 ± 0.16 for IT, IO and EP, respectively. HSPB densities did not show significant differences among the rice varieties. Although diazotrophic bacterial numbers were low, less than 3.33 expressed as Log N bacteria (g fw)⁻¹, a few isolates were obtained and identified (isolates D1, D34 and D43; Fig 1.2A).

Plot	Log ₁₀ N of CFU ^a (g fresh weight) ⁻¹		
	EP	IT	IO
A ^b	3.53 ± 0.31	nd	4.24 ± 0.40
B ^b	3.95 ± 0.21	3.21 ± 0.17	3.62 ± 0.65
C ^b	4.10 ± 0.44	3.60 ± 0.17	4.60 ± 0.97
Mean	3.86 ± 0.30	3.40 ± 0.28	4.15 ± 0.50

Table 1.1. Enumeration of heterotrophic endophytic bacteria in leaves of three rice varieties (2006 crop season). nd: not determined. ^a CFU: colony forming units. *Oryza sativa* variety: EP: El Paso 144; IT: INIA Tacuarí; IO: INIA Olimar. ^b The values represented the mean of triplicate samples taken from each of three replicated plots (A, B and C, except for IT for which plants from only two replicated plots were analyzed) .

OTU ^a	Representative Isolates	Closest relative (Accession number)	% Identity ^b	Total number of isolates	Isolates from each sample ^c					
					EP		IT		IO	
					2005	2006	2005	2006	2005	2006
Pa1	Pt17, pt31, pt29, pt2	<i>Pantoea ananatis</i> 3Pe76 (EF178449)	≥ 98	27	4	8	3	2	1	9
Pg1	Ps24, pt6	<i>Pantoea agglomerans</i> HK 14-1AY335552	≥ 99	8		4		1	1	2
P1	Pt59, Mb16	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> EU906856	≥ 99	13	3	3	1	2	2	2
P2	Pa1, Pt15	<i>Pseudomonas</i> sp. AHL 2 AY379974	≥ 99	4		4				
P3	Ps19	<i>Pseudomonas graminis</i> KF701 AB109886	99	1					1	
P4	Ps22	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A CP000058	99	1			1			
P5	Ps21	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> 05-220EU203153	100	1			1			
P6	S6	<i>Xanthomonas</i> sp. Aed03EU740995	100	1			1			
Sp1	S4	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> AB071955	100	1		1				
Sp2	S11	<i>Sphingomonas azotifigens</i> AB217473	98	1						1
Sp3	S2	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> AB071955	99	1				1		
Sp4	J52	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> EU730917	99	1	1					
Mb1	Mb2, Mb3, Mb21	<i>Microbacterium testaceum</i> SE017 AF474325	≥ 98	6	1		2	2		1
Cb1	S7, JT, Mb23	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>beticola</i> AY273208	≥ 98	6	1	1	3			1
Cb2	JS14, Mb18, IS14	<i>Curtobacterium citreum</i> Z10zhy AM411064	≥ 98	3	1	1				1
St	J210	<i>Staphylococcus cohnii</i> JL812 EF512729	99	1						1

Sz	J237	<i>Aurantimonas ureilytica</i> 5715S-12 DQ883810	97	1						1	
Mt	JB	<i>Methylobacterium</i> sp. Pd-S-(s)-I-D-4(3) AB242971	97	1				1			
B1	152	<i>Bacillus megaterium</i> HDYM-24 EF428248	99	1					1		
		Total isolates		79		11	22	12	9	6	19

Table 1.2. Dominant heterotrophic endophytic bacteria isolated from leaves of three rice varieties in two successive crop seasons. ^a Operational Taxonomic Units defined by ARDRA profiles. ^b Several isolates were sequenced for each ARDRA profile. The lowest values of identity among the several isolates sequenced are shown. ^c*Oryza sativa* variety: EP: El Paso 144; IT: INIA Tacuarí; IO: INIA Olimar.

The culturable heterotrophic endophytes (79 isolates) detected in each rice variety in two successive crops is shown in Table 1.2. Representative isolates of each OTU were successfully identified since partial sequence of the 16S *rRNA* gene showed 97% or higher similarity with NCBI database sequences. Sequences corresponding to the same OTU were grouped and the lowest similarity percentage is shown in Table 1.2.

Leaves of the three rice varieties had in common a few genera of bacteria. Predominant isolates recovered from the highest dilution counts were affiliated mainly to the *Gammaproteobacteria* (*Pantoea* spp and *Pseudomonas* spp) and to the *Actinobacteria* (*Curtobacterium* spp and *Microbacterium* spp). The third common phylogenetic group was the *Alphaproteobacteria*, with *Sphingomonas* as the main genus retrieved.

Pantoea ananatis and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* were always present, accounting for 51% of the heterotrophic bacteria isolated (Table 1.2). The less frequent OTUs (Pg1, Mb1 y Cb1), associated to the species *Pantoea agglomerans*, *Microbacterium testaceum* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola*, respectively, represented 25% of the isolates and were detected at least once in each rice variety. Similarly, the genus *Sphingomonas*, distributed in four OTUs, was recovered from the three varieties. The ten remaining profiles that grouped 19% of the isolates were randomly distributed in the rice varieties or crop seasons except for OTU P2 (*Pseudomonas* sp. AHL2) which was found exclusively in the variety El Paso in 2006.

These results indicate that the culturable endophytic communities were similar in abundance and were dominated by two species (*P. ananatis* and *P. syringae*) persistently associated to the three rice varieties.

Molecular fingerprinting of the endophytic bacterial community in the three rice varieties

T-RFLP profiles of endophytic communities from replicated plots of the EP, IO and IT rice varieties were compared. The primer 799f allowed the amplification of the nine samples but it did not discriminate among them since all the samples showed 92% or higher similarity (data not shown). The nested amplification allowed a better discrimination, although the Plot B of the variety IT did not show good restriction profiles and it was excluded from this analysis. Thus, four data sets (two PCR strategies and two restriction enzymes) were combined and each plot (except by plot B of the variety IT) was represented by between 27 and 49 T-RFs.

The clustering analysis showed that endophytic communities from different plots of the same variety were highly similar (more than 85%) (Fig 1.1). The two varieties of Indica origin (EP and IO) sustained more similar (80%) bacterial communities.

On the other hand, the lowest similarity (74%) was observed when varieties EP and IO were compared with IT. These differences were not explained by any dominant T-RF in the four data sets (data not shown).

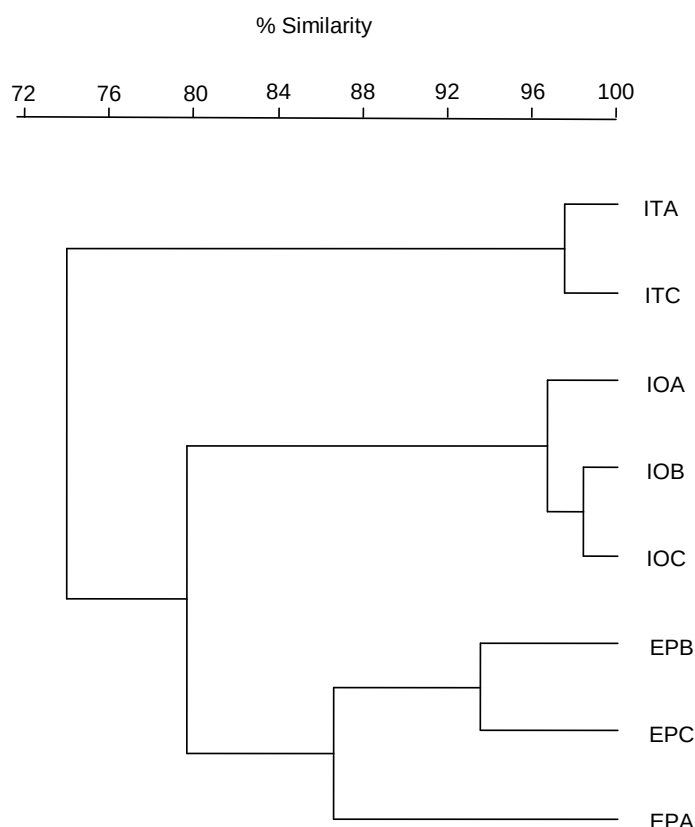


Figure 1.1. UPGMA dendrogram showing clustering analysis and similarity percentage among T-RFLP profiles corresponding to the three treatments studied. The four data sets obtained were included (amplicons retrieved from primers 8f or 799f restricted with *HhaI* or *AluI*). Rice varieties are indicated as IT (INIA Tacuarí), IO (INIA Olimar) and EP (El Paso 144). Replicates of each treatment are indicated as A, B and C.

Phylogenetic analysis of the endophytic bacterial community

Although DNA from only one rice variety was cloned, this clone library was useful to compare with the isolated bacteria and to infer the identity of the main T-RFs since no significant differences were found among varieties according to the T-RFLP clustering analysis.

Despite 30 and 10% of the analyzed clones corresponded to rice mitochondria and chloroplast, respectively, the analysis of endophytic community composition was performed quite successfully. Confirmation of endophytic diversity coverage was conducted by constructing rarefaction curves for the 16S rRNA gene sequences cloned.

The 16S rRNA gene library showed a community composed of six main phylogenetic groups. Most of the sequences clustered within the *Alphaproteobacteria* (46%) including *Brevundimonas* (18%), *Erythrobacter*-*Porphyrobacter* (13%) and *Sphingomonas* (11%) as the dominant genera. Actinomycetales was the second numerically important phylogroup (16%) with *Patulibacter* as the main genus (5%). Firmicutes

were represented by the genus *Bacillus* (5%) and by the species *Aerococcus viridans* (7%). CFB phylogroup (*Cytophaga- Flexibacter- Bacteroides*) was represented only by the genus *Chryseobacterium* (11%) and the *Gammaproteobacteria* (11%) mostly by the genus *Pantoea* (9%). The sixth group belonged to the order Rubrobacterales (5%) with *Brachybacterium* as the main genus.

Phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of the clones and isolates were compared with sequences retrieved from the NCBI database (Fig 1.2). Most of the clone sequences were closely related (more than 98% sequence identity) to isolated bacteria previously described. Four of the six phylogenetic groups observed in this work were represented by isolates and clones, and only two phylogroups (CFB and Rubrobacterales) were detected exclusively by molecular analysis. These results suggest that culture and molecular approaches allowed to reach a wide range of the bacterial diversity at this level of taxonomic resolution.

However, certain genera were detected only by one approach. Thus, 47% of the sequences in the clone library had no close relatives among the isolates within the same genus. The two main genera (*Brevundimonas* and *Porphyrobacter/Erythrobacter*) of the *Alphaproteobacteria* were only retrieved by culture-independent analysis despite that *Brevundimonas* was the dominant genus in the clone library. On the other hand, some genera within the *Gammaproteobacteria*, like *Pseudomonas* (filled triangles in Fig 1.2), were represented exclusively by isolates. This class also included diazotrophic endophytes related to the genera *Klebsiella* (isolates D1 and D34) and *Enterobacter* (isolate D43) that were unlikely to be detected in the clone library since they were recovered in low dilutions of RMR medium.

Figure 1.2a

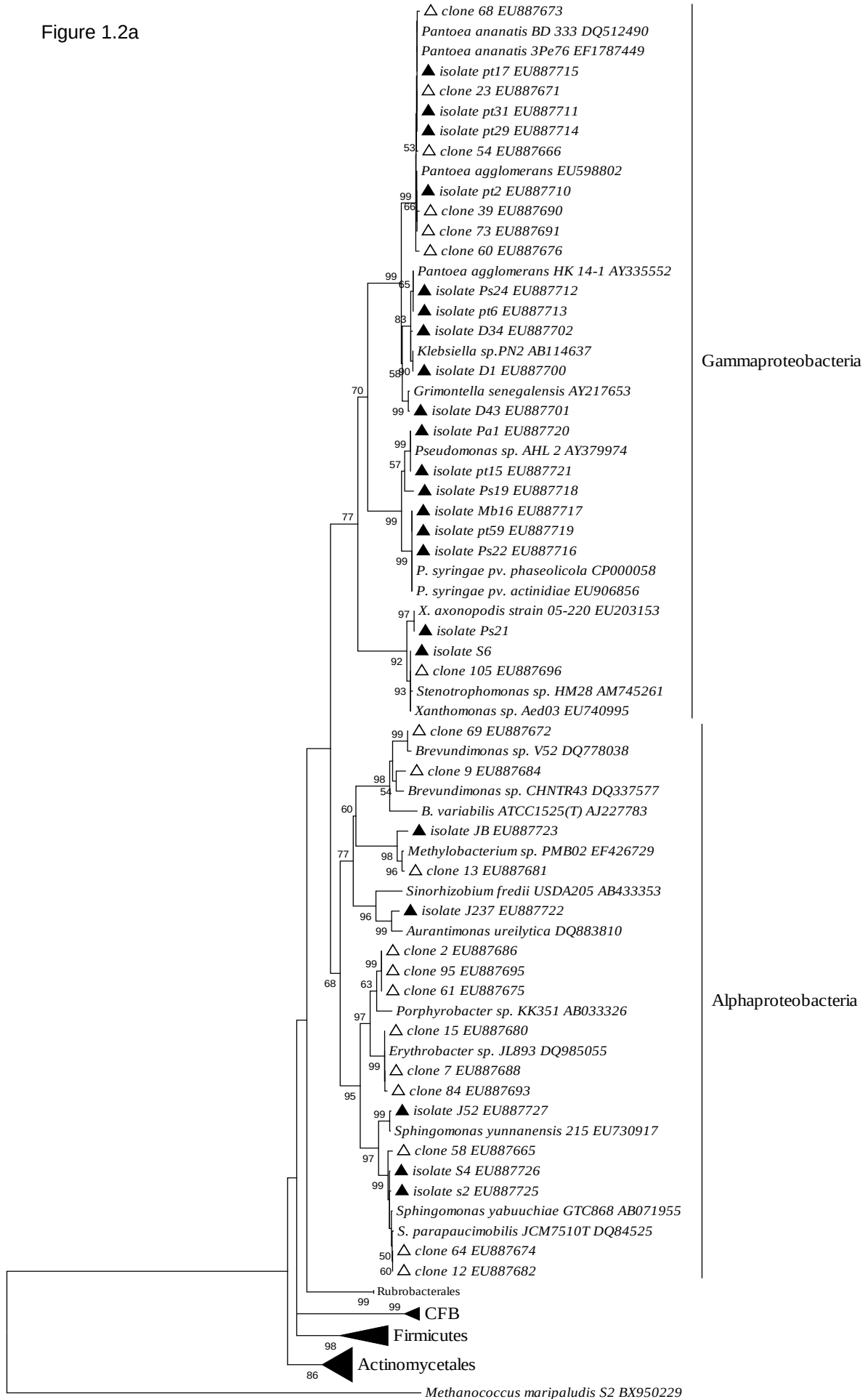
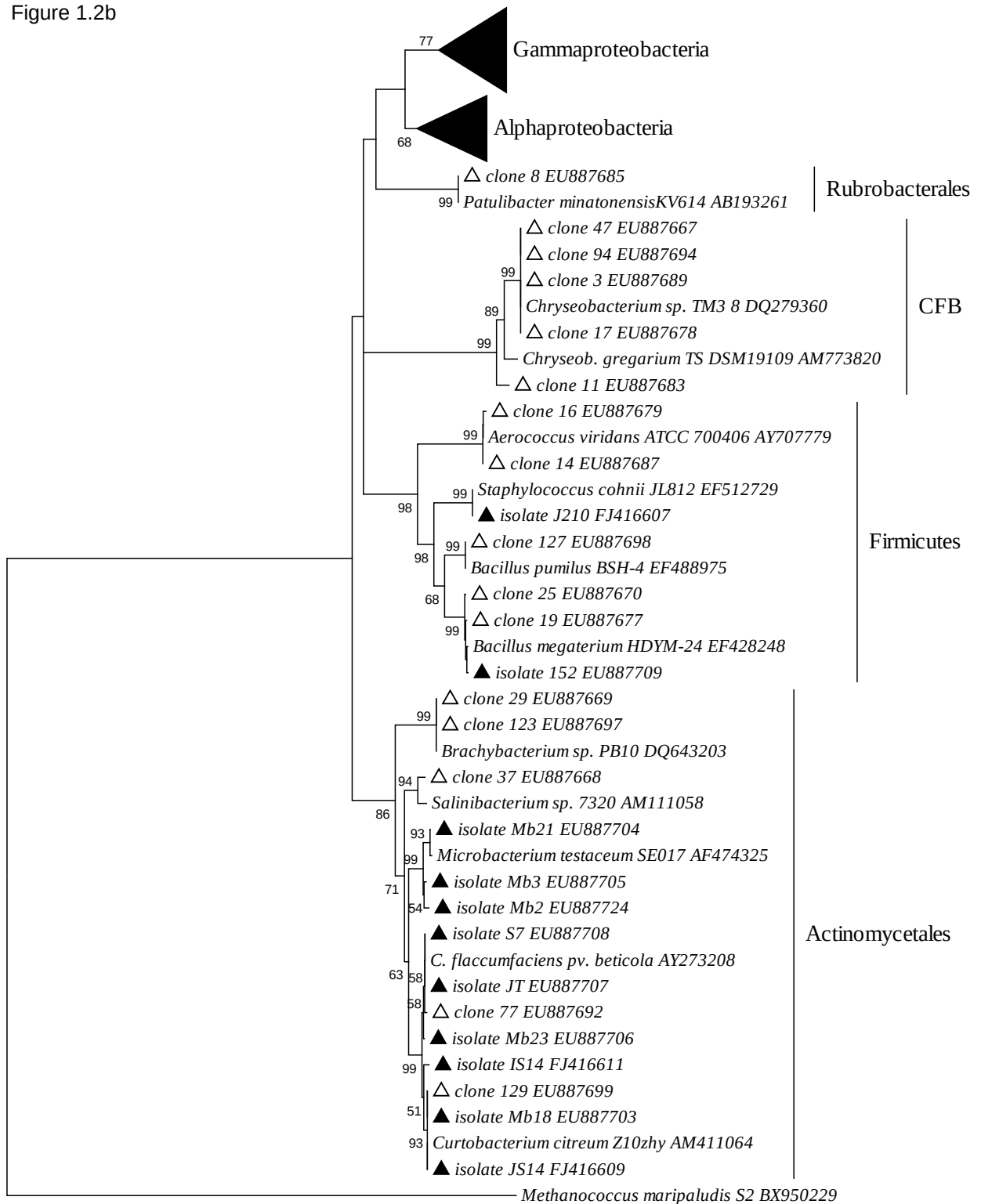


Figure 1.2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on gene sequences corresponding to clones (empty triangles) and isolates (filled triangles) retrieved from endophytic communities inhabiting rice leaves. **a** *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*. **b** *CFB*, *Firmicutes*, *Rubrobacterales* and *Actinomycetales*. The reference sequences are shown by species or clone name followed by the GenBank accession number. Bootstrap values >50% (100 data re-samplings) are given. The bar represents 10% divergence.

Figure 1.2b



Phylogenetic assignment of the T-RFs (Terminal Restriction Fragments)

To elucidate the community structure in the EP variety, the sequences retrieved from the 16S *rRNA* gene clone library and from the isolates were used to predict *in silico* the identity of the peaks in the T-RFLP fingerprints (Table 1.3). The phylogenetic affiliation was done using the data set comprised by the 8F primer and both restriction enzymes, but only *HhaI* results are shown because these profiles were the most diverse and no additional information was provided with the *AluI* data set. Some of the T-RF sizes were expressed as a base pair range in order to account for the different possible assignments. Table 1.3 summarizes the T-RFs present in the profiles of plots B and C of the EP variety. The different approaches used, i.e. isolation, cloning and T-RFLP, were correlated in this table.

Some isolates belonging to the genus *Curtobacterium*, which was also detected by cloning, were not listed in Table 1.3 since their T-RF sizes were larger than standard marker coverage. For the same reason, the T-RFs representing clones of *Aerococcus viridians* are not in this Table.

Consistent results were obtained by both molecular methods, except for some clones of *Actinobacteria* (i.e. *Brachybacterium* sp., clones 29 and 123, Fig. 1.2) which accounted for about 10% of the clone library and were not found in the T-RFLP profiles.

Most of the T-RFs could be explained by the *in silico* fragments inferred from clones or isolates obtained (Table 1.3). Only three T-RFs (58 to 63 bp, 136 to 138 bp and 357 to 361 bp), present in both samples (EPB and EPC) could not be assigned.

This analysis would indicate that the T-RF of 333 bp, present in all samples with fluorescence intensities ranged between 2 and 18%, could be assigned to the genus *Brevundimonas*, dominant in the clone library analyzed from the EP variety. Similarly, the second most widespread T-RF (226 bp), detected in two plots of IO and one of EP, which was not represented by isolated bacteria, could be assigned to the *Actinobacteria* or to CFB (Table 1.3).

Community size (bp)	T-RF	Isolates	Clones	Closest relative	16S rRNA % Identity	Affiliation
81 to 84	J52			<i>Sphingomonas yunnanensis</i> strain 215, EU730917	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
			C2	Uncultured alpha proteobacterium, AJ318120	97	
			C58	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> , AB071955	98	
			C95	<i>Porphyrobacter</i> sp. KK351AB033326	97	
			C84	<i>Erythrobacter</i> sp. JL893 DQ985055	99	
			C12, C64	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> , AB071955	>98	
			C61	<i>Patulibacter minatonensis</i> AB193261	99	<i>Actinobacteria</i>
94			C11	<i>Chryseobacterium</i> sp. TM3_8, DQ279360	>99	<i>Bacteroidetes</i>
141 to 145*		Mb5		<i>Microbacterium testaceum</i> strain SE017, AF474325	99	<i>Actinobacteria</i>
213 to 215	Pt59			<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coryli</i> , strain NCPPB 4273, AJ889841	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
			C105	<i>Xanthomonas albilineans</i> GPEPC73, FP565176	98	
226			C8	<i>Patulibacter minatomensis</i> isolate CP177-2, AB193261	99	<i>Actinobacteria</i>
			C3, C17, C47, C94	<i>Chryseobacterium</i> sp. BBTR48, DQ337589	>97	<i>Bacteroidetes</i>
239	J210			<i>Staphylococcus cohnii</i> strain JL812, EF512729	100	<i>Firmicutes</i>
			C127	<i>Bacillus pumilus</i> strain BSH-4, EF488975	99	
333			C69	<i>Brevundimonas</i> sp. Tibet-IBa1, DQ108394	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
			C9**	<i>Brevundimonas</i> sp. CHNTR43, DQ337577	98	
373 to 377			C37	<i>Salinibacterium</i> sp. 7320, AM111058	97	<i>Actinobacteria</i>
				<i>Pantoea agglomerans</i> strain WAB1913, AM184254	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
			C60	<i>Pantoea ananatis</i> strain BD 333, DQ512490	99	
	Pt2			<i>Pantoea ananatis</i> strain JA04, DQ365569	99	
				<i>Pantoea ananatis</i> strain 3Pe76, EF178449	>99	
	Pt31		C54**	<i>Brevundimonas</i> sp. CHNTR43, DQ337577	98	<i>Alphaproteobacteria</i>

Table 1.3. Phylogenetic assignment of terminal restriction fragments (T-RF) retrieved from endophytic communities of the EP rice variety. Predicted T-RFs correspond to in silico *HhaI* restriction analysis of clones and isolates sequences obtained from plots B and C.* Rice Mitochondria presents a restriction fragment of 140-142 bp. Rice Chloroplast does not present restriction site.** Clones closely related to the same *Brevundimonas* sp. but presenting different T-RFs.

Discussion

Mature leaf tissues of rice are a selective environment for the establishment of a bacterial endophytic community. These bacteria should be able to resist and adapt to physiological changes experienced by the rice plant as the crop cycle evolves. During the mature plant stage, the accumulated carbohydrates in leaf and culm translocate into the grains (Yoshida, 1981). Thus, the nutrient concentration decreases in mature leaves being less available for bacteria. These conditions may select for bacteria that might have a strong interaction with the rice plant and become adapted to this particular niche. Furthermore, this interaction may be influenced by the particular physiology of the rice variety.

The present work describes and compares the endophytic bacterial community structure from leaves of three cultivated rice varieties by molecular and cultivation approaches. Information from three replicated plots per variety and from two successive crop seasons was taken into account for the comparison.

Densities of the viable endophytes determined in this work were in the same range as those reported by other authors (Mano et al., 2007; Prakamhang et al., 2009). In a previous work, it has been shown that the density of heterotrophic endophytes in rice leaves did not increase significantly along the crop cycle (Loaces et al., 2011). The results obtained in the present work suggest that endophytic heterotrophic bacteria present at the mature stage in rice leaves have similar densities regardless of the rice variety or the crop season.

We also found that there was no apparent preferential association of species among the different varieties. A reduced group of species was strongly and persistently associated to rice leaf in any variety. *Pantoea* was the predominant genus accounting for 44% of the isolates, and *P. ananatis* represented more than 15% of the isolates recovered in any of the samples. This species has been detected in all tissues of the variety INIA Olimar throughout the whole cycle of the rice crop (Loaces et al., 2011). The same species was also retrieved from rice seeds in Japan (Mano et al., 2006) and *Pantoea agglomerans* has been isolated from rice roots as a nitrogen-fixing bacteria in Thailand (Prakamhang et al., 2009). Verma et al., 2004 observed that *Pantoea* sp. was a more aggressive colonizer than *Ochrobactrum* sp. when both strains were co-inoculated in rice seeds. This suggests that bacteria of the genus *Pantoea* may have the ability to colonize and grow inside the rice tissues in different agroecosystems.

The genera *Curtobacterium* and *Microbacterium*, that summarized 19% of the isolates, were alternatively present in the three varieties. Only 12 % of the isolates, which belonged to the genera *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Aerobacter*, were randomly distributed among the samples. Thus, most of the isolates were found in two successive rice crop seasons, suggesting that their presence is not fortuitous and that a strong association between these bacteria and the plant may be involved in such selection. Several authors reported that at least a portion of the endophytes found in leaves are seed-borne (McInroy & Kloepper, 1995; Kaga et al., 2009; Loaces et al., 2011). Our results suggest that the bacteria isolated remained associated to the plant irrespective of the variety and may be transferred through the seeds.

T-RFLP and cloning were a suitable methodological combination in order to compare the endophytic communities from the three different rice varieties and inferring the identity of their members. The nested

PCR strategy, used to avoid the chloroplast and mitochondrial interference, was partially successful and enough amounts of data were obtained to perform the community analysis.

Endophytic bacterial communities corresponding to the three rice varieties presented highly similar T-RFLP profiles (Fig 1.1). In addition, the culture dependent analysis showed that the main heterotrophic endophytic bacteria were common to the three varieties.

Most of the phylotypes observed, detected by cloning and isolation, were distributed in five main phylogroups: *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *CFB* (Fig. 1.2). In contrast to the dominance of *Betaproteobacteria* observed in rice roots by *16S rRNA* gene cloning with primers 799f- 1492r (Sun et al., 2008), we found that *Alphaproteobacteria* predominated in the clone library constructed from rice leaves of the EP variety using the nested PCR strategy.

Many phylotypes of the clone library were represented by the isolates, but some exceptions should be pointed out. *Brevundimonas*, affiliated to the *Alphaproteobacteria*, represented the main genus in the clone library, and was not recovered by isolation in spite of the use of two different media. Bacteria from this genus have been isolated from rice as endophytic nitrogen-fixing bacteria (Prakamhang et al., 2009) and detected in low proportion in a *16S rRNA* clone library from rice roots (Sun et al., 2008). Besides diazotrophy, *Brevundimonas* can be beneficial to the plant because of its suppressive effect against pathogenic fungi (de Boer et al., 2007) or its nematicidal ability (Zheng et al., 2008). *Brevundimonas* has also been retrieved as endophyte from diverse plant tissues like cotton roots (Hallmann et al., 1999), banana shoots (Thomas et al., 2008), carrots (Surette et al., 2003), and tomato leaves (Enya et al., 2007). In addition, the T-RF of 333 bp, which might be assigned to the genus *Brevundimonas*, was present in all the samples. However, the failure to recover it in any of the samples may be attributed to the limitations of the cultivation method. Lower incubation temperatures (20 to 25°C) than that employed in this work could be more appropriate to recover bacteria of this genus.

Similarly, the genus *Chryseobacterium* (11% of the clone library) was only detected by molecular analysis in this work. However, species of *Chryseobacterium* have been isolated from rice roots (Mano et al., 2007) and leaves of sugar beet (Shi et al., 2009). Also, the genera *Porphyrobacter*/*Erythrobacter* (13% of the clone library) had no close relatives among the isolates. These genera were detected in aquatic ecosystems (Hiraishi & Imhoff, 2005; Shiba & Imhoff, 2005) although not reported as endophytes. Since the respective clones of these genera were not represented by an exclusive T-RF (Table 1.3) the importance and distribution of these bacteria in the three varieties could not be established.

In contrast to the above described genera, *Pseudomonas* was widely detected by isolation but not recovered by cloning. This genus was found as a dominant group of siderophore-producing bacteria that can be isolated from all tissues throughout the rice crop cycle (Loaces et al., 2011). The T-RF 213-215 bp, which could correspond to the isolates of *Pseudomonas syringae* recovered in this work (Table 3), was only detected in one or two of three replicated plots of each rice variety representing less than 7% of the total intensity of fluorescence in any sample. Interestingly, many *Pseudomonas* spp. have been considered as potential biological inoculants because of their properties as pathogen antagonists or plant

growth promoting bacteria. However, if *Pseudomonas* depend on their capacity to colonize plant leaves, our results suggest that their true ability to be effective promoting plant growth should be further studied.

In conclusion, the structure of endophytic bacterial communities in mature leaves of the rice varieties INIA-Tacuarcí, INIA-Olimar and El Paso 144, were highly similar. Although molecular and culture- dependent analyses revealed differences in the dominant species, similarities in community composition of the three varieties were maintained. While *Pantoea* and *Pseudomonas* predominated among the isolated bacteria, *Brevundimonas* seems to be the most abundant and widespread genus detected by molecular analysis.

Acknowledgements

We are very grateful to PDT (Programa de Desarrollo Tecnológico) who supported this work and to ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) who provided a PhD scholarship to L. Ferrando. We also want to thank Dr Silvana Tarlera for revising the manuscript and the reviewers for their constructive comments.

Capítulo II

Significant changes on diazotrophic endophytic bacterial communities inhabiting rice (*Oryza sativa*) plants occurred after flooding.

Autores: Ferrando, Lucía and Fernández Scavino, Ana.
Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química, Universidad de la
República. Gral. Flores 2124, Código Postal 11800. Montevideo, Uruguay

Keywords: diazotrophic endophytes, *nifH* gene, T-RFLP, q-PCR, *nifH* gene clone library, rice

Se enviará para su publicación en: FEMS Microbial Ecology

Contribución a este capítulo

Planificación y realización de todas las actividades experimentales.

Optimización de la técnica q-PCR para el gen *nifH* y preparación del estándar para la cuantificación.

Análisis de resultados obtenidos y escritura del manuscrito.

Abstract

The impact of flooding on diversity, composition and abundance of endophytic diazotrophic communities established in rice plants were addressed. Quantitative PCR analysis from surface disinfected roots and leaves revealed that the abundance of *nifH* gene was significantly higher in roots than in leaves at both water regimes analysed. Besides, while *nifH* gene copies in rice roots increased almost one ten-fold after flooding, this representative parameter of diazotrophic populations remained unaffected for rice leaves.

Dramatic changes in diversity and community composition were observed after flooding. T-RFLP (Terminal Fragment Length Polymorphism) profiles retrieved from rice roots before (BF) and after flooding (AF) were quite diverse; Shannon Index values obtained for each water regime showed that rice roots after flooding sustained a significantly more diverse diazotrophic community of endophytes than the rice roots before flooding. According to Clustering Analysis and Principal Component Analysis (PCA) performed on standardized T-RFLP data, samples were clustered by water regime. Clone libraries of *nifH* gene performed from roots of both conditions reinforced these findings. BF rice roots were dominated by *Gammaproteobacteria* (66%) being *Stenotrophomonas* the main genus (50%), followed by *Alphaproteobacteria* (16%) and *Betaproteobacteria* (14%) being *Bradyrhizobium* sp. and *Pleomorphomonas oryzae*, and *Ideonella*- like sequences, respectively, the more abundant. *Firmicutes* (4%) were also represented before flooding by the genus *Paenibacillus*.

Conversely, a completely different endophytic diazotrophic community was observed in the clone library from flooded rice roots. *Alpha*, *beta* and *gammaproteobacteria* accounted for 18, 34, and 2%, respectively. *Gammaproteobacteria*, particularly *Stenotrophomonas* spp, diminished to 1% after flooding. A wide variety of anaerobic nitrogen- fixing bacteria with diverse metabolic traits were retrieved from flooded rice roots accounting for 26% of the clone library. Among them, sequences belonging to *Betaproteobacteria*, *Spirochaetes*, *Chlorobi*, *Deltaproteobacteria* and diverse *Firmicutes* members were found. These findings suggest anaerobes could be playing a major role in nitrogen fixation in this ecosystem when anaerobic conditions are installed. These native communities should be further explored since could be promising resources for new plant promoting bacteria as well as they might compete with Plant Growth Promoting bacteria utilized in commercial inocula.

Introduction

Nitrogen fixation is a well-known process (molecular nitrogen reduction to ammonia) that has been extensively studied by its major role in the sustainability of agricultural systems. Nitrogen- fixers comprise a diverse physiological group belonging not only to *Bacteria* but also to *Archaea* domain (Martínez Romero 2006). Consequently, multiple set of primers have been designed in order to assess diversity, composition and expression of nitrogenase reductase gene (*nifH* gene). However, any of the primers pair designed only targeted a fraction of total diazotrophs (Gaby & Buckley 2012; Demba Diallo et al. 2008) and conditioned the results obtained by the different studies performed.

According to the global diversity analysis of database *nifH* sequences addressed recently by Gaby and Buckley (2011), the diversity of nitrogen-fixing bacteria is poorly described and the physiology and phylogeny of many microorganisms remains unknown. Five major clusters have been defined according to *nifH* phylogenetic analysis: Cluster I, comprising most of functional and known *nifH* sequences encoding conventional bacterial FeMo nitrogenases. This cluster is dominated by *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* (Zher et al. 2003). Cluster II, quite smaller than Cluster I, contains sequences from alternative FeV and FeFe nitrogenases and from some *Archaea*. Cluster III is mainly composed by *nifH* sequences from anaerobes (*Archaea* and *Bacteria*). Spirochaetes, sulphate-reducing bacteria, green sulphur bacteria, clostridia, methanogens and acetogens are their dominant members (Zher et al. 2003). Clusters IV and V are comprised by *nifH* paralogues which are not involved in nitrogen fixation (Young, 2005).

Biological Nitrogen Fixation is an oxygen-sensitive process. Root environments of flooded plants may be particularly suitable for this process due to the formation of aerobic microniches immersed into anoxic soil which could lead to high nitrogen fixation rates of aerobic as well as anaerobic diazotrophs (Hurek and Reinhold-Hurek, 2005). This is possible through the presence of the aerenchyma, a specialized plant tissue that allows flooded plant to perform the gas exchange between roots and atmosphere (Bodelier, 2003). Rice plant suffers tissue adaptations when is submerged, developing more and larger air spaces than uplands grown rice. Additionally, flooding causes a series of reductive changes at the root environment because of the rapidly installed anaerobic conditions (Yoshida, 1981).

Endophytic nitrogen fixing bacteria have been extensively studied in rice (*Oryza sativa*) roots. Most of these studies were focused on bacteria associated to rice roots and not exclusively on endophytes. Dominant genera reported belonged mostly to the *Proteobacteria* class. A betaproteobacterial prevalence (50% of clone library) from roots of modern rice cultivars was reported by Wu et al. 2009 with *nifH* sequences closely related to *Azoarcus* spp.. But other interesting community members were found, as methylotrophs and methane oxidizers that may also play an important role fixing nitrogen in rice roots. Ueda et al. (1995) reported that mainly the sulphate-reducing deltaproteobacteria *Desulfovibrio gigas* was the dominant diazotroph associated to rice roots. Also, sequences of *nifH* belonging to *Alphaproteobacteria* (*Bradyrhizobium* sp. and *Methylocystis parvus*) were abundant. A *nifH* microarray analysis revealed that *Betaproteobacteria* and gram-positive bacteria were present in wild rice roots (Zhang et al. 2007), although *nifH* genes from the latter group were mainly expressed. Conversely, the active diazotrophic bacteria in flooded rice were dominated by *Deltaproteobacteria* with around 70% of the *nifH* transcripts phylogenetically distant from any sequence of databases although they gathered with *Geobacter sulfurreducens* (Elbeltagy and Ando 2008).

Flooding has been demonstrated to impact on nitrogenase activity from tropical rice soils. Diazotrophic activity is significantly increased when rice soils were flooded (Das et al. 2011). However, the effect of flooding on endophytic bacterial communities inhabiting inner plant tissues, to our knowledge, has been scarcely addressed. Hardoim et al. (2012) assessed the development of bacterial endophytes from second-generation seeds up to tiller stage of plants growing aseptically in gamma-irradiated soils in a greenhouse experiment. The authors also addressed two different abiotic factors affecting endophytic

bacterial community composition (soil type and water regime). Their findings indicated that, under the used conditions of reduced soil microbial complexity, the roots and shoot endophytic communities of rice plants cultivated under dissimilar water treatments (flooded and unflooded) differed significantly. However, it is well-known that soil is the major source of bacterial endophytes (Hallmann et al., 1997) and their contribution to the endophytic community composition could lead to different results.

In particular, this issue is interesting to address in the Uruguayan rice system, where flooding is an ordinary agricultural practice and rice fields remain flooded from December (about forty days after seeding) until April (a few days before harvest). The aim of this work was to study the effect of flooding on abundance, diversity and community composition of diazotrophic endophytes from rice tissues under standard cultivation conditions by using the *nifH* as functional gene marker.

Materials and Methods

Greenhouse Experiment and Sampling

The greenhouse used was located at the National Agricultural Research Institute (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad Paso de la Laguna) in Treinta y Tres southeast Uruguay (32°55'S and 54°50'W). The soil used presented the following characteristics: silty loam in texture, pH 5.2, N-NH₄⁺ 0.3 mmol L⁻¹, 3.0% organic C and 5.0% organic matter.

O. sativa, type Indica, variety INIA Olimar, obtained from local crossing (inbred variety released in 2002) was selected for the experiment. The experiment was set out as a completely randomized design with four replicated plots (approximately 0,15m² each one containing 52kg of soil) on March 25th, 2009.

Standard conditions were used for rice cultivation; fertilization was applied at seeding consisting of NPK 120kg. ha⁻¹ (18-46-0, corresponding to 21kg of Nitrogen) and urea 50 kg. ha⁻¹ (corresponding to 23kg of nitrogen) 34 days after seeding (DAS).

Samples were collected at two different growth stages of rice plant which present different water regime. The first sampling (named BF) was performed before flooding, 34 DAS. After this sampling, the plots were flooded with tap water to reach a water column of approximately 7cm and kept flooded until the end of the experiment. The second sampling (named AF) was performed 76 DAS, 32 days after flooding (DAF). BF and AF are called as treatments in the following sections.

For each sampling date, five to ten rice plants were collected from five different points randomly distributed in each replicated plot and then they were pooled.

Surface disinfection of rice plants

Pooled leaves from the two sampling dates (about 7 and 9g for BF roots and leaves respectively; and 18 and 10g for AF roots and leaves, respectively) were disinfected after collecting. Leaves and roots were separated, brushed and washed with tap water and detergent. Distilled water was used for the last rinse.

One 100 mL wash was made with 2% sodium hypochlorite for 5 minutes with agitation, followed by four 200mL washes with sterilized distilled water (modified from Loaces et al., 2011). Disinfected rice plants were kept at -70°C for further analyses.

DNA extraction and *nifH* gene amplification

Total DNA was extracted from surface disinfected rice material. The frozen samples were pulverized in sterilized pre-cooled mortars with liquid nitrogen and transferred into sterilized 1.5 mL microtubes and kept at -70°C immediately. Disinfected pooled rice leaves or roots (3 g) were extracted according to Doyle & Doyle, 1987. Briefly, pulverized plant material was treated with CTAB buffer (100 mM Tris.HCl pH 8.0; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 0.2% mercaptoethanol) and then incubated at 65°C for 45 min. After chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v) extraction, DNA was precipitated by isopropanol addition. DNA was centrifuged for 10 min at 10000 rpm, resuspended in TE buffer, and subjected to RNAase treatment (10 µg mL⁻¹ final concentration). The purified DNA was resuspended in 75 microlitres milliQ water.

Extracted DNA from leaf and roots were used as templates for *nifH* gene amplification with primers (PolF and PolR) and PCR conditions according to those described by Poly et al. (2001a). All PCRs were carried out in 25 µL (total volume) mixtures containing approx. 100- 200 ng of total DNA, 0.1 mmol L⁻¹ of each primer, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂, Taq buffer, Bovine Serum Albumin 0.2 mg mL⁻¹ (Roche®) 0.2 mmol L⁻¹ of each dNTP and 1.2 U of Taq DNA polymerase (Fermentas®). The reactions were performed in a Gradient Palm Cyclyer (CORBETT Research, model CG1-96 thermocycler, Sidney) using the following program: initial denaturation step at 94°C for 4 min, followed by 30 cycles at 94°C for 60 s, 57°C for 60 s and 72°C for 60 s, with a final extension step at 72°C for 10 min.

Optimization of q-PCR for *nifH* gene and standard preparation

nifH PCR product from the strain *Methylogaea oryzae* (formerly methanotroph E10, EU672874), was obtained as explained above and then was cloned using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp.) following the protocol of the manufacturer. Clones were subjected to tooth pick PCR (10 clones), using primers T3-T7 provided with the cloning kit. The correct fragment length and the identity of the PCR product were verified by electrophoresis on 1.5% agarose followed by sequencing the amplicon obtained using primer T7 at Macrogen Sequencing Service, Korea. Plasmid extraction was performed using the kit Purelink Quick Plasmid miniPrep (Invitrogen ®) and the size of the plasmid fragment was verified by electrophoresis in 1.5% agarose.

PCR amplification was performed in triplicate from extracted plasmid (primers T3 and T7 provided). The PCR products were pooled and the amplicon size was verified by agarose electrophoresis followed by purification with MICROCON®100 columns and addition of sterile MilliQ water up to 90µL.

The purified product was quantified with Qubit dsDNA HS Assay kit in a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen ®) and the *nifH* copy number was calculated taking into account the total fragment length (partial *nifH* fragment plus cloning vector fragments flanking the insertion point), the molecular weight of amplicon and

the Avogadro's Constant. The *nifH* standard prepared was aliquoted by 2 μ L and frozen for being used as the standard for all q-PCR quantifications (3.38×10^{10} *nifH* copies. μ L⁻¹).

Abundance of *nifH* genes in roots and leaves of rice by q-PCR

The quantification of *nifH* gene was performed by Real Time PCR (q-PCR) using the primers PolF and PolR (Poly et al. 2001). All quantifications were carried out in a Rotor-Gene® 6000, model 5-Plex (CORBETT Research, Sidney) using Sybr Green I detection. Amplification was carried out in 10 μ L reaction volumes containing 1 μ L of concentrated or diluted (one or two 10-fold) template DNA, 1 micromolar of each primer, and 5 μ L Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany). All samples amplifications were performed by duplicate. A standard curve was carried out in each q-PCR run performing triplicates for each standard point (ten-fold dilutions from 10^{-5} to 10^{-10}). Triplicates of no template controls were included in each run. Thermal cycle consisted of an initial step at 95°C for 5 min followed by 40 cycles: 35°C 5sec; 60°C 10sec, according to manufacturer directions. Fluorescence signal was measured once per cycle after annealing- elongation step, by addition of one step at 82°C for 1s in order to avoid fluorescence contribution of primer dimers observed at 60°C in the melting curve. In order to verify the specificity of amplification, a melting curve was obtained, after each amplification increasing temperature from 60°C to 94°C at a rate of 1°C. s⁻¹. A specific product was considered to present a T_m between 85°C and 93°C. The specificity of the q-PCR products obtained for leaves and roots was verified by agarose 1.5% electrophoresis during the optimization. All reaction efficiencies obtained were between 85 and 92%. Duplicate results of q-PCR measurements were averaged and corrected by the dilution factor and the results were expressed per ng of total DNA extracted in order to compare values corresponding to roots and leaves since a different efficiency of DNA extraction (or DNA content) was observed from different plant tissues. Standard curve allowed to detect *nifH* copy numbers in a range between 4×10^0 and 4×10^8 copies of *nifH* per sample microliter. The detection limit was established at 5.3 *nifH* copies per 10ng of total DNA extracted from rice tissues. Additional information and supplementary figures could be found in Anexo II.

ANOVA was performed on data of *nifH* abundance previously log transformed to accomplish normal distribution of residues and homogeneity of variance. A comparison of means was carried out through the Tukey Test. All the analyses were performed with InfoStat/Profesional Version 2.0.

T-RFLP of *nifH* genes

The product of *nifH* gene amplification obtained from DNA extracted from leaves was not enough for performing T-RFLP. Thus, only T-RFLP analysis of the diazotrophic communities inhabiting rice roots was performed. Four biological replicates were analyzed for each water regime. The same primer set was employed except that the forward primer (PolF) was 5' labelled with 6- carboxyfluorescein. PCR reactions were carried out in 25 μ L (total volume) mixtures using the PCR conditions similar to the described above. Technical triplicates were performed and pooled after PCR amplification and labelled PCR products were

concentrated and desalted with MICROCON®100 columns (Amicon Inc., MA, USA). Approximately 300 ng of labelled PCR products were digested with *AluI* or *HaeIII* according to manufacturer (Fermentas®).

After enzyme inactivation by heating at 65°C, samples were desalted and concentrated with MICROCON®10. Samples were sent to MACROGEN Korea for GeneScan Service using the 500LIZ DNA fragment length standard for the assignment of the length of fluorescently labelled terminal restriction fragments (T-RFs). Raw data were analyzed by the PeakScanner® Software.

Terminal restriction fragment (T-RF) sizes between 45 and 364 bp with peak heights larger than 200 fluorescence units were considered for the analysis to obtain reproducible T-RF profiles.

The two data sets obtained (*nifH* fragments restricted with *HaeIII* or *AluI*) were subjected to standardization. Briefly, the total Intensity of Fluorescence present in each electropherogram was compared within each data set and T-RFLP data were standardized to the lowest quantity as was previously described (Dunbar et al., 2001). All profiles were aligned considering as different those T-RFs that presented a defined and separated peak differing by more than 1 bp. Relative abundance data of each fragment were used to perform UPGMA clustering analysis with the Morisita similarity index using the Past 1.42 software (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). This analysis included the two data sets (accounting for about 42 different T-RFs) for each replicated plot by sampling date. Shannon Diversity Index values ($H = -\sum_i \frac{(ni)}{n} \ln \frac{(ni)}{n}$) were calculated from the four replicates using the same software. ANOVA and the statistical comparison of diversity indexes was performed in InfoStat/Profesional Version 2.0.

Principal Component Analysis (PCA) from T-RFLP data was performed with InfoStat/ Profesional Version 2.0.

The identity of the dominant observed T-RFs was inferred by *in silico* analyses from *nifH* sequences of clones obtained in this work. Sequences were aligned by MEGA version 5 (Tamura et al. 2011), the forward primer and the target site of the enzyme employed (i.e. *AluI* or *HaeIII*) were located in sequence and the terminal fragment size was determined. Theoretical *HaeIII* restriction was selected for the identity assignment since it gave a better discrimination of different taxa.

Cloning and phylogenetic analysis of *nifH* genes

The *nifH* gene cloning was performed in Macrogen® Korea from PCR products obtained from pooled DNA retrieved from each of the replicates of each treatment (BF and AF roots) according to Macrogen's protocol (T-cloning vector). All sequencing reactions were carried out at Macrogen Sequencing Service, Korea using an ABI PRISM 3730XL capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Clones retrieved from BF and AF clone libraries were sequenced using the M13 vector primer (50 clones for BF and 150 clones for AF since rarefaction analyses showed that sampling's coverage were good enough for both libraries (ANEXO II).

Rarefaction analysis of the two libraries were performed using the free software Analytic Rarefaction 1.3 (<http://www.uga.edu/~strata/software/>), developed by Steven Holland.

Phylogenetic analysis of *nifH* gene, alignments and phylogenetic distance dendrograms were constructed using the neighbour-joining algorithm (Saitou & Nei, 1987) as implemented in MEGA version 5 (Tamura et al. 2011). Evolutionary distances were calculated using Jukes-Cantor method (Jukes & Cantor, 1969). Nucleotide phylogenetic analysis was performed.

Results

Abundance of *nifH* gene copies in leaves and roots of rice

The *nifH* copy numbers per ng of total DNA extracted determined from different plant tissues and treatments are summarized in Figure 2.1 (see also ANEXO II). The results show that copy numbers of *nifH* gene were higher in roots than in leaves (at least a hundred times). Flooding affected differentially the abundance of diazotrophic communities inhabiting rice roots and leaves. While *nifH* levels in rice roots increased almost one ten-fold after flooding, diazotrophic populations from rice leaves remained low and constant (consistent to the low amplification obtained for T-RFLP).

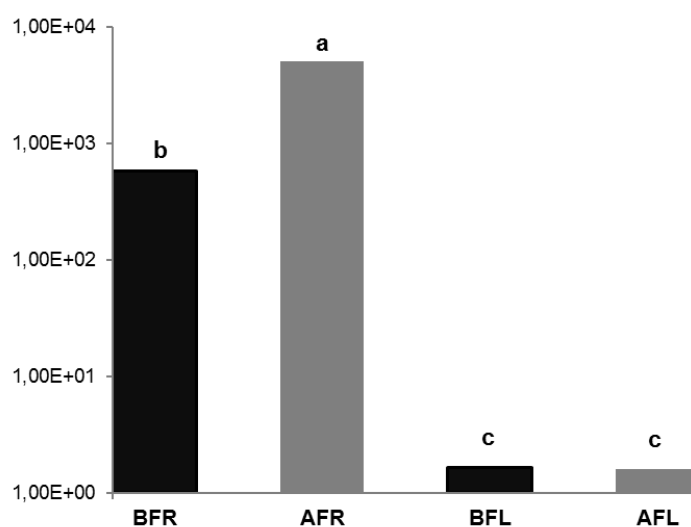


Figure 2.1 Abundance of *nifH* gene copies in leaves and roots of rice. Each bar corresponds to mean values from the four replicates. Different letters on bars mean significantly different values among *nifH* copies number expressed per ng of total DNA extracted. BFR: Before flooding roots; BFL: Before flooding leaves; AFR: After flooding roots; AFL: After flooding leaves.

Diversity of diazotrophic endophytic bacteria from rice roots

T-RFLP profiles obtained from rice roots with both restriction enzymes were quite diverse; 102 different T-RFs were observed (46 for *AluI* and 56 for *HaeIII*). Fifty percent of total T-RFs showed lower fluorescence intensities than 2% of the total signal. An average of 19 T-RFs was detected in each profile per sample/restriction enzyme.

Clustering Analysis, performed from composed data retrieved for both restriction enzymes, showed important differences among diazotrophic communities established in both treatments (45% similarity, Figure 2.3). It was also verified that the replicates grouped altogether. These results were supported by

the Principal Component Analysis (PCA) performed on T-RFLP data which is shown in Figure 2.4. Two distinct groups could be observed in PC1 where T-RFLP profiles were clustered by water regime. PC1 and PC2 explained 47% of observations' variability. Replicates from pre-flooding rice roots showed a greater dispersion than those obtained from flooded rice roots, which could also be observed in clustering analysis (about 50% similarity among replicates for BFR; Figure 2.3).

However, some common T-RFs were detected in all T-RFLP patterns from the two treatments analysed (Figure 2.2), being the main ones the corresponding to 45, 67, 99, 157 and 185 bp for *HaeIII* restriction (all of them were present at least in plants from three plots in each treatment). According to their *in silico* analyses of *nifH* sequences retrieved by cloning, the 45bp T-RF could correspond to organisms related to *Paenibacillus* spp. (BFR and AFR), and to *Halorhodospira halophila*, *Azospira oryzae* and *Ideonella dechloratans* (AFR). Terminal fragment of 67 bp was not retrieved from the *in silico* analyses of clones. Instead, a predicted T-RF close to 67 bp (70 bp) was detected in all replicates of AFR and in one replicate of BFR. The presence of this fragment could indicate that relatives of *Azospirillum brasilense*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Magnetospirillum magneticum*, *Pseudomonas* spp., *Dechloromonas* sp. are broadly distributed in rice roots under flooding conditions whereas *Stenotrophomonas* sp. and *Bradyrhizobium* sp. seem to be ubiquitous in rice roots at the early stages of rice growth, before flooding. The terminal fragment of 157 bp was also detected in both treatments. Some clones retrieved from flooded rice roots, for which the predicted T-RF was 158 bp, were related to *Ideonella dechloratans*, *Pleomorphomonas oryzae* and *Desulfovibrio* spp.. Additionally, clones retrieved from BF rice roots were close to *Sphingomonas azotifigens*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumonia* and *Bradyrhizobium* sp. (158-159bp). Since none of the predicted fragments obtained by *in silico* analysis of clones yielded a fragment of 99bp it was not possible to assign a known sequence to this widely distributed T-RF; this T-RF represented less than 0.25% of total fluorescence signal. The last common T-RF of 185 bp could correspond to *nifH* sequences related to *Azospirillum brasilense*, *Pelomonas saccharophila*, *Desulfovibrio* spp., *Azospira oryzae* (AFR); *Pleomorphomonas oryzae* (BFR and AFR); or *Ideonella dechloratans* (BFR).

In silico analysis from *AluI* patterns obtained, retrieved only two T-RF common to all samples, 100 and 361 bp (unrestricted fragment), confirming the presence of the species above described and allowing also the assignment of 361 bp to *Marichromatium purpuratum* (AFR).

A more conservative criterion was taken, considering only the T-RFs which presented a Fluorescence Signal higher than 2% of total Fluorescence and performing again PCA analyses and Biplot Graphic (Figure 2.5). The new PCA analysis accomplished to explain a lower proportion of variability (22% and 19% to PC1 and PC2, respectively). These analyses allowed to compare diazotrophic communities in order to detect the major T-RFs involved in discrimination among the different samples. The variation was mainly caused by changes in the relative abundance of T-RFs indicated in the Biplot Graphic (Figure 2.5). Each arrow represents a T-RF and when the treatments are plotted in the same direction that a T-RF, the former could have relatively high values for that T-RF and low values to T-RFs which are plotted in the opposite direction (InfoStat 2002). When the lengths of the vectors are similar, the graph suggests similar contributions of each T-RF in the representation made. PC1 was the ordinate axis where a clear discrimination was observed among different treatments. According to the results obtained, the T-RFs 56,

59, 99, 164 bp from *HaeIII* restriction and 361 bp T-RF from *AluI* restriction were the most relevant peaks involved in clustering samples from roots before flooding altogether. Whereas the T-RFs of 70 bp (*HaeIII*), and 63, 127 and 214 bp (*AluI*) were the main involved in clustering samples from the flooding stage.

Surprisingly, T-RFs 56, 59 and 99, 164 bp (*HaeIII*) could not be assigned from in silico analyses from clone libraries. They could correspond to novel species or species present in low proportion (less than 2%) and not detected in the clone libraries constructed. However 361 bp (*AluI*), the unrestricted gene fragment, is the principal variable on grouping samples before flooding. This T-RF could be assigned to several species, as was mentioned above, among which *Stenotrophomonas* spp. represent a relevant species in the diazotrophic community of pre flooding stage, as will be explained in the next section. Some clones affiliated to this species presented a T-RF of 13bp with the *HaeIII* restriction enzyme, and could not be detected because is out of the range size established.

The T-RF of 70 bp (*HaeIII*) was already explained. The T-RFs obtained with *AluI* that clustered the endophytes in flooded plants could correspond to *Spirochaeta zuelzeri* (216 bp predicted T-RF), and *Paenibacillus graminis* (detected only in the clone library of rice roots before flooding, with a predicted T-RF of 66 bp). The 127 bp T-RF (*AluI*) could not be assigned.

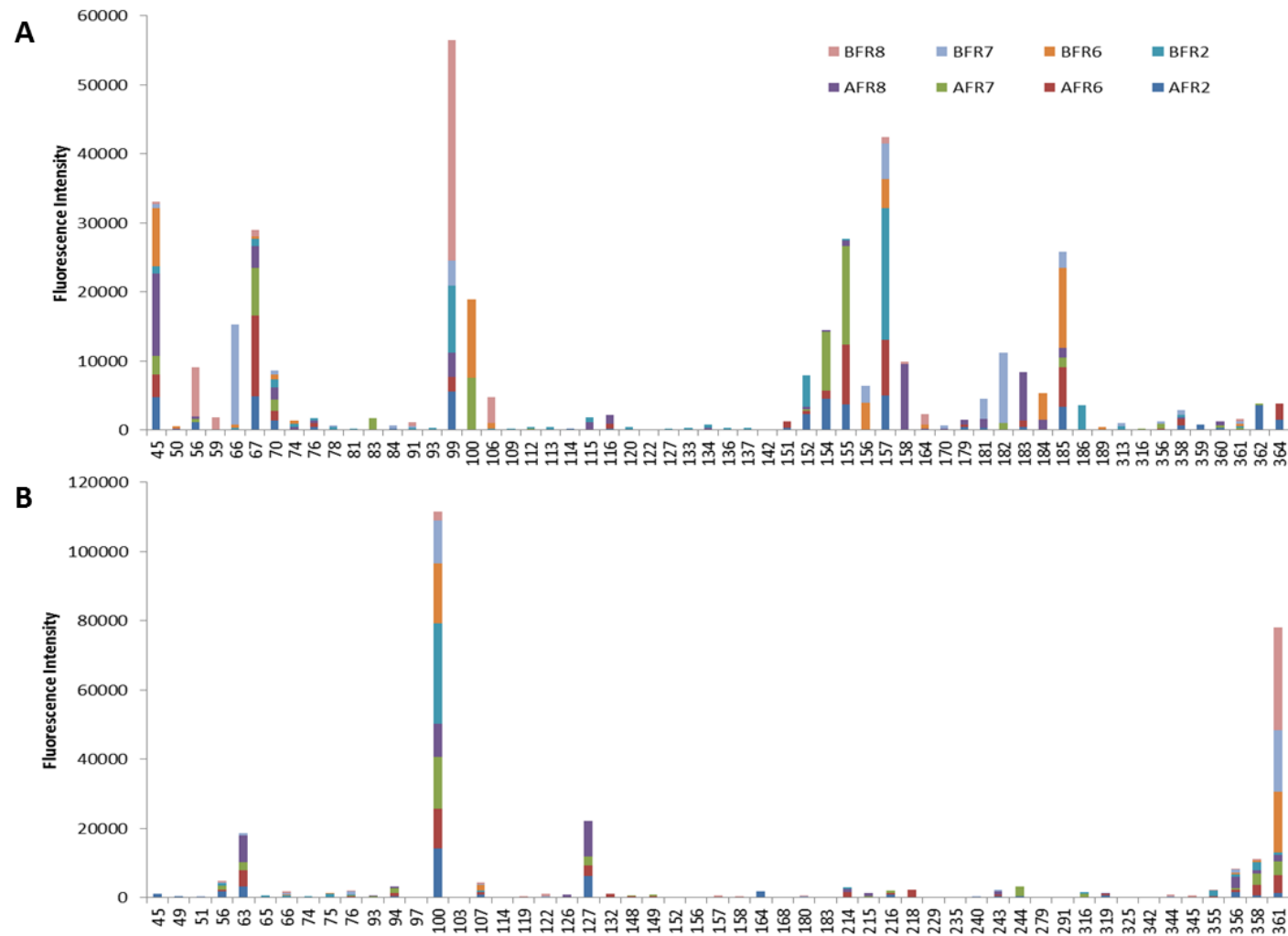


Figure 2.2 Composed and accumulative profiles of *nifH* T-RFLP from rice roots before (BFR) and after (AFR) flooding. The patterns were obtained with standardized data. A: *Haell* T-RFLP pattern; B: *Alul* T-RFLP pattern. Different colours represent different replicates from each water regime. The ordination axis represented T-RF size obtained (bp).

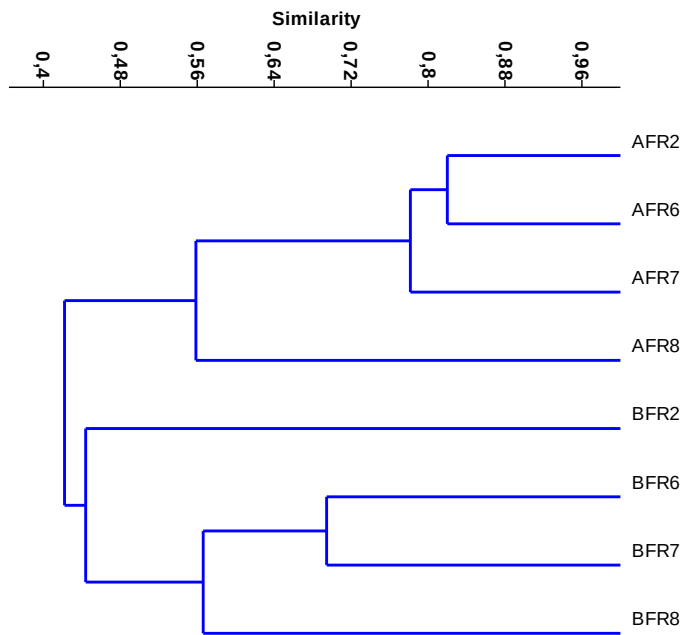


Figure 2.3 Clustering Analysis for *nifH* T-RFLP profiles including the two data sets (*AluI* and *HaeIII* restriction data). Similarity is expressed according to Morisita Index. AFR: After Flooding Rice Roots; BFR: Before Flooding Rice Roots. Different numbers indicate different replicates.

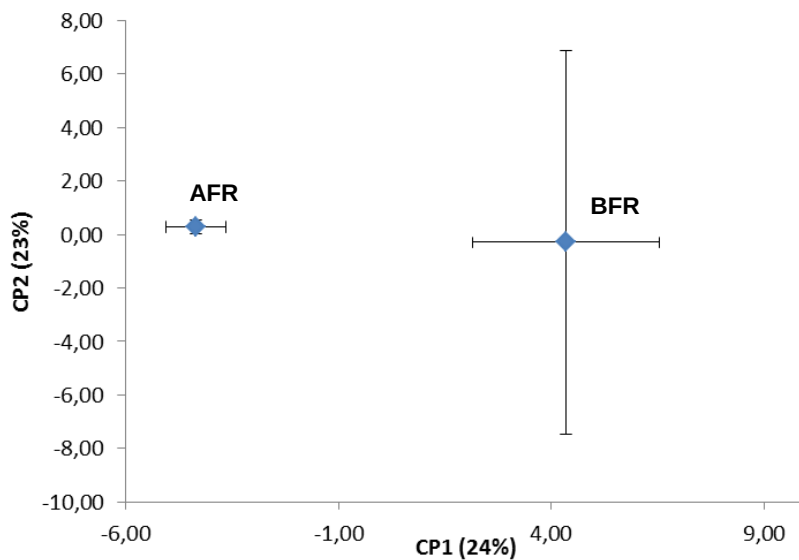


Figure 2.4 Principal Component Analysis of *nifH* T-RFLP profiles. The proportions of variation explained by first and second ordination axis are indicated in brackets. Mean values of four replicates and standard deviations are shown for each condition. BFR: before flooding root. AFR: after flooding roots.

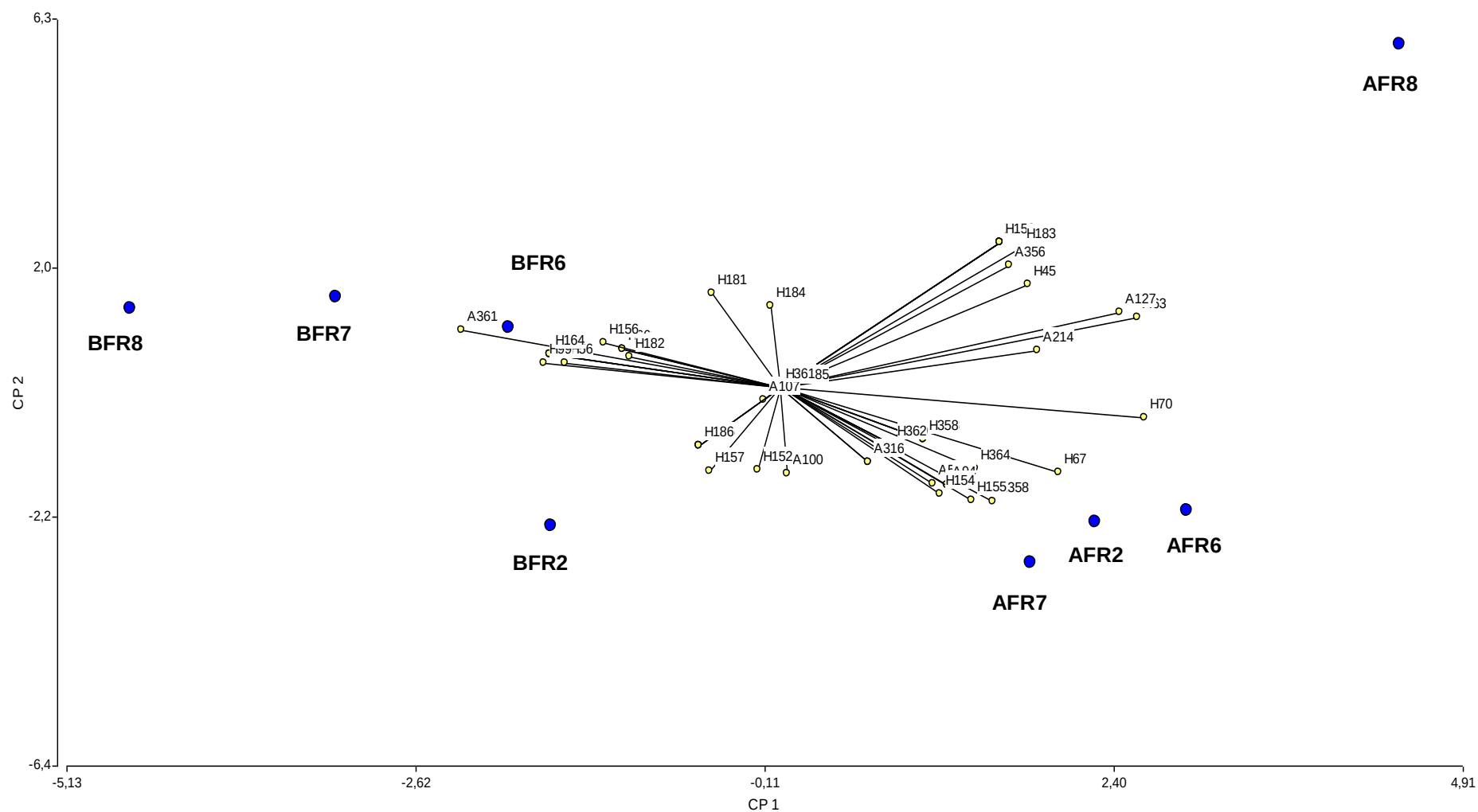


Figure 2.5 Biplot graphic where relevant T-RFs involved in samples differentiation are indicated. H: T-RF obtained by *Hae*III restriction; A: T-RF obtained by *Alu*I restriction. This plot was constructed from T-RFLP data representing more than 2% of total Fluorescence Intensity. Arrows mean T-RF and the influence of this fragment on sample clustering.

Shannon Index values were obtained for each biological replicate from each treatment. ANOVA and the comparison of means (Tukey's Test) showed that rice roots after flooding sustained a more diverse diazotrophic community of endophytes than the rice roots before flooding (Table 2.1).

Sample	N	Shannon Index (Mean)	Standard Deviation (SD)
BFR	4	2.28 ^A	0.27
AFR	4	2.97 ^B	0.16

Table 2.1 Shannon Index calculated from T-RFLP analysis. ANOVA and Tukey Test ($\alpha=0.05$) showed significant differences in Diversity present in AFR (After Flooding Roots) and BFR (Before Flooding Roots) (p-value 0.0048).

Phylogenetic analysis of *nifH* genes

The cloning of *nifH* gene pool present in the inner tissues of rice roots from two different water regimes was performed. Fifty clones from *nifH* library of before flooding rice roots and a hundred clones from flooded rice roots were sequenced and analysed. Rarefaction analyses provided useful information for verifying an adequate sampling coverage of *nifH* gene libraries (see ANEXO III).

The results obtained showed that *nifH* gene libraries composition from the two water regimes is extremely different (Figure 2.6). The clone library from pre- flooding rice roots (BF) is dominated by *Gammaproteobacteria* (66%) being *Stenotrophomonas* the main genus accounting for 50% of clone library. *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* were present at 16 and 14%, respectively, being *Bradyrhizobium* sp. and *Pleomorphomonas oryzae*, and the poorly affiliated *Ideonella*- like sequences the more abundant. *Firmicutes* (4%) were also represented in this pre- flooded condition with *Paenibacillus* sp. as the only one representative.

Conversely, a completely different scene is observed in the clone library from flooded rice roots. This clone library is much more diverse and different from that obtained from root tissues before flooding. *Alpha*, *beta* and *gammaproteobacteria* accounted for 18, 34, and 2%, respectively. *Gammaproteobacteria*, particularly *Stenotrophomonas* spp, diminished to 1% after flooding. *Alphaproteobacteria* keep being an important and stable part of the community. Although betaproteobacterial *nifH* sequences were present in roots at early stages of unflooded rice, after flooding they double in size, being this rise mainly due to the detection of new *nifH* sequences as *Dechloromonas*- like and *Azospira oryzae*- related *nifH* sequences. In addition, *Deltaproteobacteria*, *Spirochaetas* and *Chlorobi* (4, 9 and 8% of clone library, respectively) were detected only in flooded conditions. Besides, *Paenibacillus* and other *Firmicutes* were found in both water

regimes. Within this phylum, sequences poorly affiliated to *Heliobacterium* – like and *Dehalobacter* and *Syntrophobotulus*- like were encountered.

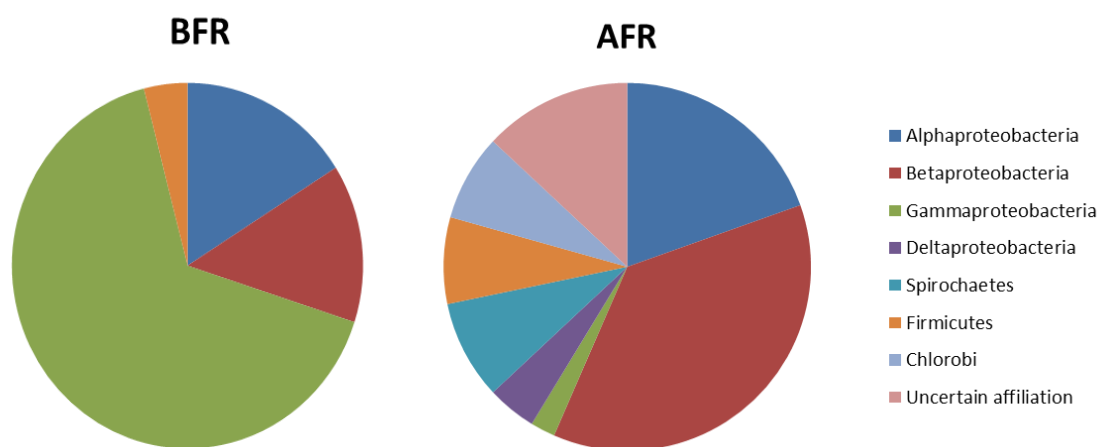


Figure 2.6 Diazotrophic composition of rice roots according to *nifH* gene sequences. BFR: before flooding roots; AFR: After flooding roots

Phylogenetic analysis was performed from *nifH* sequences (Figure 2.7). The criterion for determining the phylogenetic affiliation of *nifH* sequences retrieved was selected according to the distance matrix obtained (cutoff of 92% similarity).

One of the main clusters detected (G1) is divided into two defined groups G1a and G1b. The group G1a comprises alpha and beta proteobacterial *nifH* sequences interspersed and clustered into minor groups from one and other classes (Figure 2.7a).

Within the G1a group, it is worthy to be noted that some clusters were composed exclusively for *nifH* sequences from one water regimes. *Azospira oryzae*, *Pelomonas saccharophila*, and *Methylosinus* sp. (*Alphaproteobacteria*) were only detected in rice roots after flooding. Similarly, the cluster composed by *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter* and *Magnetospirillum* species (*Alphaproteobacteria*) was exclusively found in irrigated stage. Conversely, *nifH* sequences related to *Pleomorphomonas oryzae* and the *Azorhizobium*- *Bradyrhizobium* cluster (*Alphaproteobacteria*) were present at both water regimes. *Sphingomonas azotifigens* sp. (*Betaproteobacteria*) was detected in low proportion in pre-flooding stages. Two clusters within this group could be loosely related to *nifH* sequences from described bacteria. One of them was comprised uniquely by *nifH* sequences of flooding rice roots (16 clones) which closest relative was an uncultured bacterium clone N5-R2 (AB184937). This clone was previously reported as endophytic associated to rice roots (unpublished, Elbeltagy & Ando 2005). The second cluster, composed by sequences from both water regimes, corresponded to *nifH* sequences distantly related to *Ideonella dechloratans* which clustered to the uncultured bacterium clone Pn5 (DQ304853) which was found associated to roots from a perennial grass of Thar Desert, India (Chowdhury et al. 2007).

Cluster G1b (Figure 2.7b) is composed by *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* Classes. *Betaproteobacterial nifH* sequences related to *Dechloromonas* sp. represented 16% of clone library from flooded rice roots. *Gammaproteobacteria*, which was found as the predominant class present in unflooded rice roots (represented by *Stenotrophomonas* sp. isolate gx-44, FJ822999) were grouped in G1b. Besides this species, enterobacterial *nifH* sequences were detected within this cluster exclusively in rice roots before flooding (16%) affiliated to *Enterobacter* sp. (JQ001785 and FJ593868). Similarly, gammaproteobacterial *Marichromatium/ Halorhodospira*- like sequence was detected in low proportion (1%).

Firmicutes are clustered in three different groups, G2, G4 and G5. Sequences affiliated to *Paenibacillus* spp. (G2) were detected in both *nifH* gene libraries. However, *Firmicutes* sequences affiliated to *Heliobacterium* spp. and *Dehalobacter/ Syntrophobotulus* (G4), were exclusively retrieved from flooded stage.

An important cluster is G5 (Figure 2.7c), particularly for AFR, that comprises *nifH* sequences affiliated to *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Chlorobi* and *Deltaproteobacteria*, being the dominant species related to *Selenomonas rumiantium* (AP012292), *Spirochaeta zuelzeriae* and *Treponema azotonutricium* (AF325795 and CP001841), *Chlorobium tepidum* (AE006470) and *Desulfovibrio* spp. (AP010904 and CP002298), respectively. This cluster, as well as *Geobacter*- like cluster (*Deltaproteobacteria*, G3), were entirely composed by sequences retrieved from flooded rice roots.

A more distantly and poorly affiliated cluster, G6, included sequences related to *Archaea*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* as well as a sub cluster where a few clones retrieved from flooded rice roots is separately grouped. Sequences of uncultured clones (AY768661 and AY181002) retrieved from *Oryza longistaminata* tissues from mRNA- based studies, clustered altogether with these sequences.

Figure 2.7 Neighbor-joining phylogenetic tree of partial *nifH* sequences retrieved from rice roots before and after flooding. Black triangles correspond to *nifH* gene clones retrieved from before flooding rice roots (BFR) and grey circles from after flooding rice roots (AFR). When more than one clone was observed (at least 92% similarity among sequences), the number was included within parenthesis following the clone designations. Bootstrap values $\geq 50\%$ (500 data re-samplings) are given. The bar represents 5% divergence.

Figure 2.7b

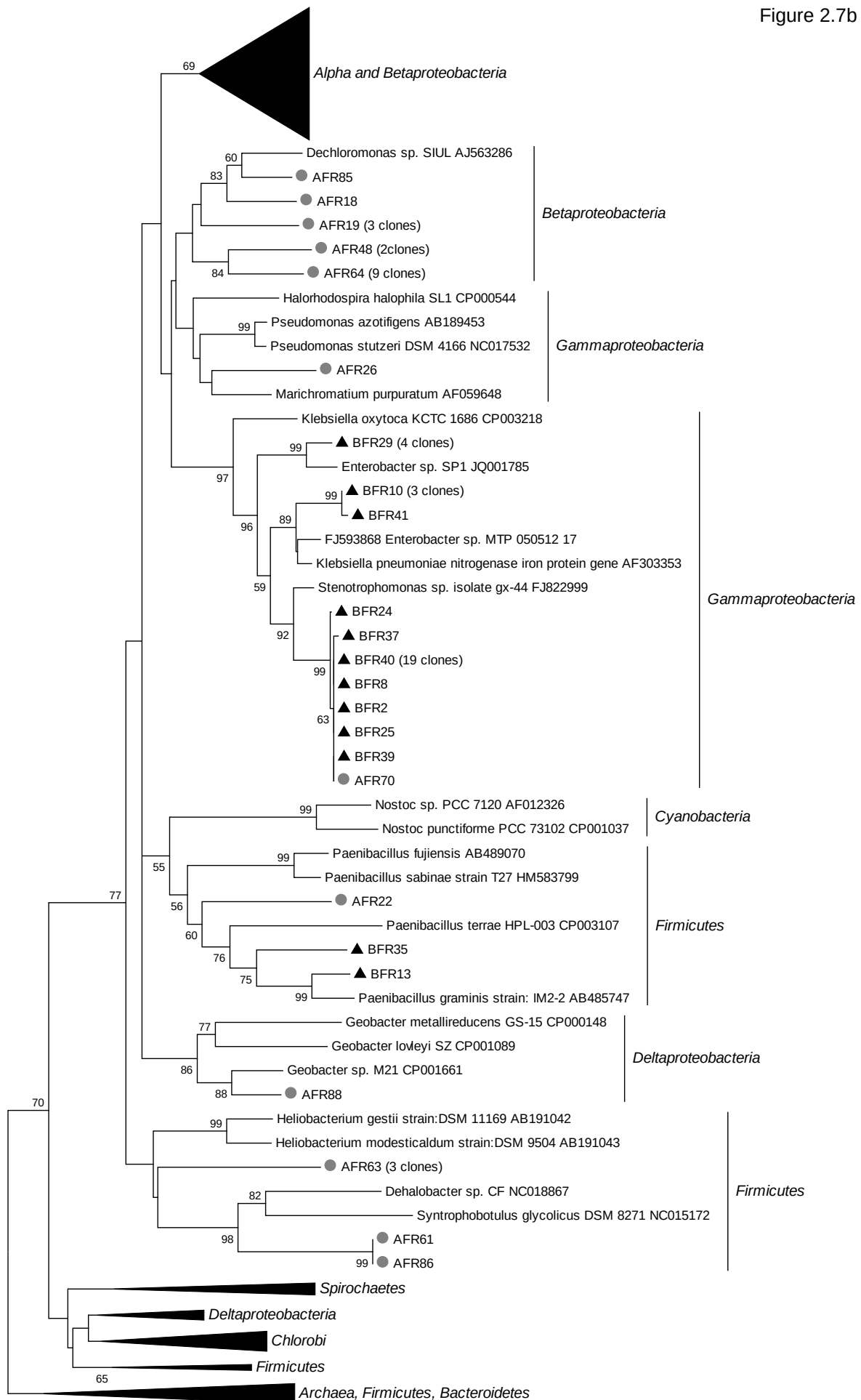
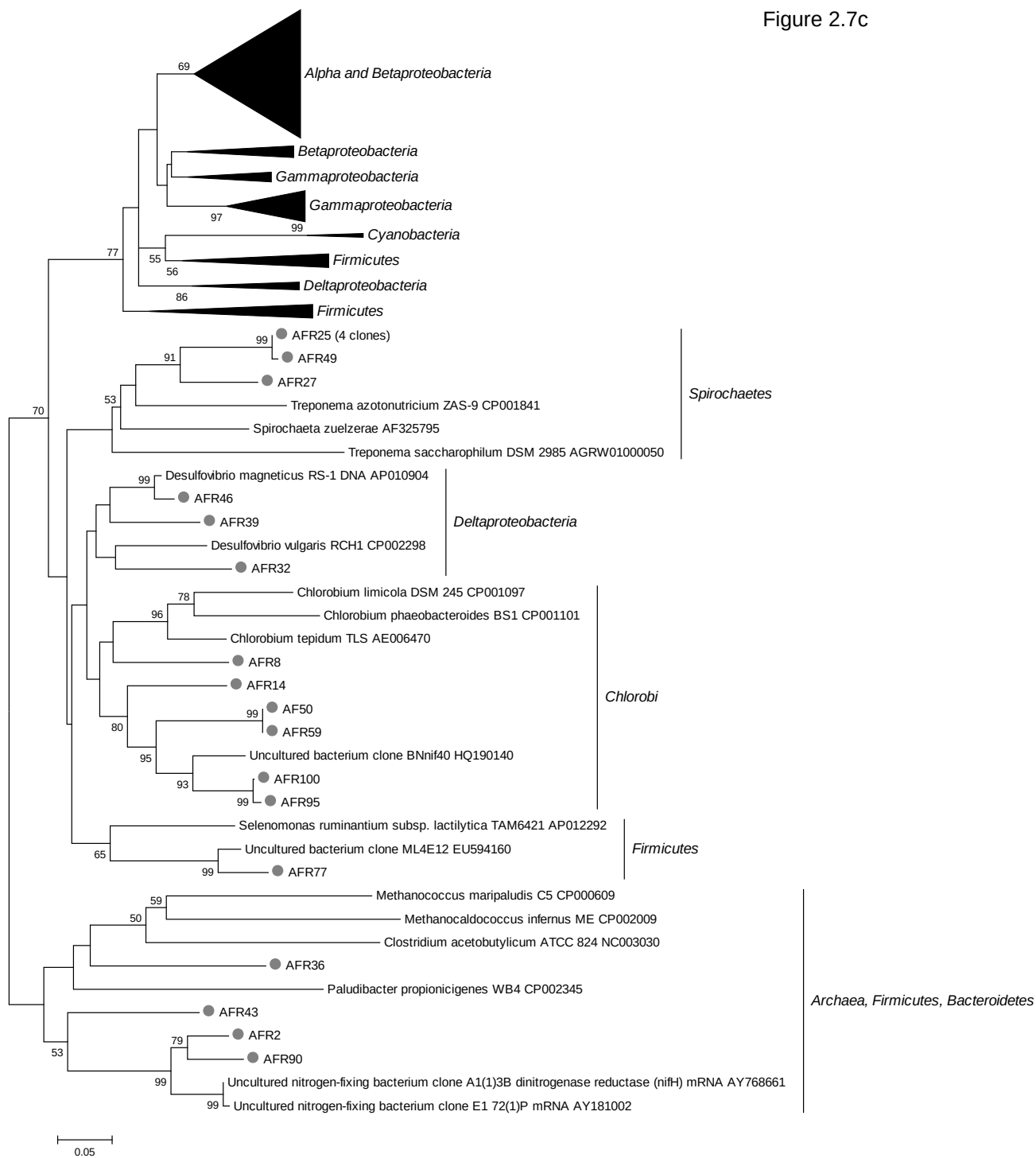


Figure 2.7c



Discussion

Some methodological aspects regarding the present work must be pointed out. Recently, Gaby and Buckley (2012) published a very useful evaluation of the different primer sets available for performing ecological and molecular studies based on *nifH* gene of diverse environmental and isolates sequences. These authors tested in silico and empirically different universal primer sets concluding that only 7 of 42 primer sets assayed hit >90% of available *nifH* sequences in the database. Within these seven primer sets, only three were also satisfactory in empirical tests. Primer combination IGK3/DVV (Ando et al. 2005) gave the best results, amplifying *nifH* gene fragments not only from different phylogenetic groups but also from environmental samples, especially from soil. According to these authors, the primer set employed in this study (PolF/PolR, designed by Poly et al. 2001a) do not present a good coverage of the *nifH* database, mainly in hitting sequences from *Cyanobacteria*, *Epsilon-proteobacteria*, Clusters III (anaerobes) and IV (paralogues of *nifH* gene) and from environmental sequences from microbial mats and marine samples. However, empirical tests have not been performed for them. Different reaction conditions and annealing temperatures could have important effects on the primer specificity and the spectrum of sequences retrieved. Thus, the presence or abundance of *nifH* sequences affiliated to any of the mentioned groups could be underestimated. However, the present study allows to compare the community composition of endophytic nitrogen fixers from BF and AF rice roots since the same methodologies were applied.

Regarding the abundance of *nifH* genes measured by q-PCR in pre- flooding and flooding stages, significant differences were found. The *nifH* copy numbers present in rice roots increased one ten-fold after flooding (from 5.8×10^2 to 5.1×10^3 *nifH* copies per ng of DNA; Figure 1, and ANEXO II). Conversely, *nifH* gene levels from rice leaves remained unaffected by flooding, being their values at least two ten-fold lower than those present in roots (about 1.6×10^0 *nifH* copies per ng DNA; Figure 1, and ANEXO II). Two different behaviours were observed in the diazotrophic communities analysed depending on the plant tissue studied (leaves and roots). Diazotrophs living inside rice leaves seems to comprise a much more numerically stable community, less affected by external factors than roots. Many other factors could be influencing the abundance of these communities, i.e. physiological changes suffered by rice plants throughout growth cycle, rice variety, plant genotype, light cycle, etc. In contrast, endophytic diazotrophs from roots could be more dependent on soil characteristics and environmental conditions (type of soil, organic matter content, nitrogen input, oxic/anoxic conditions, etc.).

The differences observed by the quantitative analyses performed (*nifH* q-PCR) between the two conditions studied were confirmed by the qualitative analyses carried out on roots' communities (*nifH* T-RFLP profile and cloning and sequence analysis). Diazotrophic communities inhabiting rice roots seem to be significantly affected by flooding; although it must be taken into account that rice plants presented different physiological stages at the two sampling dates (i.e. 34 and 76 DAS). Besides the differences in *nifH* abundance, dramatic changes in diversity and community composition were observed. The results obtained from T-RFLP analyses were consistent with the results obtained by cloning, both techniques showed a clear discrimination between the two water regimes analysed. Flooding rice roots sustained a more diverse endophytic community of diazotrophs than rice roots before flooding (Table 2.1). Not only

the Clustering Analysis (Figure 2.3) and Principal Component Analysis (Figure 2.4) performed on T-RFLP data but also the composition of the constructed *nifH* gene pool libraries (Figure 2.6) revealed the great impact of flooding on these bacterial communities. According to PCA, biological replicates from rice roots of each treatment presented different behaviours. While replicates from irrigated stage were quite similar among them, the standard deviation of principal component analysis from rice roots before flooding was quite big (Figure 2.4). However, the replicates from BF roots were still clustered together and were more similar among them than to diazotrophs of flooded roots. These findings suggest that flooding equates or erases small differences observed in diazotrophic communities established in rice roots from pre-flooding stages of rice growth. The presence of water could blur the micro niches present in the stage previous to flooding.

Rice roots from both water regimes sustained very different diazotrophic composition. An absolute dominance of gammaproteobacterial sequences (66%) in BF rice roots was surprisingly retrieved. Only one species, *Stenotrophomonas* sp. isolate gx-44 (FJ822999), accounted for 50% of clone library. Conversely, only 1% of the clone library from flooded rice roots was affiliated to this species. According to the GeneBank submission information, *Stenotrophomonas* sp. (isolate gx-44) was found associated to sugarcane tissues from China. Bacteria belonging to *Stenotrophomonas* genus are strictly aerobic, very versatile and adaptable to different environments and they have been found to present many different capabilities, among which are several plant growth promoting and biotechnological properties, as it is nicely summarized in Ryan et al. 2009. *S. maltophilia* and *S. rhizophila*, have been found associated with plants, inhabiting the rhizosphere or vascular tissues of roots and stems. *S. maltophilia* has been isolated from the roots of many plants including rice. Besides their beneficial properties, it presents a high level of intrinsic resistance to heavy metals and antibiotics, being also an opportunistic human pathogen (Ryan et al. 2009). Bacterial strains related to *S. maltophilia* were retrieved by isolation from rice seeds of two consecutive generations (Hardoim et al. 2012), suggesting that this genus is strongly associated to rice plant. Moreover, the authors suggested that *Stenotrophomonas maltophilia* is highly adapted to niches within the rice plant and that both dissemination and colonization are two main strategies used in response to ecological opportunities. In addition, it was recently described the first endophytic *Stenotrophomonas* species able to fix nitrogen in sugarcane, *Stenotrophomonas pavanii* (Ramos et al. 2011). Thus, the role of *Stenotrophomonas* strains retrieved in this work from rice inner tissues could probably be related to their beneficial properties to plant growth.

Alpha and betaproteobacterial *nifH* sequences were also abundantly recovered from not irrigated rice roots, being *Azorhizobium*/ *Bradyrhizobium*- like sequences and *Pleomorphomonas oryzae* (*Alphaproteobacteria*) and *Ideonella dechloratans* like sequences (*Betaproteobacteria*) the main representatives of them.

On the other hand, these results are significantly different from the obtained from irrigated rice roots. Bacteria belonging to the *Betaproteobacteria* class were dominant accounting for 36% of *nifH* clone library. Within this group, the dominant *nifH* sequences were related to *Dechloromonas* sp. SIUL (16%) followed by *Ideonella dechloratans* (9%) and *Azospira oryzae* (8%). Our results agreed with those reported by Wu et al. (2009) who also observed that *Betaproteobacteria* (mainly *Azoarcus* spp.) dominated the *nifH* genes

pool associated with (not exclusively endophytic) irrigated roots of modern rice cultivars. According to our results, the rise on betaproteobacterial *nifH* sequences retrieval is mainly due to bacteria *Dechloromonas* spp., *Ideonella dechloratans* and *Azospira oryzae*. This issue should be further investigated. These bacteria are facultative anaerobes or microaerophilic, known by the reduction of chlorate or perchlorate processes. *Dechloromonas* reduces also nitrate and nitrite. Species of this genus were detected as active and dominant in association to rice roots by 16S rRNA gene- based studies performed from ribosomal cDNA when nitrate is externally supplied to excised rice roots incubated in anoxic conditions according to Scheid et al. (2004). Recently, metagenomic analyses performed to elucidate the functional characteristics of an endophytic bacterial community resident inside rice roots (Sessitsch et al. 2012), revealed that endophytes might be involved in the entire nitrogen cycle, as protein domains involved in nitrogen fixation, denitrification and nitrification were detected and selected genes expressed. Thus, denitrification might be carried out by these bacteria in this ecosystem. Also, Roesch et al. (2008) reported the presence of *nifH* sequences belonging to this genus exclusively in maize roots, when the biodiversity of diazotrophs from maize ecosystem (rhizosphere, roots and stems) was addressed. The nitrate produced by ammonia oxidation in rice rhizosphere (Wind and Conrad, 1997) after flooding could diffuse inside roots and become available to endophytic nitrate reducers as *Dechloromonas*, allowing its multiplication and dominance inside flooded rice roots. Additionally, thirteen percent of clone library corresponded to *nifH* sequences distantly related to any *nifH* sequences from isolated strains. They could belong to novel diazotrophs not recovered by culture yet.

Noticeably, a wide metabolic variety of anaerobic nitrogen- fixing bacteria were abundantly retrieved from flooded rice roots; these sequences represented 26% of AFR clone library. Sequences belonging to *Spirochaetes*, *Chlorobi* (green sulphur bacteria *Chlorobium* spp.), *Deltaproteobacteria* (*Desulfovibrio* spp. and *Geobacter* spp.) and diverse *Firmicutes* members i.e. *Selenomonas* sp. and sequences related to anoxygenic phototrophic *Heliobacterium* and to *Dehalobacter*- like sequences (that uses trichloroethene as electron acceptor for anaerobic respiration), were found under flooded conditions. Also a sequence related to *Paludibacter propionicigenes*, a propionate- producing bacteroidete which was previously isolated from rice plant residues from an irrigated paddy field in Japan (Ueki et al. 2006) was detected. These findings suggest anaerobes could be playing a major role in nitrogen fixation in this ecosystem when anaerobic conditions are installed. Obligate anaerobes (grouped in Cluster III) have been reported to present the greatest diversity of all *nifH* lineages but it is also the group for which diversity is the least sampled in the studied performed so far (Gaby and Buckley, 2011). To our knowledge, this is the first report on the effect of flooding on endophytic communities from plants grown on soils in growing conditions similar to those in real paddy fields.

Hardoim et al. (2012) performed greenhouse experiments growing rice plants on two different type gamma- sterilized soils, with two different water regimes (flooded and unflooded). Shoot and root tissues, besides bulk and rhizospheric soil, were studied reporting that endophytic community of rice seems to be largely influenced by soil type followed by water regime. Graff and Conrad (2005) reported the impact of flooding on rhizosphere and rhizoplane bacterial communities associated to poplar trees. Also, a study was performed about the dynamics of diazotrophs from Uruguayan rice soils throughout rice cycle (Paolino and Fernández, 2006). The authors found that *Geobacter* spp and *Clostridium* spp were the

dominant *nifH* sequences retrieved by cloning (using primers designed by Zehr & McReynolds, 1989) from flooded rice soils. In addition, nitrogen-fixing activity, determined by acetylene reduction assay in different incubation conditions, revealed that anoxygenic phototrophs are major contributors to nitrogen fixation in the paddy fields ecosystem when a carbon source was supplemented. Thus, new efforts should be focused on addressing the dynamic and relevance of nitrogen fixing anaerobes, particularly in rice ecosystems, as well as on improving isolation media and incubation conditions to recover a broader range of diazotrophs. Moreover, exploring the impact of an external factor as flooding on native endophytic communities established inside rice tissues could certainly contribute to improve inoculants which must face different community structures throughout rice cycle.

For a better understanding on this subject, further studies must be performed on elucidating which are the truly active members of diazotrophic communities established in the first stages of rice growth and which become active when anaerobic conditions caused by flooding are installed (See ANEXO II).

In conclusion, this work contributed to assess the impact of flooding on diazotrophic endophytic bacteria inhabiting rice roots and leaves. A significant shift in the community structure was produced when rice fields were flooded. Diversity, composition and abundance of *nifH* sequences retrieved are deeply affected. The metabolic profile of the community of diazotrophic endophytes changed from being dominated by *Stenotrophomonas* (*Gammaproteobacteria*) to be dominated by bacteria able to grow and live under anoxic conditions, i.e. anaerobes (strict and facultative) and fermentative bacteria. Physiological changes suffered by rice as the plant grows could contribute to these major changes at the endophytic community level. This issue should be further explored, but the change observed in the physiological profile of bacterial communities towards anaerobic capabilities, in agreement with the change in environmental conditions, supports the conclusions made. In addition, despite the well-known strong interaction established among rice plant and the endophytes, according to our results, the endophytic diazotrophic community is really impacted by major external environmental factor as is the flooding.

Acknowledgements

We are very grateful to ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) and CSIC (Comisión Sectorial para la Investigación Científica) who provided a PhD scholarship to L. Ferrando and to ANII for supporting this work. We also want to thank Mariana Barraco and Analía Sanabria for the technical advice on q-PCR optimization and INIA Treinta y Tres for their support and help in the greenhouse experiments.

Capítulo III

Efecto del tipo de suelo y de su uso previo sobre la abundancia de diazótrofes endófitas establecidas en hojas y raíces de arroz.

Autores: Ferrando, Lucía; Martínez, Andrea; Fernández Scavino, Ana.
Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química, Universidad de la
República. Gral. Flores 2124, Código Postal 11800. Montevideo, Uruguay

Palabras clave: diazótrofes endófitas, gen *nifH*, q-PCR, arroz, diferentes tipos de suelo

Contribución a este capítulo

Diseño del experimento.

Establecimiento del ensayo y seguimiento en conjunto con Gastón Raríz y Adalgisa Martínez.

Procesamiento de plantas, medidas de longitud y peso fresco de las plantas. Desinfección superficial de raíces y hojas.

Optimización de la extracción de ADN vegetal y de su cuantificación mediante kit fluorimétrico y de la cuantificación del pool de genes *nifH*, por q-PCR.

Entrenamiento de la pasante Andrea Martínez en las técnicas mencionadas.

Realización de parte de las cuantificaciones de *nifH* por q-PCR utilizando ADN vegetal y de suelos.

Realización de análisis y tratamiento estadístico de datos.

Procesamiento y análisis de resultados. Discusión y escritura del presente capítulo.

Resumen

La abundancia de genes *nifH* presentes en suelos agrícolas se ve afectada por diversos factores como el contenido de materia orgánica, el pH, la historia de uso del suelo así como las prácticas de manejo agrícola utilizadas, según revelan estudios realizados. Las bacterias endófitas provienen principalmente del suelo por lo que la existencia de diferencias importantes en su composición puede determinar y/o afectar a la flora microbiana establecida en los tejidos internos de las plantas.

En este trabajo se estudió el efecto del tipo de suelo y de su uso previo en la abundancia de genes *nifH*, determinada por q-PCR, en suelos y en tejidos internos (hojas y raíces) de plántulas de arroz cultivados en condiciones controladas. Además, se evaluaron parámetros de rendimiento vegetal de los plántulas al cabo de 25 días así como las propiedades fisicoquímicas de los suelos utilizados.

Los parámetros de rendimiento vegetal y de abundancia de genes *nifH* evaluados para las plántulas de arroz agruparon los tratamientos de igual forma que lo hicieron las propiedades fisicoquímicas evaluadas para los suelos utilizados, independientemente de la región de origen o su uso previo. Dos grupos fueron diferenciados, plántulas provenientes de suelos de alta fertilidad y plántulas provenientes de suelos de baja fértiles. Las variables correspondientes a la raíz (longitud, peso fresco y abundancia de genes *nifH*) fueron importantes en la discriminación.

Las hojas de arroz presentaron una abundancia de genes *nifH* 100 veces menores que las obtenidas para raíces y suelos. No se observaron diferencias significativas en la abundancia presente en hojas de plántulas provenientes de los distintos suelos utilizados indicando que estas poblaciones podrían ser numéricamente más estables e independientes de las propiedades del suelo. En cambio, el número de copias de *nifH* presente en raíces mostraron diferencias significativas, en particular el valor mas alto fue $5,06 \log_{10}$ copias de *nifH*.ng ADN⁻¹.

Los resultados obtenidos mostraron que mientras la abundancia de genes *nifH* en hojas y suelo de arroz no se vió afectada por el tipo de suelo utilizado y las características fisicoquímicas que presentan, en el caso de las raíces los resultados obtenidos fueron diferentes. Las raíces de arroz provenientes de suelos de alta fertilidad con historia previa de cultivo de arroz presentaron abundancias significativamente mayores que el resto de los tratamientos, incluso de suelos de alta fertilidad de características similares que no ha sido utilizado para el cultivo de arroz. Esto sugiere que la historia agrícola del suelo puede afectar, directa o indirectamente, a las poblaciones diazótrofes endófitas de raíz.

Introducción

La producción de arroz en Uruguay se realiza en tres zonas principales como puede observarse en la Figura 1. La zona este que involucra a los departamentos de Rocha, Treinta y Tres, Lavalleja y este de Cerro Largo, es la principal región arrocerá de acuerdo al área sembrada (50% del total) y a su nivel de producción, dado que presenta características favorables para el cultivo (planicies extensas y abundancia de fuentes de agua). La zona centro- oeste, representada por Tacuarembó y Rivera, norte de Durazno y oeste de Cerro Largo, y la zona norte siendo Artigas el departamento de esta región que presenta mayor área sembrada (www.aca.com.uy).

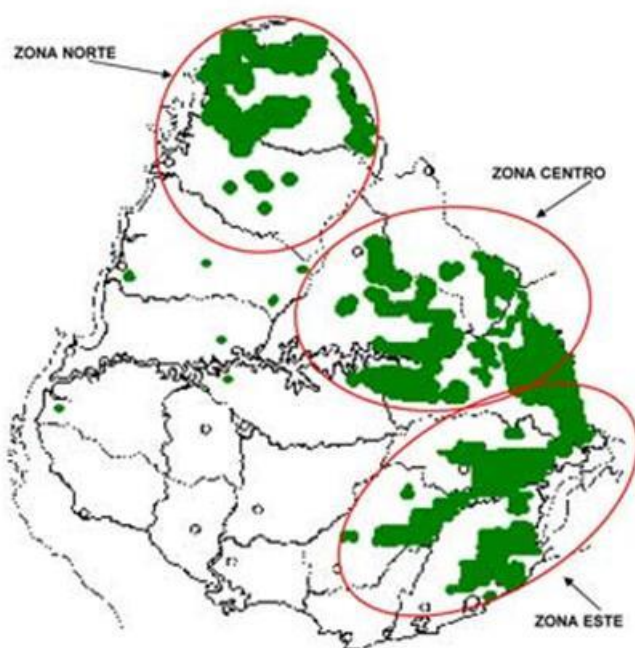


Figura3.1. Distribución de la producción arrocerá en Uruguay. Se indican en verde las zonas utilizadas para su cultivo. (Imagen obtenida de www.aca.com.uy)

El cultivo de arroz en Uruguay presenta rendimientos altos comparados con los obtenidos por otros países productores de arroz. En los últimos cinco años se han obtenido en promedio 8 toneladas arroz por hectárea, ubicando a nuestro país como el tercero en productividad a nivel mundial (Palmer, 2012). Se postula que estos altos rendimientos se deben, en parte, al sistema particular de cultivo empleado, en el que se realiza rotación con pasturas para alimentación animal o con otros cultivos y que difiere del utilizado por otros productores arroceros de clima templado.

Sin embargo, resulta sorprendente que estos altos rendimientos sean obtenidos con baja aplicación de fertilización nitrogenada. El nitrógeno es el nutriente más importante para el cultivo de arroz, y se encuentra en cantidades limitantes para su cultivo en casi cualquier suelo, a menos que se apliquen

fertilizantes nitrogenados (Yoshida, 1981). El gran aporte que realizan muchas de las bacterias endófitas a la promoción de crecimiento vegetal es bien conocido y se han llevado a cabo numerosos estudios al respecto (Olivares et al. 1996; Baldani et al. 1997; Peng et al., 2009). En particular, las endófitas fijadoras de nitrógeno, dado que contribuyen al aumento de los niveles de nitrógeno disponibles para los cultivos, presentan gran relevancia para la agricultura. Según Stoltzfus et al. (1997), en la agricultura tradicional la fijación biológica de nitrógeno puede aportar hasta 50kg de N por hectárea, obteniéndose un rendimiento de 4 toneladas de arroz. Estos rendimientos pueden aumentar hasta 8 toneladas por hectárea mediante empleo de técnicas de manejo agrícola más modernas pero aplicando niveles altos de fertilizante nitrogenado (100kg de N por hectárea) (Lafferty, 2011). En el caso uruguayo, los rendimientos del cultivo son cercanos a este último valor con mucho menos N agregado (aprox 70 kg de N por hectárea) (Blanco, 2003). Por este motivo resulta interesante profundizar en el rol que juegan las bacterias diazótrofes asociadas al arroz en la obtención de una alta productividad con baja aplicación de agroquímicos.

La interacción planta- bacteria diazótropa endófitas así como los efectos de la inoculación de los cultivos con bacterias que presentan ésta y otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal han sido de las principales temáticas abordadas en las áreas de la microbiología y biotecnología agrícolas (Lafferty, 2011, García de Salamone et al., 2012). En particular, muchos de estos trabajos han sido realizados en arroz (Prakamhang, 2009; Pains Rodríguez et al., 2008; Feng et al., 2006; You et al., 2005; Verma et al. 2004). Para lograr que los inoculantes utilizados establezcan una interacción duradera con la planta a lo largo del ciclo del cultivo, resulta importante conocer las comunidades endófitas nativas establecidas en los tejidos internos de los cultivos ya que éstas compiten directamente con los microorganismos inoculados y pueden participar activamente del éxito o del fracaso del tratamiento de inoculación. Todavía se conoce poco sobre los parámetros que controlan esta interacción constituida por el microorganismo inoculado, la planta y los microorganismos endófitos naturalmente asociados a ella.

El origen de las bacterias endófitas ha sido un tema controversial durante mucho tiempo. Actualmente, se conoce que la semilla es una fuente importante de bacterias endófitas, especialmente en las primeras etapas de crecimiento de la planta, ya que las bacterias presentes en las semillas están adaptadas a los tejidos vegetales y colonizan rápidamente los brotes de arroz, ambiente menos competitivo que la raíz donde existe estrecho contacto con la abundante comunidad bacteriana rizosférica (Hardoim et al. 2012). Asimismo, otros estudios han detectado especies bacterianas comunes en semillas y en tejidos maduros de la planta de arroz (Mano et al., 2007; Loaces et al., 2011; Ringelberg et al., 2012). Sin embargo, la principal fuente de bacterias endófitas es el suelo (Hallmann et al., 1997) a partir del cual sólo algunas bacterias pueden penetrar los tejidos de la raíz y dispersarse a través del xilema a otros tejidos vegetales. De esta forma se establece una comunidad de bacterias dentro de los tejidos vegetales diferente a las presentes en suelo y rizósfera. Esta característica se ha observado tanto para la abundancia de ciertos grupos fisiológicos (Loaces et al., 2011) como para la identidad de los principales grupos microbianos presentes (Gottel et al., 2011).

Existen diferentes factores tales como la variedad, el estado fisiológico de la planta y las condiciones de manejo del cultivo de arroz que pueden afectar a las comunidades de endófitas. Por ejemplo, se ha

observado que la composición de la comunidad de bacterias diazotrofas endófitas depende del cultivar en *O. sativa* (Knauth et al., 2005; Muthukumarasamy et al., 2007). Sin embargo poco se conoce sobre la influencia del suelo como determinante de la composición de la comunidad de bacterias endófitas en este cultivo. Hardoim et al. (2011) probaron mediante técnicas independientes del cultivo que la composición de la comunidad total de endófitas proveniente de la semilla, establecida en plantas de arroz jóvenes cultivadas en suelos de diferentes características esterilizados mediante radiación gamma, es distinta según el tipo de suelo. Mientras en suelos neutros se observó el predominio de las endófitas de semilla *Pseudomonas oryzae* y *Rhizobium radiobacter*, en suelos ácidos las especies de *Enterobacter* y *Dyella ginsengisoli* fueron las favorecidas, y *Stenotrophomonas maltophilia* fue ubicua en plantas provenientes de los dos suelos analizados.

Los suelos utilizados con fines agrícolas sufren cambios importantes a lo largo de los ciclos sucesivos de cultivos, que afectan en muchos casos la fertilidad y biodiversidad no sólo de los suelos sino de todo el ecosistema, especialmente cuando no se emplean prácticas amigables con el medio ambiente que fomenten la sustentabilidad del cultivo. Estos suelos pueden sufrir cambios tanto en estructura como en composición y también en los grupos bacterianos que conforman las comunidades bacterianas allí establecidas. Por tanto, la historia de uso de los suelos puede repercutir en las comunidades endófitas de plantas cultivadas en ellos.

La fijación de nitrógeno en suelos se ve afectada por distintos factores ambientales como la humedad, concentración de oxígeno, pH, cantidad y calidad de carbono disponible y la disponibilidad de nitrógeno (Hsu & Buckley, 2009). Asimismo, tanto la textura del suelo y el tamaño de los agregados (Poly et al., 2001b) como el contenido de arcilla (Roper & Smith, 1991) se ha visto que son factores influyentes.

La utilización de técnicas moleculares independientes del cultivo para el estudio de las comunidades de diazotrofas endófitas resulta fundamental para ampliar la diversidad bacteriana recuperada con las técnicas tradicionales de crecimiento, que históricamente se han enfocado en cultivar las bacterias diazotrofas microaerófilas. En particular, el recuento tradicional de endófitos fijadores de nitrógeno presenta un sesgo importante por los medios y condiciones de cultivo utilizados y subestima la población total de diazotrofos endófitos. Las técnicas moleculares, a pesar de su sesgo, realizan un aporte complementario y esencial para aproximarse a entender cuál es la composición cuali y cuantitativa de la comunidad total de bacterias. En el caso de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, el gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa, parte del complejo nitrogenasa (enzima responsable de este proceso) ha sido ampliamente utilizado como marcador funcional para el estudio de estas comunidades, a pesar de que la sola presencia de este gen no es concluyente respecto a su actividad.

La abundancia de genes *nifH* ha sido utilizada como uno de los marcadores del impacto de diferentes cultivos o de factores ambientales sobre comunidades microbianas de suelo. Por ejemplo, Mao et al. (2012) abordaron el impacto de cultivos utilizados como materia prima para procesos bioenergéticos sobre comunidades de bacterias y arqueas vinculadas al ciclo de nitrógeno en suelo. Estos autores reportaron que la abundancia de genes *nifH* fue significativamente mayor en suelos con gramíneas perennes que en suelos de maíz, resultando por ende más sustentable la utilización de las primeras para obtener bioenergía. Asimismo, Pereira e Silva et al. (2011), estudiaron las variaciones estacionales en la

diversidad y abundancia de diazótrofos provenientes de ocho suelos diferentes, encontrando que el tipo de suelos es el principal factor que influye a las comunidades fijadoras de nitrógeno. Los suelos arcillosos presentaron comunidades más abundantes y diversas que las de suelos arenosos, siendo además las primeras más sensibles a las fluctuaciones asociadas a la estación y las prácticas agrícolas utilizadas. El contenido de amonio, el pH y la textura del suelo mostraron una fuerte correlación con las variaciones observadas en la diversidad, tamaño y estructura de las comunidades diazótrofes. Orr et al. (2012) compararon el impacto del manejo orgánico y convencional de cultivos sobre la diversidad y actividad de diazótrofes libres en suelos agrícolas. Ellos encontraron que la abundancia de genes *nifH* se vio impactada negativamente por las prácticas convencionales utilizadas a lo largo de los tres años del ensayo de campo realizado, sugiriendo que los diazótrofos podrían ser especialmente susceptibles al uso de pesticidas. A pesar de esto, el impacto de las prácticas de manejo se vio opacado por la influencia de efectos temporales, obteniéndose comunidades diazótrofes cambiantes de año a año y de estación a estación.

Sin embargo, según sabemos, sólo Juraeva et al. 2006 analizaron la abundancia de genes *nifH* en tejidos internos vegetales. Estos autores determinaron la abundancia relativa de *nifH* en brotes y raíces de pepino así como el efecto del agregado de nitrógeno y de la edad de la planta sobre ella. Por esta razón resulta interesante abordar esta temática así como analizar la abundancia de las poblaciones diazótrofes establecidas en los tejidos de las plantas y los factores que la afectan. La utilización de herramientas moleculares permite determinar la disponibilidad potencial de bacterias diazótrofes presentes en suelo y en tejidos de la planta de arroz.

En el presente trabajo se utilizó la abundancia del pool de genes *nifH* como parámetro para comparar las comunidades diazótrofes endófitas de hojas y raíces de arroz crecidas suelos muestreados de siete zonas diferentes de nuestro país y además, se determinó la abundancia de secuencias *nifH* en los respectivos suelos. La hipótesis de trabajo es que el tipo de suelo y la historia agrícola que presentan determinan la concentración de bacterias diazótrofes del suelo y de la planta.

Materiales y Métodos

Muestreo y procesamiento de suelos

Se realizó el muestreo de suelos provenientes de diferentes zonas de nuestro país teniendo en cuenta tres factores: propiedades fisicoquímicas del suelo, ubicación geográfica y uso previo del suelo.

Se tomaron muestras de 8 suelos diferentes (teniendo en cuenta las distintas características resumidas en la Tabla 3.1) tomando al menos tres muestras integradas de cada tipo de suelo. Cada una de estas muestras integradas se conformó a partir de muestras de suelo proveniente de 6 puntos distribuidos al azar de 10cm² de superficie y 10 cm de profundidad.

Los suelos fueron secados a 30°C durante 4- 5 días para su conservación y posteriormente se inspeccionaron visualmente y se retiraron restos de material vegetal o de otro tipo de material extraño que pudieran contener (raíces, tallos, piedras, etc.).

Luego se realizó la homogeneización de al menos 3 kg de suelo mediante tamizaje de los mismos de forma consecutiva con mallas de 6 y 3 mm de lado.

Se tomaron muestras representativas de suelo para el análisis fisicoquímico (200g) y molecular (50g). Se almacenaron los suelos secos a temperatura ambiente.

Análisis fisicoquímico de los suelos

Se realizó el análisis fisicoquímico de una muestra de cada suelo en el Laboratorio del Sur S.R.L.: Carbono orgánico (C.O.) y Materia Orgánica (M.O.) según Walkley- Black, contenido de Nitrógeno por Kjeldhal, Fósforo (método del ácido cítrico, Murphy & Riley) y Potasio (en acetato de amonio 1N pH 7,0), así como la determinación de la textura del suelo (método Bouyoucos).

Adicionalmente, se determinó el pH de los suelos utilizados de acuerdo a Tan (2005), a posteriori de su uso en los ensayos. Para ello se utilizó una relación suelo: agua de 1:2, partiendo de 25g de suelo. Se agitaron las suspensiones durante 15 min y luego se determinó el pH mediante un pHímetro Cole-Parmer Chemcadet 5986-50 pH/ion/mV meter.

Ensayo de crecimiento de plantas en condiciones controladas

Se realizó un ensayo in vitro en fitotrón con condiciones de humedad (80%) y temperatura (25°C) controladas así como con ciclo programado de luz oscuridad (16hs luz/ 8hs oscuridad).

Para ello, se desinfectaron aproximadamente 100g de semillas de arroz variedad INIA El Paso 144 como se describe en el Capítulo II, hidratando previamente las semillas con cáscara en agua estéril durante 1 hora a temperatura ambiente. Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de petri estéril conteniendo gasa esterilizada humedecida con agua destilada estéril (aprox. 20 semillas por placa). Las placas se incubaron a 30°C en oscuridad durante 5 días para la germinación de las semillas, asegurando diariamente la humedad de las placas.

Transcurrido los 5 días de germinación, se descartaron aquellas semillas que no germinaron adecuadamente y se transfirieron las restantes a macetines (2 por cada macetín, Figuras 3.2A y 3.2B) para el experimento que se describe a continuación.

El diseño del ensayo fue completamente al azar (DCA), empleando 8 tratamientos con dos repeticiones cada uno. Cada tratamiento correspondió a un suelo diferente y cada unidad experimental consistió en 10 macetines de 4x4cm conteniendo aproximadamente 50g de suelo y 2 plantas de arroz cada una. Se realizó una aplicación basal convencional de fertilizante únicamente al momento de transferir los plantines a las macetas (20Kg N/ha (urea), 60Kg de P/ha (Na_2HPO_4) y 10Kg de K/ ha (KCl) disueltos en agua). Asimismo, se aplicó fungicida Conzerto® (Kresoxim-metil + Tebuconazol) en una concentración equivalente a 1L/ha de acuerdo a las indicaciones del producto. Se incubaron en fitotrón (Yiheng Technical CO., LTD., Blue pard) a 25°C y 80% de humedad y un fotoperíodo de 16hs de luz y 8 hs de oscuridad y se regaron las plantas diariamente.

Luego de 25 días de crecimiento se cosecharon las plantas correspondientes a 7 de los 8 tratamientos empleados ya que el tratamiento 1, correspondiente al suelo S1, se continuó incubando para evaluar la expresión de genes *nifH* en dos condiciones de manejo de agua (Ver Anexo I).

Se inspeccionó visualmente el estado general de las plantas (Figura 3.3). Se evaluó la producción de material vegetal mediante la determinación de la longitud, peso fresco y peso seco, tanto de la raíz como de la parte aérea de cada duplicado (unidad experimental de 20 plantas c/u, dos plantas por cada maceta).

Para el análisis molecular se hizo un pool de 2 plantas de cada duplicado de cada tratamiento, desinfectando las hojas y raíces por separado de la forma mencionada anteriormente y luego se secaron con papel tissue esterilizado y se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su posterior procesamiento. Se procedió de igual forma en el caso de la muestra de semilla.

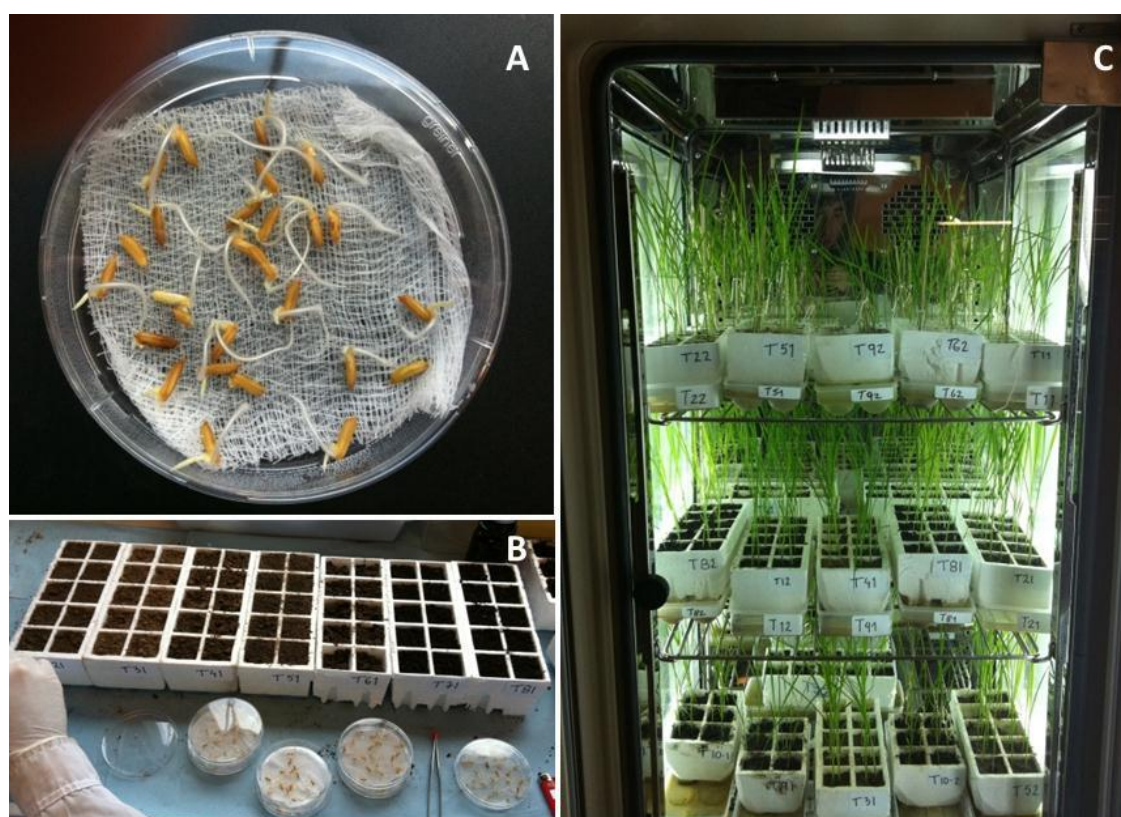


Figura 3.2 Fotografías del ensayo en fitotrón. A: Semillas germinadas luego de 5 días de incubación. B: Unidades experimentales conteniendo los diferentes tipos de suelos utilizados. C: Diseño del ensayo en fitotrón, plantas de arroz con 25 días de crecimiento.

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN vegetal se realizó a partir de 0,3g de hoja, raíz o semilla, de acuerdo a Doyle & Doyle (1987), como se describe en la Sección Materiales y Métodos del Capítulo II. Se realizaron dos

extracciones independientes de cada replicado y para la semilla se realizó una extracción de ADN de dos muestras.

En el caso de la extracción de ADN de los suelos, ésta se realizó mediante el kit PowerSoil de MOBIO®, partiendo de 0,5g de suelo seco. El ADN extraído se resuspendió en 50µL de agua milliQ estéril.

Se determinó el estado del ADN extraído de ambos tipos de muestras mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 0.5X durante 30 min, utilizando el marcador molecular GeneRuler 1kb (Fermentas®).

El ADN extraído para las distintas muestras fue cuantificado por fluorimetría mediante el kitQubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) mediante un fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). El kit utilizado permite cuantificar muestras entre 10pg.µL⁻¹ y 100ng.µL⁻¹ por lo que en caso de no estar dentro del rango adecuado de trabajo, se cuantificaron las muestras diluídas al décimo y luego se realizó la corrección correspondiente.

Abundancia de genes *nifH* en suelos, y en semillas, raíces y hojas de plantas de arroz

Se determinó la abundancia de genes *nifH* mediante q-PCR de acuerdo a la técnica descrita en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II.

Se probaron diluciones seriadas al décimo (dilución 0, -1, y -2) de las distintas muestras para verificar si había inhibición por componentes de la matriz de cada tipo de muestra y determinar el número de copias de *nifH* por ng de ADN extraído. Se detectó que las muestras de ADN concentradas, provenientes tanto de suelos como de hojas y raíces, presentaban un efecto de inhibición por componentes presentes en la matriz. De acuerdo a las pruebas realizadas se determinó que la dil-1 era la adecuada para realizar las determinaciones en estos tejidos. Todas las cuantificaciones se realizaron por duplicado y en cada corrida se realizó una curva de calibración utilizando triplicados de cada dilución del estándar de *nifH* preparado según lo descrito anteriormente (rango de 10⁰ a 10⁵ copias de *nifH*. µL ADN⁻¹). Las eficiencias obtenidas estuvieron entre 83% y 94% y el r²≥0,98.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis multivariado de Componentes Principales (PCA) para los datos fisicoquímicos obtenidos para las muestra de suelos.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación de medias (Test de Tukey) de los parámetros de rendimiento evaluados y de las abundancias del gen *nifH* determinadas para cada tratamiento. Asimismo, se compararon los resultados de abundancia del gen *nifH* para suelo, raíces y hojas utilizando la misma metodología. Los datos de abundancia de genes *nifH* fueron transformados (log₁₀) previo a la realización de las comparaciones estadísticas.

A partir de los resultados de producción de material vegetal (peso seco, peso fresco y longitud) y de abundancia de genes *nifH* (copias *nifH* por gramo de tejido) en raíces y hojas (o en raíces solamente), se realizó un análisis multivariado de Componentes Principales comparando los distintos tratamientos y se

obtuvo el gráfico Biplot donde se indica la importancia de las variables analizadas y su aporte a la diferenciación de las muestras.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat/ Profesional versión 2.0, con $\alpha=0,05$, en todos los casos que correspondía se verificó la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas previo al ANOVA.

Resultados y Discusión

Propiedades de los suelos

En la Tabla 3.1 se resumen los resultados obtenidos para los suelos analizados así como la ubicación geográfica y su historial agrícola. Los suelos utilizados presentan pH de 5,3, 5,8, 5,0, 5,5, 5,3, 4,7, 5,8 y 5,9 para los suelos S1 al S8, respectivamente. Estos resultados no fueron incluidos en el análisis de componentes principales que se detalla a continuación debido a que las determinaciones fueron realizadas tiempo después de completado el ensayo, pudiendo presentar variaciones con respecto al pH original de los suelos. El análisis de Componentes Principales (PCA) realizado sobre los resultados de propiedades fisicoquímicas determinadas para los distintos suelos logró explicar en total un 94% de la variabilidad observada, mediante los CP1 y CP2 (Figura 3.4). A pesar de no contar con réplicas de los análisis fisicoquímicos, el PCA arroja ciertas tendencias que vale la pena resaltar. Se puede observar el agrupamiento de los ocho suelos analizados en dos grupos definidos, principalmente influenciados por el porcentaje de arena y de materia orgánica que contienen. Los suelos S3, S4, S5 y S6 (Grupo 1) son suelos más arenosos (38 a 64%) que presentan menores contenidos de materia orgánica y de nitrógeno, mientras que los suelos S1, S2, S7 y S8 (Grupo2), presentan un contenido de arena menor a 18% y mayor contenido de materia orgánica (Tabla 3.1 y Figura 3.4). En cuanto al contenido de nutrientes, se observan diferencias destacables entre los suelos. En el Grupo 2, los suelos S1 y S2 se diferencian de los suelos S7 y S8 principalmente por presentar mayores niveles de Fósforo disponible, y también de Potasio y menores niveles de Nitrógeno. En el Grupo 2, la principal variable que aporta a la diferenciación de los suelos S1 y S2 de los suelos S7 y S8 es el contenido de Fósforo. Los primeros dos suelos presentan mayores niveles de Fósforo, así como de Potasio y menores niveles de Nitrógeno. El contenido de Materia Orgánica no es una variable que aporte a la diferenciación entre los suelos de este Grupo. En el caso del Grupo 1, el Fósforo y el Potasio están en mayor proporción en los suelos S3 y S6 comparado con los niveles observados en los suelos S4 y S5. De esta forma, el conjunto de las distintas propiedades fisicoquímicas determinadas definen dos grupos de suelos que pueden considerarse suelos de alta fertilidad (S1, S2, S7 y S8) y suelos de baja fertilidad (S3, S4, S5, S6) (Figura 3.4). La historia de uso del suelo y la región de la cual provienen no parece influir en el agrupamiento observado.

Producción de material vegetal de plántulas

La evaluación del rendimiento vegetal de las plantas de arroz obtenidas fue realizada mediante la medida de la longitud, peso fresco y peso seco, de la parte aérea y raíces. Los resultados de rendimiento

obtenidos para los distintos tratamientos, tanto para hoja como para raíz, no presentaron diferencias significativas excepto en el caso de la longitud de raíces (Figura 3.5). En este caso, la longitud de las raíces de arroz crecidas en el suelo 4, proveniente de Treinta y Tres sin historia previa de cultivo de arroz, fue significativamente menor a la obtenida para las plantas de los suelos 2 (Rocha, campo natural), 7 (Artigas, arroz) y 8 (Artigas, campo natural). De acuerdo a la caracterización fisicoquímica, estos últimos suelos son más fértiles que el suelo 4, que presenta baja proporción de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo (Tabla 3.1). En general, los tratamientos en los que se utilizaron los suelos 2, 3 y 4 presentaron mayor variabilidad en los rendimientos de las plantas de arroz, de acuerdo a los tres parámetros evaluados (ver Figura 3.5).

Además de las diferencias mencionadas, cabe señalar que visualmente algunos de los tratamientos presentaban diferencias en la intensidad de color y ancho de las hojas que no fueron cuantificadas (Figura 3.3).



Figura 3.3 Resultados del ensayo de crecimiento de plantas de arroz en condiciones controladas (fitotrón) utilizando suelos de diferentes zonas del país. Se indica el número de tratamiento (primer número) y el duplicado que corresponde (segundo número).

Suelo	Depto	Localidad	Historia de cultivo	C.O.* (%)	M.O.** (%)	N (%)	P (ppm)	K (meq/100g)	% arena	% limo	% arcilla	Clase textural***
1	Rocha	India muerta	Arroz	3,1	5,4	0,21	45	0,39	15,4	59,3	25,3	FL
2	Rocha	India muerta	Campo natural	3,5	6,1	0,27	28	0,36	17,6	55,9	26,5	FL
3	Treinta y Tres	Rincón	Arroz	1,5	2,5	0,11	30	0,3	38,3	40,4	21,3	F
4	Treinta y Tres	Rincón	Campo natural	1,6	2,8	0,14	17	0,18	36,2	40,7	23,1	F
5	Tacuarembó	Cinco Sauces	Arroz	1,3	2,2	0,13	15	0,09	59,7	27,5	12,8	FA
6	Tacuarembó	Cinco sauces	Raigrás	1	1,7	0,10	26	0,11	63,5	26,5	10,0	FA
7	Artigas	Paso Farías	Arroz	2,5	4,3	0,22	17	0,27	18,1	45,5	36,4	FAL
8	Artigas	Paso Farías	Campo natural	3,1	5,4	0,25	10	0,33	16,2	44,5	39,3	FAL

Tabla3.1 Propiedades fisicoquímicas y origen de los suelos analizados. * Carbono Orgánico. ** Materia Orgánica. ***Clase textural a la que pertenece cada uno de los suelos: FL: Franco limoso; F: Franco; FA: franco arcilloso; FAL franco arcilloso limoso.

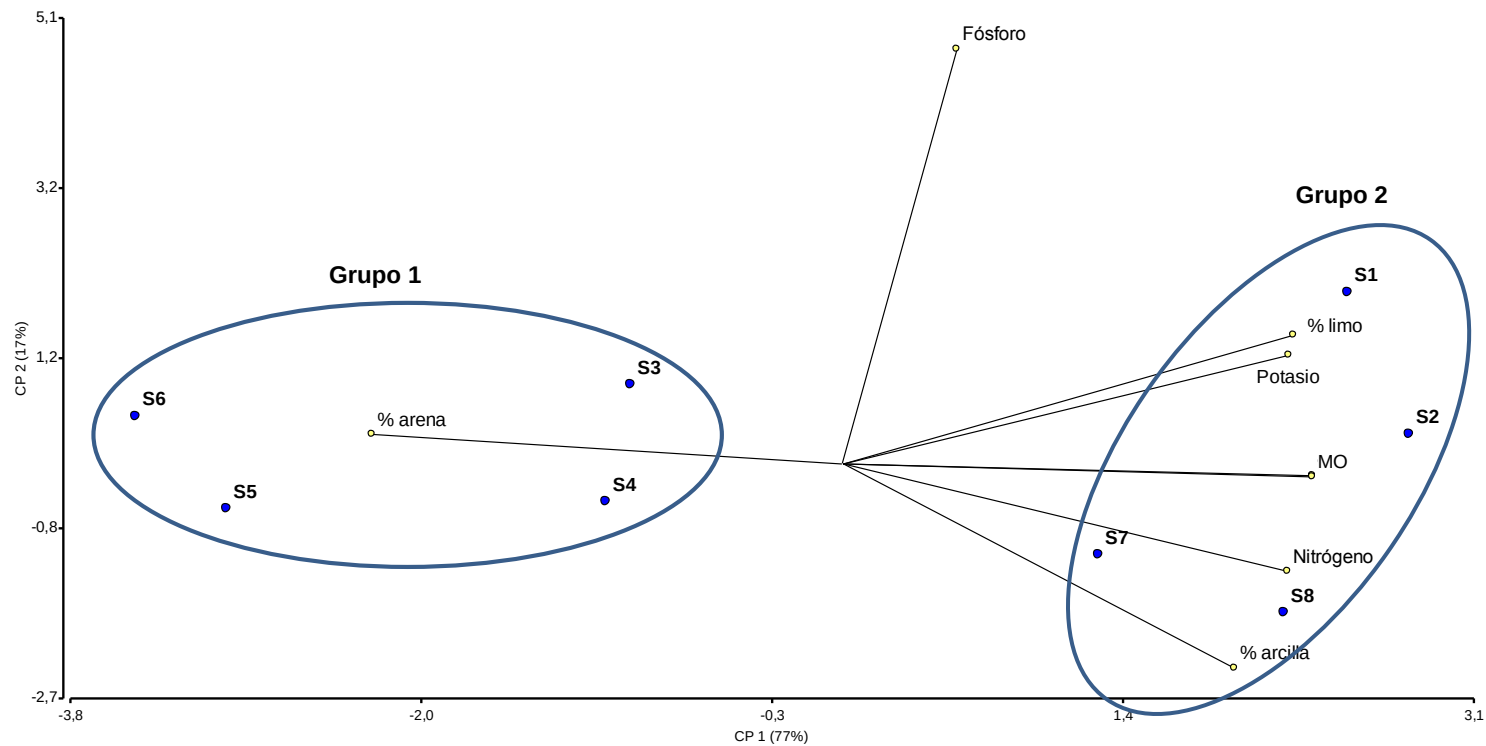


Figura3.4 Análisis de Componentes Principales (PCA) para los 8 suelos analizados según las diferentes características fisicoquímicas que presentan. Las variables, representadas como vectores, señalan el aporte de cada variable a la distribución de las muestras. MO: % Materia Orgánica. La variabilidad explicada por cada componente principal está indicado entre paréntesis. S1 a S8 indican los diferentes suelos.

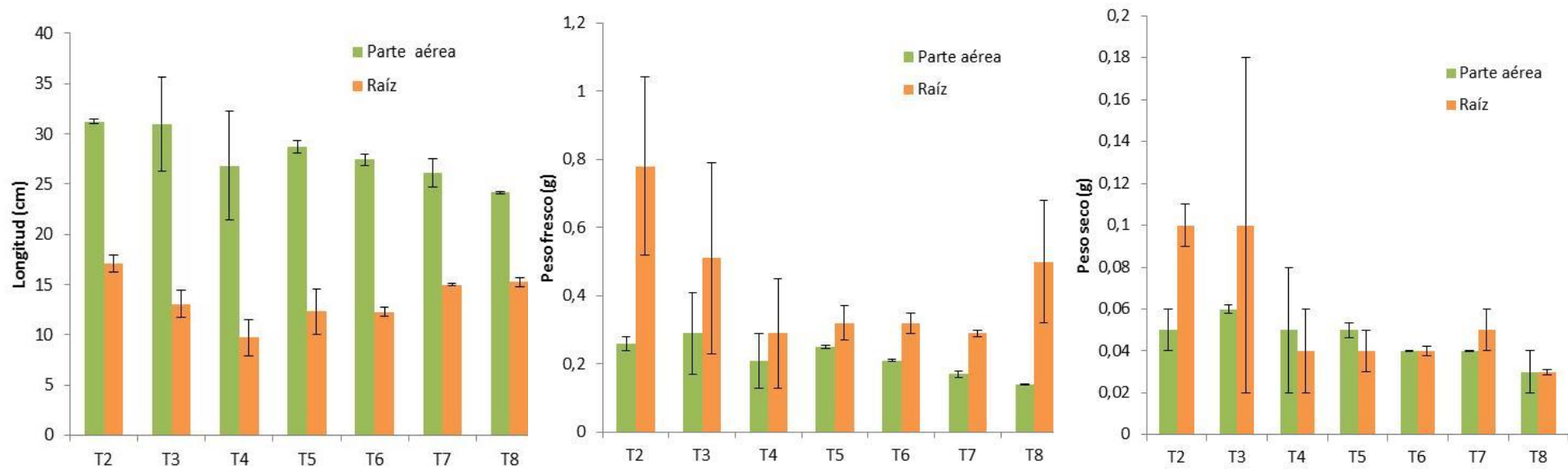


Figura3.5 Parámetros de rendimiento de las plántulas. Resultados correspondientes a Longitud, Peso Fresco y Peso Seco de parte aérea y raíz de plantas de arroz de 25 días después de la siembra. Se indica para cada valor la desviación estándar (n=2).

Abundancia de genes *nifH* en suelos, semillas, raíces y hojas de arroz

En el caso de la semilla, todas las diluciones probadas presentaron niveles de *nifH* por debajo del límite de detección ($<2.0 \times 10^0$ copias *nifH*. (ng de ADN)⁻¹). Con estos resultados no se puede afirmar que no estén presentes diazótrofas en la semilla de arroz ya que existe un compromiso entre la necesidad de diluir la muestra para eliminar la inhibición y la concentración de muestra necesaria para poder detectar de forma precisa niveles bajos de *nifH* en las muestras analizadas.

Los resultados de abundancia de genes *nifH* obtenidos para las distintas muestras analizadas para cada tratamiento se resumen en la Tabla 3.2. Debido a que las muestras de raíces y hojas presentaron claras diferencias en la eficiencia de extracción o en el contenido de ADN, se consideró mas adecuado comparar los resultados expresados como copias de genes *nifH* por ng de ADN total extraído. De esta forma, se redujo el sesgo relacionado a una diferente extractabilidad o concentración de los distintos tipos de muestras. Esta diferencia podría deberse a que el método de extracción de ADN utilizado no sea igualmente apropiado para los dos tipos de tejidos o a que efectivamente, las hojas presenten mayor cantidad de ADN que las raíces. Es importante destacar que gran parte del ADN extraído corresponde a ADN vegetal y sólo una baja proporción del ADN total extraído es de origen bacteriano. Asimismo, se presenta de forma adicional el número de copias de *nifH* presente por gramo de tejido o suelo, ya que puede presentar interés contar con esa información para comparar con resultados de recuento por cultivo tradicional o con resultados de otros estudios (Tabla 3.3).

Como fue mencionado en el Capítulo II de esta tesis, los primers utilizados para la evaluación de la abundancia de secuencias *nifH* en las distintas muestras analizadas (Poly et al. 2001a), no presentan una amplia cobertura de las secuencias *nifH* que se han descrito hasta la fecha y que están disponibles en la base de datos como mostraron Gaby y Buckley en 2012. Por lo tanto el número de copias de *nifH* determinado podría estar subestimado.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de genes *nifH* muestran que existen diferencias significativas en la abundancia de copias de genes *nifH* entre las distintas muestras analizadas (p-valor $<0,0001$). Las hojas de arroz presentaron abundancias de *nifH* significativamente menores que las obtenidas para raíces y suelo de acuerdo a la comparación de medias realizada mediante el Test de Tukey. En cambio, no se observaron diferencias significativas en el número de copias de *nifH* por ng de ADN presente en raíces y en las muestra de suelos (Tabla 3.4).

Analizando los resultados obtenidos dentro de cada tipo de muestra, en el caso de las hojas y suelos, no se encontraron diferencias significativas entre las abundancias de genes *nifH* presentes en los distintos tratamientos estudiados (p-valores de 0,5350 y 0,9899, respectivamente). A pesar de esto, se observa una tendencia en los resultados obtenidos para suelo, siendo menores los valores de abundancia correspondientes a los tratamientos T2, T3, T4, seguidos por los tratamientos T6, T8, T5 y T7, en ese orden. No sucede lo mismo con la abundancia de *nifH* en las hojas, donde no se observa una tendencia clara de los resultados.

En cambio, en el caso de las raíces se verificó la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos (p-valor=0,0003), observándose mayor variabilidad en los resultados que en el caso de las

muestras de hoja y suelo. Los tratamientos T5, T7 y T8 pueden diferenciarse entre sí mientras sólo el tratamiento T7 puede diferenciarse significativamente del resto de los tratamientos (T2, T3, T4, T6) (Tabla 3.4). El tratamiento T7 (Artigas, con historia previa de cultivo de arroz, perteneciente a los suelos del Grupo 2) presenta un número de copias de *nifH* significativamente mayor que el resto de los tratamientos ($5,06 \log_{10}$ copias de *nifH*.ng ADN⁻¹). De los tres tratamientos que se distinguen, las raíces del T8 (Artigas, campo natural, suelo Grupo 2) son las que presentan abundancias significativamente menores ($2,93 \log_{10}$ copias de *nifH*.ng ADN⁻¹). En cambio en T5 (Tacuarembó, historia previa de arroz, suelo Grupo 1), la abundancia de genes *nifH* expresada en $\log_{10}$ copias de *nifH*.ng ADN⁻¹ fue de 3,92, ubicándose en una posición intermedia.

Si se expresan los resultados de la cuantificación de genes *nifH* por gramo de material vegetal o de suelo (Tabla 3.4), se observa que las abundancias de genes *nifH* en hojas, raíces y suelos se encuentran, en promedio en 5,52, 6,64 y 5,98, $\log_{10}$ copias de *nifH*.g material⁻¹, respectivamente. Estos resultados son comparables a los obtenidos para suelos agrícolas por otros autores. Orr et al. (2012) caracterizaron suelos agrícolas en los que se utilizaron prácticas convencionales y orgánicas de manejo del cultivo, en todos ellos las abundancias se encontraron entre de 5,7 y 6,6 $\log_{10}$ copias *nifH*. g suelo seco⁻¹. Asimismo, Coelho et al. (2009) determinaron la abundancia de la población diazótropa por qPCR del gen *nifH* en rizósfera de sorgo y el efecto de la fertilización. Estos autores reportaron abundancias en el rango de 5,38 a 7,11 $\log_{10}$ copias *nifH*. g suelo seco⁻¹. No se dispone de datos bibliográficos para comparar en el caso de la abundancia absoluta de este gen en hojas y raíces.

Pereira e Silva et al. (2011) determinaron que el mejor predictor de la abundancia de la comunidad fijadora de nitrógeno presente en los suelos analizados fue el pH del suelo. Estos autores señalan que con respecto a los suelos arenosos, la variación en la abundancia de la comunidad diazótropa fue explicada principalmente por el pH y el contenido de materia orgánica. En el caso de los suelos arcillosos, el nivel de amonio fue el principal predictor de la abundancia de genes *nifH*. La arcilla aporta al suelo propiedades físicas importantes, formando micro y macro agregados (Gupta & Roper, 2010), que favorecen las condiciones microaerófilas o anaerobias adecuadas para la fijación de nitrógeno. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que la diferencia de acidez de los suelos analizados no es tan grande como la encontrada en los suelos de Pereira e Silva et al. (2011, pH 4,0 a 7,0). El contenido de arcilla de los suelos analizados, no se relaciona tan claramente con la abundancia de secuencias *nifH* como en el trabajo mencionado (Tabla 3.1).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, las raíces de las plantas de arroz crecidas en suelos de alta fertilidad y que han sido utilizados anteriormente para el cultivo de arroz, como el suelo S7, presentan mayor abundancia de diazótropas que aquellas cultivadas en suelos de similares características sin historia de cultivo de arroz y que presenta campo natural (S8). Es necesario realizar más estudios con mayor número de réplicas de los suelos de diferentes características para poder sacar conclusiones más certeras. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la historia previa de cultivo de arroz hace una diferencia en el número de secuencias *nifH* que se encuentran a nivel radicular. Esto podría deberse a múltiples factores, tanto a cambios fisicoquímicos y de fertilidad del suelo como a cambios en las poblaciones microbianas presentes que se ven impactadas por el desarrollo del cultivo.

Además, el sistema de producción de arroz que involucra la rotación con pasturas forrajeras u otros cultivos también podría tener influencia.

Resulta interesante que, a pesar de presentar diferencias importantes en sus propiedades fisicoquímicas, los suelos utilizados no presentan diferencias en los tamaños de las poblaciones diazótroficas que allí habitan de acuerdo a las abundancias de secuencias *nifH* obtenidas. Sin embargo, las raíces de las plantas de arroz crecidas en esos mismos suelos presentan diferencias marcadas en la abundancia de secuencias *nifH* encontrada, al menos para algunos de los tratamientos. Esto puede tener distintas implicancias y sugiere, por ejemplo, que las raíces podrían actuar seleccionando y concentrando a las bacterias diazótroficas presentes en el suelo o alternatively, seleccionando y propiciando su crecimiento dentro de las raíces de arroz. También diferencias cualitativas a nivel de la composición de las comunidades diazótroficas de los suelos puede influir en la abundancia de genes *nifH* que presentan. Asimismo, las hojas de esos mismos tratamientos presentan números similares de copias de *nifH*, no pareciendo verse afectadas por las diferentes propiedades del suelo, siendo posiblemente más afectadas por la fisiología de la planta.

Hay que considerar que otros parámetros del suelo así como algunas condiciones ambientales también pueden ser importantes y no han sido determinados en este estudio. Por ejemplo la disponibilidad de micronutrientes y elementos traza, como los metales, que son imprescindibles para la acción de muchas enzimas, en particular el molibdeno, hierro y vanadio para la dinitrogenasa reductasa, puede tener impacto en estas poblaciones. La presencia de otros compuestos que inhiban el desarrollo de este grupo fisiológico puede estar afectando, o por el contrario, que este grupo se vea beneficiado por las condiciones ambientales presentes, como fue descrito en el Capítulo II de esta tesis en el caso de la inundación. Al ser las bacterias fijadoras de nitrógeno un grupo fisiológicamente tan diverso, las causas de presentar mayores o menores abundancia de estas poblaciones son complejas de elucidar. En este estudio se analizaron plantas de arroz en las primeras etapas de crecimiento, por lo cual se podría suponer que las bacterias enumeradas por q-PCR se encuentran viables dentro de los tejidos de la planta, representando el potencial diazótrofo disponible en las raíces de arroz.

Juraeva et al. 2006 obtuvieron resultados similares a los del presente trabajo cuando evaluaron la abundancia relativa de *nifH* en brotes y raíces de pepino y cómo se ve afectada por el agregado de nitrógeno y la edad de la planta. La abundancia de *nifH* en las raíces fue mayor que la obtenida para los brotes. Estos resultados y los obtenidos en esta tesis sugieren que las poblaciones diazótroficas endófitas de hojas y tallos son más estables e independientes de cambios ambientales externos a la planta. En los brotes la abundancia de *nifH* no se vio afectada ni por las diferentes etapas del cultivo ni por el agregado de nitrógeno. En cambio en las raíces se observó un aumento significativo con la edad de la planta y una correlación positiva con la cantidad total de nitrógeno absorbido por la planta.

Según Yoshida (1981), en las primeras etapas de crecimiento, los nutrientes principales de la planta provienen de la semilla. De acuerdo a estos autores, en la primera semana de crecimiento post germinación, la reserva de la semilla es responsable del 70% del crecimiento de la planta, en la segunda semana este valor se reduce a 2% y para la tercera semana la plántula de arroz crece de forma independiente. El tiempo de incubación utilizado en este ensayo fue de 25 días por lo que tal vez, para

realizar una mejor evaluación del efecto del suelo en, ya sea la composición o la abundancia de la comunidad de diazótrofos endófitos, debería llevarse a cabo un ensayo de mayor duración.

Tratamiento	Copias <i>nifH</i> . ng ADN ⁻¹ ± DE		
	Hoja	Raíz	Suelo
1	nd	nd	3,48 ± 0,78
2	1,22 ± 0,11	3,65 ± 0,16 AB	3,02 ± 0,64
3	1,78 ± 0,59	3,62 ± 0,14 AB	3,43 ± 0,77
4	1,52 ± 0,13	3,54 ± 0,2 AB	3,45 ± 0,42
5	1,52 ± 0,17	3,92 ± 0,14 B	3,69 ± 0,71
6	1,17 ± 0,44	3,49 ± 0,19 AB	3,57 ± 1,0
7	1,58 ± 0,26	5,06 ± 0,34 C	3,82 ± 0,99
8	1,45 ± 0,11	2,93 ± 0,08 A	3,60 ± 1,3

Tabla3.2 Abundancia del pool de genes *nifH* en muestras de hojas, raíces y suelos correspondientes a los 8 tratamientos analizados. Se expresan los resultados en log₁₀ del número de copias del gen *nifH* por ng de ADN total extraído. DE: Desviación Estándar de replicados biológicos. Nd: no determinado.

Tratamiento	Copias <i>nifH</i> . g tejido fresco ⁻¹ ± DE		Copias <i>nifH</i> . g suelo seco ⁻¹ ± DE
	Hoja	Raíz	Suelo
1	nd	Nd	5,95 ± 0,78
2	5,43 ± 0,12	6,59 ± 0,22	5,42 ± 0,69
3	5,64 ± 0,49	5,54 ± 1,18	6,03 ± 0,81
4	5,61 ± 0,36	6,72 ± 0,19	6,39 ± 0,60
5	5,43 ± 0,04	7,05 ± 0,11	6,15 ± 0,94
6	5,39 ± 0,43	6,87 ± 0,05	5,18 ± 0,40
7	5,66 ± 0,14	8,04 ± 0,41	6,37 ± 1,69
8	5,46 ± 0,03	5,68 ± 0,19	6,38 ± 1,46

Tabla3.3 Abundancia del pool de genes *nifH* en muestras de hojas, raíces y suelos correspondientes a los 8 tratamientos analizados. Se expresan los resultados en log₁₀ del número de copias del gen *nifH* por gramo de material vegetal fresco o suelo seco. DE: Desviación Estándar de replicados biológicos. Nd: no determinado.

Comparación de tratamientos en los parámetros evaluados en las plantas

El análisis de componentes principales realizado a partir del conjunto de los resultados obtenidos, tanto para hoja como para raíz (peso seco, peso húmedo, longitud y abundancia de genes *nifH*), permitió comparar globalmente los siete tratamientos empleados de acuerdo a los resultados de los parámetros evaluados. En total se logró explicar el 73% de la variabilidad observada. El CP1 no permite observar diferencias significativas entre tratamientos ya que para varios de ellos la desviación estándar para un mismo tratamiento es muy grande, principalmente para T3 y T4 (Figura 3.6). Sin embargo, se puede observar un agrupamiento significativo en el segundo componente principal (CP2), donde los tratamientos forman dos grupos. El primero de ellos está constituido por los tratamientos T2, T7 y T8, correspondientes a las plantas de arroz crecidas en los suelos del mismo número, todos ellos incluidos en el grupo de suelos más fértiles (ver Figura 3.5). El segundo grupo lo constituyen los tratamientos T3, T4, T5 y T6, correspondientes a los suelos más pobres. Estos resultados indican que el tipo de suelo influye en las características que presentan las plantas de arroz obtenidas y que las diferencias que presentan estos suelos se ven reflejadas en los parámetros determinados para las plantas.

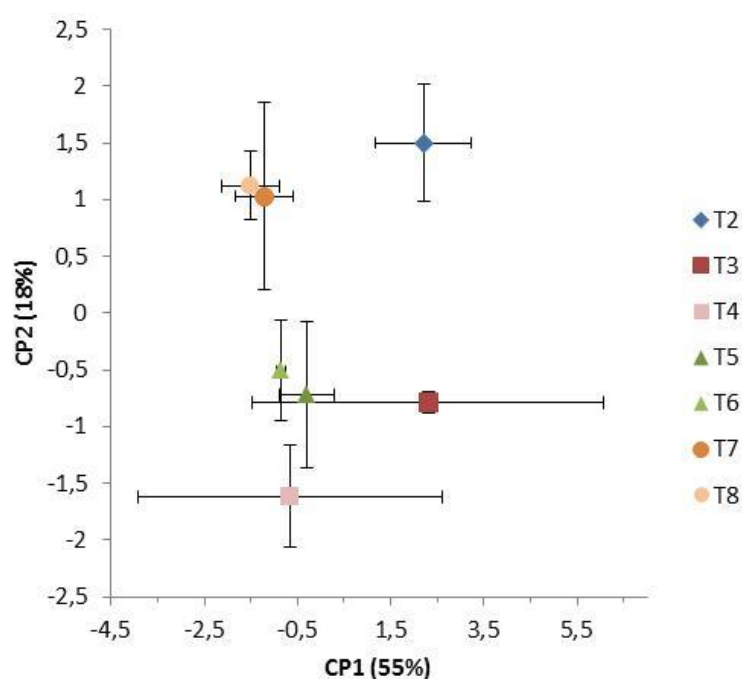


Figura 3.6 Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros determinados para las raíces y hojas de arroz. Se indica entre paréntesis el porcentaje de variación explicada por cada uno de los componentes principales. Para cada uno de los tratamientos (T2 a T8) se indica la media de los duplicados y la desviación estándar asociada a la misma en cada uno de los ejes.

Los tratamientos T2, T7 y T8 están agrupados principalmente debido a las variables relacionadas a la raíz (Figura 3.7). Estos tratamientos presentan raíces más largas y cuyo peso fresco es mayor que para el resto. Asimismo, la abundancia de genes *nifH* en la raíz también es una variable importante en la distribución de los tratamientos, principalmente para los tratamientos T7 y T8.

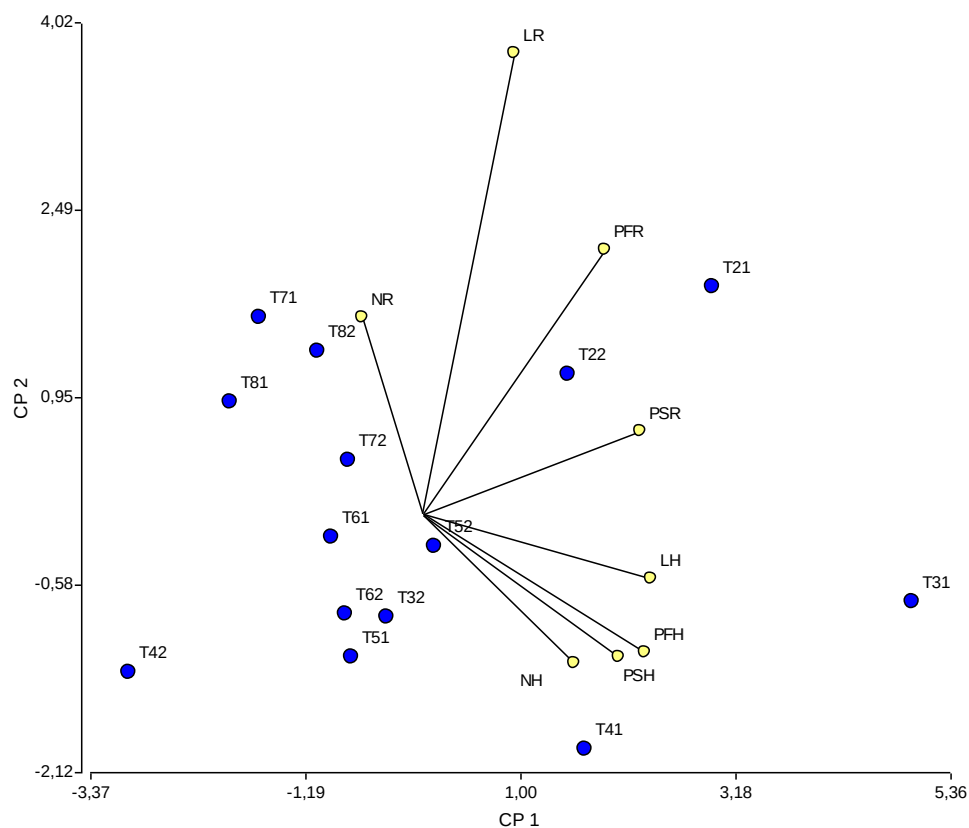


Figura3.7 Gráfico Biplot: Análisis de Componentes Principales e importancia de las variables en la distribución observada de los tratamientos. Se indican los componentes principales para los duplicados (1 y 2) de cada tratamiento (T2 a T8). Los vectores corresponden a las variables involucradas y su dirección indica en qué muestras son más importantes. LR: longitud raíces; LH: longitud parte verde; PFR: Peso fresco raíces; PFH: Peso fresco parte verde; PSR: Peso seco raíces; PSH: Peso seco parte verde; NR: Copias de *nifH*.(g fresco de raíz)⁻¹; NH: Copias de *nifH*.(g fresco de hoja)⁻¹.

Conclusiones y Perspectivas

Las plántulas de arroz al cabo de 25 días de crecimiento presentan parámetros de rendimiento y de abundancia de genes *nifH* que agrupan de forma coincidente con los dos grupos observados mediante análisis PCA de las propiedades fisicoquímicas de los suelos (suelos de alta y baja fertilidad). En esta diferenciación resultaron importantes las variables relacionadas a la raíz (longitud, peso húmedo y abundancia de secuencias *nifH*). Estos resultados indican que las diferencias en composición y estructura que presentan los suelos analizados influyen en las características de las plantas obtenidas, incluso en la abundancia de secuencias *nifH* que poseen en sus tejidos. En cambio, la historia de uso del suelo y la región de la cual provienen parece no influenciar estos parámetros.

Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones diazótroficas son igualmente abundantes en raíces de plantas de arroz y en los suelos en los que se cultivaron. A pesar de presentar diferencias importantes en sus propiedades fisicoquímicas, los distintos suelos utilizados no presentaron diferencias en los tamaños de las poblaciones diazótroficas potencialmente presentes.

Sin embargo, la abundancia de secuencias *nifH* presente en las raíces de las plantas de arroz crecidas en esos mismos suelos presentaron diferencias marcadas para, al menos, alguno de los tratamientos. Esto sugiere que las poblaciones diazótroficas endófitas de raíz serían sensibles a cambios en la composición o características del suelo en las que se cultiva. Es necesario elucidar si la planta de arroz participa en esta diferenciación o si cambios cualitativos en la comunidad diazotrofica de suelo determinan quiénes logran colonizar y establecerse en los tejidos de raíz provocando cambios en la abundancia de endófitos de este grupo fisiológico. Asimismo, explorar el efecto de otros factores no considerados en este trabajo.

La historia agrícola del suelo parece ser un factor que afecta la abundancia de las poblaciones diazótroficas a nivel radicular en suelos de alta fertilidad. Las raíces de arroz crecidas en suelos de alta fertilidad con historia previa de cultivo de arroz presentan mayores abundancias que los crecidos en suelos de alta fertilidad pero que no han sido utilizados para tal fin. Es necesario confirmar el impacto del uso agrícola que se le da a los suelos en las comunidades endófitas diazótroficas. Además, resultaría interesante estudiar el efecto del sistema uruguayo de producción de arroz de alternancia con pasturas u otros cultivos, que obtiene tan buenos resultados en rendimiento agrícola, sobre las poblaciones diazótroficas que habitan las raíces de las plantas de arroz cultivadas en suelos que han tenido ciclos sucesivos de arroz y pasturas.

Los diazótroficos que habitan las hojas de arroz se encuentran en una proporción casi 100 veces menor que en raíz y suelo. La abundancia de genes *nifH* en hoja no se ve afectada por el tipo de suelo, ya que no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos. La población diazotrofica de hoja parece más estable e independiente de las propiedades del suelo, pudiendo verse más influenciada por factores internos como el estado fisiológico de la planta, la variedad o el genotipo de la planta.

Finalmente, sería interesante evaluar la diversidad y composición de las comunidades diazótrofias endófitas de arroz cultivado en diferentes suelos ya que puede haber diferencias cualitativas que no repercutan en un cambio en la abundancia del gen *nifH* o en el tamaño de las poblaciones.

Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo serán complementados y profundizados en el estudio del efecto del tipo de suelo en la composición, diversidad y abundancia de las comunidades de diazótrofias endófitas de arroz mediante un proyecto¹ recientemente aprobado. En el mismo, además se evaluará el efecto de la variedad de arroz en la comunidad de diazótrofias combinando metodologías independientes del cultivo de última generación como el Pyrosequencing.

¹ Proyecto ANII “Capacidad de los suelos para suministrar bacterias promotoras de crecimiento fuertemente asociadas a diferentes variedades de arroz (*O.sativa*)”

Capítulo IV

Búsqueda y detección de metanótrofas endófitas con capacidad fijadora de nitrógeno en plantas de arroz.

Autores: Ferrando, Lucía; Fernández Scavino, Ana.

Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124, Código Postal 11800. Montevideo, Uruguay

Palabras clave: diazótrofas endófitas, gen *pmoA*, q-PCR, arroz,

Parte de estos resultados forman parte del Capítulo *Functional diversity of endophytic bacteria*, Lucía Ferrando y Ana Fernández, aceptado para su publicación en el libro PROGRESS IN SYMBIOTIC ENDOPHYTES. Ricardo Aroca (Ed), Springer, 2013.

Contribución a este capítulo

Realización de todas las etapas del trabajo experimental (planificación, muestreos, realización y seguimiento de enriquecimientos, aislamiento, caracterización molecular).

Análisis y discusión de resultados.

Escritura del presente capítulo.

Escritura de parte de los resultados de este trabajo para el capítulo *Functional diversity of endophytic bacteria*, Lucía Ferrando y Ana Fernández, aceptado para su publicación en el libro PROGRESS IN SYMBIOTIC ENDOPHYTES. Ricardo Aroca (Ed), Springer, 2013.

Resumen

Las metanótrofas tienen gran importancia en el ecosistema arrocerero debido a su rol como consumidoras de metano, lo cual contribuye a mitigar las emisiones de este gas de efecto invernadero. Los tejidos internos de la planta de arroz ofrecen condiciones favorables para su crecimiento por la presencia de oxígeno y metano (producido principalmente por descomposición anaerobia de materia orgánica y transportado por tejidos especializados hacia la atmósfera) en forma simultánea. Muchas de las metanótrofas descritas son fijadoras de nitrógeno atmosférico, pudiendo ser ésta una propiedad importante en su interacción con la planta.

En el presente trabajo se abordó la detección, búsqueda y caracterización de bacterias metanótrofas como endófitas de plantas de arroz combinando metodologías clásicas de cultivo con métodos moleculares basados en el gen *pmoA* como marcador funcional. Su presencia fue estudiada en diversos tejidos de arroz desinfectados superficialmente (semillas, raíces y hojas), en distintas condiciones de cultivo (cultivo hidropónico, cultivo in vitro con suelo y cultivo en invernáculo) y en dos variedades de arroz.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante enriquecimiento y caracterización molecular de los mismos, las metanótrofas están presentes como endófitas tanto en hojas como en raíces de arroz crecido en suelo en distintos ensayos ((invernáculo y ensayo in vitro con suelos) y en distintas variedades de arroz (INIA Olimar e INIA El Paso 144). Sin embargo, utilizando éstas metodologías, no se detectaron metanótrofas en semillas ni en tejidos de arroz crecido en condiciones hidropónicas. Estos hallazgos sugieren que el origen de las metanótrofas endófitas no estaría en la semilla sino en el suelo, existiendo especies metanótrofas de suelo que son capaces de colonizar la planta de arroz y migrar hasta sus hojas durante el crecimiento de la planta para allí establecerse. Los resultados cuantitativos obtenidos indican que las metanótrofas colonizan los tejidos de arroz manteniéndose en bajo número ($<5,3 \times 10^1$ copias del gen *pmoA*.g tejido fresco⁻¹).

Unas pocas cepas metanótrofas de Tipo II, cuyas secuencias del gen *pmoA* se encuentran muy relacionadas entre sí y que presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, están muy distribuidas en los tejidos de arroz en el ecosistema arrocerero uruguayo, sin importar la variedad de arroz (INIA Olimar, INIA El Paso 144). Las cepas dominantes en los cultivos enriquecidos están muy relacionadas a una cepa aislada previamente de rizósfera de arroz en Uruguay (C9), a *Methylosinus trichosporium* M23 y *Methylocystis hirsuta*.

Introducción

Las bacterias oxidadoras de metano aerobias o metanótrofas son un grupo fisiológico importante de bacterias que utilizan metano como su única fuente de carbono y electrones, y oxígeno como aceptor de electrones. Han sido foco de atención y de estudio por su rol como consumidores de metano, gas que contribuye significativamente al efecto invernadero, y por su potencial aplicación en la biorremediación de contaminantes como el tricloroetileno (Hanson and Hanson 1996).

Las bacterias metanótrofas se dividen en dos grandes grupos (Tipo I y Tipo II) de acuerdo a las características particulares que presentan como la estructura y disposición de la membrana intracitoplasmática, la vía de asimilación de carbono y qué tipo de ácidos grasos forman parte de sus fosfolípidos. Las metanótrofas Tipo I y Tipo II pertenecen a las clases *Gama* y *Alfaproteobacteria*, respectivamente (Bowman, 2006). Recientemente fueron descritas metanótrofas afiliadas a *Verrucomicrobia* aunque su presencia parece estar limitada a ambientes extremos (Dunfield et al. 2007).

La metano monooxigenasa (MMO) es la enzima clave involucrada en la oxidación aerobia de metano. Existen dos formas de esta enzima, una soluble (sMMO) presente en el citoplasma y otra particulada asociada a membrana (pMMO). La pMMO se encuentra en casi todas las metanótrofas descritas excepto *Methylocella palustris* y *Methyloferula stellata* (Dedysh et al. 2000 y Vorobev et al. 2010, respectivamente). En cambio la forma soluble no está tan ampliamente distribuida.

Las condiciones ambientales que presentan los tejidos internos de plantas de ecosistemas inundados brindan condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias metanótrofas. Estas plantas poseen tejidos especializados que facilitan el intercambio de gases (O_2 , CO_2 , CH_4 , etc.) entre las raíces y la atmósfera. Esto permite que tanto el O_2 como el metano se encuentren disponibles para la proliferación de este tipo de bacterias.

Recientemente fue descubierto por Keppler et al. (2006), que muchas plantas son capaces de producir metano aeróbicamente, así como también metanol, a partir del grupo metil éster de las pectinas que forman parte de las paredes de las células vegetales. Esto hace que, potencialmente, las bacterias metanótrofas puedan tener metano disponible dentro de tejidos vegetales de plantas en cualquier ambiente (anegadas o no).

Muchas especies metanótrofas presentan además la capacidad de fijar nitrógeno (Lidstrom et al. 2006). Las metanótrofas diazótrofas pertenecen mayoritariamente, aunque no exclusivamente, a las metanótrofas Tipo II. Esta propiedad promotora del crecimiento vegetal, le aportaría una ventaja competitiva extra a este grupo bacteriano que podría contribuir a establecer interacciones benéficas con plantas. Dado que a la fecha no se han aislado metanótrofas endófitas, continúa pendiente explorar otras propiedades que pudieran ser provechosas para promover esta interacción.

Varios estudios han reportado la detección de metanótrofas asociadas a raíces de diferentes plantas (Calhoun and King 1998; Gilbert et al. 1998; Takeda et al. 2008; Lüke et al. 2011). Sin embargo, la mayoría de éstos no discriminan entre endófitas y epifíticas, focalizándose en el conjunto de bacterias asociadas a la planta. En cambio, no se han reportado trabajos en los que se aborde el cultivo o la

búsqueda de bacterias metanótrofas como endófitas. El sesgo de los métodos de cultivo es bien conocido. En particular, en el caso de las bacterias endófitas se ha visto que muchas de ellas se encuentran en estado viable pero no cultivable (Hurek et al., 2002; Gamalero et al., 2005), desafiando las estrategias actuales para recuperar microorganismos por cultivo. Por esta misma razón, la mayoría de los estudios realizados han evaluado la diversidad de metanótrofas asociadas a plantas utilizando herramientas moleculares.

La asociación entre metanótrofas y los musgos *Sphagnum* presentes en las turberas ha sido la más estudiada. Raghoebarsing et al. (2005) determinaron que las bacterias metanótrofas endófitas juegan un papel importante en la mitigación de las emisiones de metano por parte de estos ecosistemas. Estos autores mostraron que simbiosis metanótrofos asociados a los musgos *Sphagnum*, que se encuentran sumergidos, proveen carbono para la fotosíntesis en turberas del hemisferio norte a través de un reciclado altamente eficiente del metano producido in situ. Se detectó la presencia de metanótrofas acidófilas de Tipo II relacionadas a *Methylocella palustris* y *Methylocapsa acidiphila* (alfaproteobacteria que fue previamente aislada de turberas) formando aglomerados en las células hialinas del cortex externo de los tallos (outer cortex) y sobre las hojas del tallo mediante la técnica *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH). El aporte de las bacterias metanótrofas endófitas para mitigar las emisiones de metano producido por los musgos *Sphagnum* también fue confirmado por Parmentier et al. (2011). Asimismo, se detectaron metanótrofas pertenecientes a las *Alfa* y *Gamaproteobacteria* en todos los musgos *Sphagnum* estudiados provenientes de las turberas de América del Sur (Kip et al. 2012). El microarreglo para el gen *pmoA* utilizado por estos autores reveló que la especie más abundante en los musgos más activos pertenecía *Methylocystis*, una alfaproteobacteria, metanótrofa del Tipo II.

Por otra parte, Seghers et al. (2004) informaron la presencia de metanótrofas como endófitas de maíz (*Zea mays* L.). Las metanótrofas Tipo II no fueron detectadas por amplificación por PCR convencional con primers específicos. En cambio, las metanótrofas Tipo I fueron detectadas exitosamente mediante DGGE con primers específicos, permitiendo diferenciar las plantas de maíz fertilizadas con fertilizantes minerales de aquellas cultivadas usando fertilizantes orgánicos.

Los arrozales son una de las principales fuentes antropogénicas de metano que contribuyen gran magnitud al efecto invernadero (Le Mer and Roger 2001). Las bacterias metanótrofas han sido extensamente estudiadas para entender su comportamiento y dinámica en estos ecosistemas y para estimular su actividad y de esa forma mitigar las emisiones de metano producto de este cultivo. Dentro del cultivo de arroz, las interfaces aerobias- anaerobias que se generan a nivel de la rizósfera y de la interface suelo- agua son los nichos que presentan las condiciones más adecuadas para el crecimiento de las metanótrofas ya que permiten que tanto el metano como el oxígeno se encuentren disponibles para ser utilizado. En estas zonas es donde se ha reportado que existe la mayor abundancia y actividad de este grupo fisiológico (Eller y Frenzel 2001; Ferrando y Tarlera 2009). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la presencia y actividad de las metanótrofas dentro de los tejidos de la planta de arroz.

Mediante el uso de la técnica $^{15}\text{N}_2$ -DNA-Stable Isotope Probing, Buckley et al. (2008) estudiaron el vínculo existente entre el agregado de diferentes fuentes de carbono al suelo y la fijación de nitrógeno realizada por poblaciones específicas de diazótrofos de suelo. De acuerdo a estos autores, el agregado

de metano a los suelos estimula la fijación de nitrógeno, siendo los principales responsables de esta actividad los metanótrofos de tipo II, mayoritariamente relacionados al género *Methylocystis*. La inundación del cultivo de arroz provoca un aumento en los niveles de metano producto de la descomposición anaerobia de la materia orgánica (Kögel-Knabner et al. 2010) por lo que particularmente en el ecosistema arrocerero la fijación de nitrógeno por parte de las metanótrofas puede ser importante. En este sentido, Martensson et al. (2009) determinaron que especies de *Methylocystis* y *Methylococcus* son miembros activos de las comunidades de diazótrofos establecidos en suelo y rizósfera de campos de arroz. Esto permite pensar en la posibilidad de que bacterias metanótrofas, estimuladas en las condiciones del cultivo de arroz, que se encuentran presentes y activas como diazótrofas a nivel rizosférico, pudieran colonizar y establecerse dentro de los tejidos de la planta de arroz.

Recientemente, Sessitsch et al. (2012) revelaron la presencia de varios genes requeridos para la oxidación de metano (los genes *pmo*, *mmo* y *mxs*) dentro de las raíces de arroz mediante análisis metagenómicos. Esto aporta nueva evidencia sobre la existencia de metanótrofas endófitas de arroz y provee estímulo para abordar su estudio mediante técnicas clásicas de cultivo y obtener aislamientos que permitan estudiar la interacción planta- microorganismos así como las propiedades promotoras del crecimiento que pudieran presentar.

En el presente trabajo se abordó la detección y búsqueda de bacterias metanótrofas como endófitas de plantas de arroz. Para ello se combinaron metodologías clásicas de cultivo con métodos moleculares basados en el gen *pmoA* como marcador funcional. Se exploró la presencia de metanótrofas en diversos tejidos vegetales desinfectados superficialmente (semillas, raíces y hojas), en distintas condiciones de cultivo (cultivo hidropónico, cultivo en condiciones controladas, cultivo en invernáculo) y en dos variedades de arroz (INIA Olimar e INIA El Paso 144). Asimismo, se promovió la recuperación de metanótrofas fijadoras de nitrógeno utilizando enriquecimientos en medios de cultivo sin fuente de nitrógeno.

Materiales y Métodos

Condiciones de crecimiento de plantas de arroz

Se buscaron bacterias metanótrofas endófitas en plantas de arroz crecidas en diferentes condiciones para determinar si estaban presentes en semilla o si provenían del suelo. Se analizaron plantas de arroz obtenidas mediante tres tipos de ensayos diferentes que varían en las condiciones de crecimiento (hidropónico, in vitro en maceta, en invernáculo), variedad de arroz utilizada (INIA Olimar e INIA El Paso 144), edad de la planta (10, 76 y 90 DAS) entre otros parámetros resumidos en la Tabla 4.1. A continuación se describen los ensayos realizados.

Ensayo in vitro en condiciones hidropónicas

Para realizar este ensayo se utilizaron semillas descascaradas de la variedad INIA Olimar. Éstas fueron hidratadas, desinfectadas superficialmente y enjuagadas cuatro veces con agua esterilizada. Luego, se

colocaron en placas de Petri estériles y se incubaron en la oscuridad durante 4 días para su germinación (ver sección Materiales y Métodos de los capítulos anteriores). Luego de este período, se descartaron aquellas semillas que no habían germinado adecuadamente y se transfirieron asépticamente dos semillas germinadas a cada tubo de vidrio conteniendo 30mL de medio Yoshida estéril diluído al medio (ver Anexo IV), con perlita expandida como sostén (Perliv) y cubierto con tapón de algodón. En total se utilizaron 14 tubos de medio de cultivo, alcanzando un total de 28 plantas de arroz.

Se verificó la eficiencia de la desinfección superficial de las semillas mediante impresión y rotación de éstas en medio sólido R2A (Difco ®) e incubando las placas durante 72hs a 30°C, no obteniéndose evidencias de crecimiento.

Los tubos de medio Yoshida diluído se incubaron en fitotrón durante 10 días (25°C, 80% de humedad, fotoperíodo luz/ oscuridad de 16/8hs) verificando diariamente el mantenimiento del volumen de medio de cultivo. Se utilizaron 4 plantas correspondientes a dos tubos para los análisis posteriores.

Ensayo en invernáculo

En este caso, se utilizó el ensayo descrito en el capítulo II (ver Sección Materiales y Métodos del mencionado capítulo) para abordar la búsqueda de metanótrofos endófitas. Este ensayo también fue realizado con semillas de arroz INIA Olimar (sin desinfectar). El muestreo se realizó un mes después de inundado, 76 días después de sembrado (DDS). Se tomaron muestras de hojas y raíces de arroz de arroz fertilizado de cuatro replicados, y adicionalmente se tomaron muestras de un control sin fertilización. En la Tabla 4.1 se puede ver el resumen de las características del ensayo, las muestras analizadas y los análisis realizados.

Ensayo en fitotrón utilizando suelo

En este caso se utilizó la variedad de arroz INIA El Paso 144. El ensayo utilizado se realizó conjuntamente con el descrito en el capítulo III de esta tesis, compartiendo lo descrito en materiales y métodos del mencionado capítulo. El suelo utilizado corresponde al S1 (suelo con historia de arroz proveniente del este del país), cuyas propiedades fisicoquímicas son detalladas en el capítulo III.

Luego de 25 días de incubación del ensayo general descrito en el capítulo III, se transplantaron las plantas de arroz a seis macetas de mayor tamaño conteniendo dos plantas por maceta y aprox. 700g de suelo húmedo. Asimismo, luego del transplante se realizó una segunda aplicación de fertilizante disuelto en agua (20Kg N/ha (urea), 60Kg de P/ha (Na_2HPO_4) y 10Kg de K/ ha (KCl)) y de funguicida Conzerto® (Kresoxim-metil + Tebuconazol) en una concentración equivalente a 1L/ha de acuerdo a las indicaciones del producto. A los 40 DDS, tres de las macetas fueron inundadas y tres permanecieron sin inundar hasta alcanzar los 90 DDS, cuando las plantas de arroz fueron procesadas.

Muestreo y desinfección de plantas

Las muestras de tejidos vegetales obtenidas de los 3 ensayos fueron desinfectadas superficialmente como ya se indicó y luego se realizaron los enriquecimientos que se describen a continuación y cuyas condiciones se resumen en la Tabla 4.1.

Asimismo, para las muestras del ensayo in vitro con suelos y del ensayo en invernáculo, se tomaron muestras de los diferentes replicados.

En el caso del ensayo hidropónico se realizó un pool de 4 plantas que luego fueron desinfectadas superficialmente como fue explicado anteriormente.

Detección molecular de los genes *nifH* y *pmoA*

Para la amplificación del gen *nifH* se preparó una mix conteniendo: buffer para la Taq polimerasa (Fermentas) 10x, MgCl_2 2.5 mM (Fermentas); BSA (Roche) 0.2 mg ml^{-1} , dNTPs (Fermentas) 0.2 mM de cada uno, 0.1 μM de cada primers PolF y PolR (Poly et al. 2001a), Taq DNA polimerasa 0.05 u μl^{-1} (Fermentas) y agua milliQ estéril. El ciclo térmico utilizado consistió en: 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos (94°C durante 1 minuto), (57°C durante 1 minuto) y (72°C durante 1 minuto); un etapa de extensión final de 72°C durante 10 minutos y 15 min a 4°C. Se utilizó 1 μL de ADN (muestra original o diluída 1/10). Se utilizó un termociclador automático (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cyclers, Singapur) para realizar todas las reacciones de amplificación.

La amplificación del gen *pmoA* se realizó de acuerdo a Ferrando y Tarlera, 2009. La mezcla de reacción contuvo 1 μL de ADN (muestra original o diluída 1/10), 3 μL Buffer Taq Polimerasa Fermentas, MgCl_2 1,5mM, dNTP 0,17mM de cada uno, 0,4 μM de cada primer (A189gcf y A661r, Auman et al. 2000) y 1,2U Taq Polimerasa Fermentas.

En ambos casos, para verificar la presencia del amplicón de interés (360pb en el caso del gen *nifH* y 490 pb para el gen *pmoA*), los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 1.5% (Agarose I, Amresco), conteniendo bromuro de etidio (concentración final de 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en buffer TBE 0.5x a 100V durante 25 minutos, usando como patrón de peso molecular, el marcador GeneRuler 50bp (Fermentas).

Cuantificación de *pmoA* en tejidos vegetales

Optimización de q-PCR para el gen *pmoA*

Preparación de estándar para la cuantificación de genes *pmoA*

El producto de PCR del gen *pmoA* obtenida a partir de la cepa *Methylogaea oryzae* (antes llamada metanotroph E10, EU359002) fue clonado utilizando el kit TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp.) mediante electroporación siguiendo las indicaciones del fabricante. Del total obtenido, se seleccionaron al azar diez clones para verificar que tuvieran el inserto correcto. Se realizó una amplificación por PCR de los clones seleccionados directamente utilizando los primers T3- T7 contenidos en el kit. Se verificó el tamaño e identidad del inserto mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% y secuenciación posterior del amplicón obtenido con el primer T7 en MacroGen Sequencing Service, Korea. Posteriormente, se realizó la extracción de plásmido usando el kit Purelink Quick Plasmid miniPrep (Invitrogen®) y el tamaño del plásmido con el inserto fue verificado mediante electroforesis en agarosa 1,5%.

Posteriormente se realizó por triplicado una PCR a partir del plásmido extraído utilizando los primers T3-T7. Se hizo un pool de los productos de PCR obtenidos y nuevamente se verificó el tamaño del amplicón por electroforesis, seguido de la purificación del producto mediante columna MICROCON®100. El producto eluido se llevó a 90µL con agua MilliQ estéril y se cuantificó mediante el Qubit dsDNA HS Assay kit en un Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen®). El número de copias fue calculado teniendo en cuenta el largo total del fragmento (inserto mas fragmentos del vector flanqueando el sitio de inserción), el peso molecular del amplicón y el número de Avogadro. El estándar de *pmoA* así preparado, fue alícuotado por 2 µL y almacenado a -20°C para ser usado como estándar en todas las cuantificaciones por qPCR ($2,67 \times 10^{10}$ copias de *pmoA*. µL⁻¹)

Cuantificación de genes *pmoA*

La cuantificación de genes *pmoA* se realizó mediante q-PCR utilizando los primers A189gc y A661r (Auman et al. 2000). Todas las cuantificaciones fueron llevadas a cabo en un equipo Rotor-Gene® 6000, model 5-Plex (CORBETT Research, Sidney) con detección mediante Sybr Green I. La amplificación se realizó en un volumen final de 10 µL conteniendo 1 µL de ADN (concentrado, diluido 1/10 o 1/100), 1µM de primers, y 5 µL de la mix Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se realizó una curva estándar en cada corrida de q-PCR realizando triplicados de cada punto (diluciones estándar de 10^{-5} a 10^{-10}). En cada corrida se incluyeron controles negativos, sin agregado de ADN molde. El ciclo térmico utilizado consistió de una etapa inicial de 5 min a 95°C seguidos de 40 ciclos: 35°C 5s; 60°C 10s; 82°C 1s. La señal de fluorescencia fue adquirida una vez por ciclo después de la etapa de hibridación- extensión, para lo cual se agregó una etapa adicional a 82°C, 1s, para evitar la contribución de los dímeros de primers observados entre 60 y 70°C en la curva de melting realizada. Para verificar la especificidad de la reacción, al final de cada corrida se realizó una curva de melting incrementando la temperatura de 60 a 94°C a una tasa de 1°C por segundo. Se consideró como específico un producto obtenido en el rango de 85 y 92°C. La especificidad de los productos de q-PCR obtenidos para las raíces y hojas de arroz fue verificada además mediante la presencia de una única banda de tamaño correcto mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% durante la optimización de la técnica. Los resultados de la cuantificación para los duplicados realizados por cada muestra fueron promediados y corregidos por la dilución realizada y los resultados se expresaron por ng de ADN total extraído para poder comparar los resultados de hoja y raíces ya que, como ya fue mencionado, se observaron diferencias en el contenido o la eficiencia de extracción de ADN de los distintos tipos de muestras. El límite de detección fue establecido en $3,2 \times 10^0$ copias de *pmoA*. µL de ADN⁻¹ o $5,3 \times 10^1$ copias de *pmoA*. g tejido fresco⁻¹. Se puede encontrar información adicional y figuras suplementarias en el Anexo II.

Muestras y condiciones de ensayos							Detección y cuantificación molecular en tejidos vegetales			Detección y análisis en enriquecimientos					
Muestras	Tipo de ensayo	Tratamiento de semillas utilizadas	Variedad de arroz INIA	Fertilización	Etapas del cultivo y edad de la planta (DDS)	Tejido analizado	Detección gen <i>nifH</i>	Detección gen <i>pmoA</i>	q-PCR <i>pmoA</i>	Detección gen <i>nifH</i>	Detección gen <i>pmoA</i>	Actividad metanótrofa	Clonado pool de genes <i>pmoA</i>	T-RFLP <i>pmoA</i>	Secuenciación directa de genes <i>nifH</i> y <i>pmoA</i>
SO ^a	nc	DS	O	nc	nc	semilla	X	X	X	nd	X	X	Nd	nd	nd
HidroH ^a	Hidropónico	DS	O	nc	(10)	hoja	nd	nd	nd	nd	X	X	Nd	nd	nd
HidroR ^a	Hidropónico	DS	O	nc	(10)	raíz	nd	nd	nd	nd	X	X	Nd	nd	nd
InvIFH ^a	Invernáculo	NDS	O	F	In (76)	hoja	X	X	X	nd	X	X	X	X	nd
InvIFR ^a	Invernáculo	NDS	O	F	In(76)	raíz	X	X	X	nd	X	X	Nd	X	nd
InvINFH ^a	Invernáculo	NDS	O	NF	In(76)	hoja	X	X	X	nd	X	X	X	X	nd
InvINFR ^a	Invernáculo	NDS	O	NF	In (76)	raíz	X	X	X	nd	X	X	Nd	X	nd
FitHNA ^b	Fitotrón	NDS	EP144	F	In (90)	Hoja	X	nd	nd	X	X	X	Nd	nd	X
FitHN2 ^c	Fitotrón	NDS	EP144	F	In (90)	hoja	X	nd	nd	X	X	X	Nd	nd	X
FitRNA ^b	Fitotrón	NDS	EP144	F	In (90)	raíz	X	nd	nd	X	X	X	Nd	nd	nd
FitRN2 ^c	Fitotrón	NDS	EP144	F	In (90)	raíz	X	nd	nd	X	X	X	Nd	nd	nd

Tabla4.1. Ensayos utilizados, características del cultivo y de enriquecimientos metanótrofos realizados y determinaciones de actividad, presencia, diversidad y abundancia de metanótrofas y diazótrofas. DS: desinfección superficial; NDS: no desinfectadas superficialmente; O: variedad INIA Olimar; EP144: Variedad El Paso 144; F: fertilizado; NF: no fertilizado; In: Muestras tomadas luego de la inundación del cultivo; nc: no corresponde; nd: no determinado; X: indica que se realizó la determinación. ^aKNO₃, ^bNH₄NO₃, ^cN₂ utilizados como fuente de nitrógeno en enriquecimientos.

Enriquecimientos de bacterias metanótrofas

Búsqueda de metanótrofos endófitos de semilla, raíces y hojas de arroz

Los enriquecimientos se realizaron a partir de semilla de arroz y de muestras de hojas y raíces de tres ensayos diferentes (ensayo hidropónico, en invernáculo e in vitro con suelos). Se realizó un pool de 4 plantas para las muestras del ensayo en invernáculo y un pool de 2 plantas para las muestras del ensayo in vitro con suelos, en ambos casos se tomó una planta de cada replicado.

Luego de la desinfección del material vegetal correspondiente (semillas, hojas o raíces), se realizó la maceración de 5g de material (1g en el caso de la semilla) en condiciones asépticas con 25mL de medio de cultivo Nitrate Mineral Salt sin fuente de nitrógeno (ver composición del medio NMS y sus variantes en Anexo IV) diluido 1/5 en mortero estéril. El macerado se dispensó por 2,5 y 5,0 mL, por duplicado en viales estériles de 120mL con tapón de algodón. Se incubaron aeróbicamente con agitación durante 3 días a 30°C para agotar sustratos endógenos que pudieran ser utilizados por bacterias heterótrofas, que interfieren con el crecimiento de las metanótrofas ya que consumen el oxígeno disponible.

Luego de transcurrido ese tiempo, se realizaron diluciones sucesivas al décimo en medio de cultivo NMS (con diferentes fuentes de N), desde la dilución -1 hasta la dilución -7 en tubos con tapa de rosca y septo de goma. De esta forma se intentó obtener enriquecimientos con menos microflora contaminante.

También se incubó el macerado original sin diluir (dil0) después de la incubación de 3 días. Se agregaron 20mL de medio de cultivo NMS 1/5 con la fuente de nitrógeno correspondiente. Se taparon los viales con tapón de butilo previamente esterilizado y se precintaron.

Todos los enriquecimientos se realizaron por duplicado y se les adicionó metano (AGA, 99,995% pureza) en una concentración de 7% (v/v). Los viales se incubaron horizontales a 30°C con agitación recíproca.

Se realizó la determinación de la concentración inicial de metano en el headspace y el seguimiento del consumo de metano y de los niveles de oxígeno disponibles mediante muestreo del headspace y determinación por cromatografía gaseosa hasta los 30 días de incubación. En caso de detectarse una disminución importante en los niveles de oxígeno, se abrieron los viales asépticamente de manera de oxigenar la atmósfera y luego se volvieron a cerrar y a agregar metano. Se utilizó un cromatógrafo SRI 8610 con detector de conductividad térmica (TCD). Se utilizó Argón como gas carrier, una columna Molec. Sieve 13x Chrompack con el horno a 35°C y una temperatura del filamento del detector de 100°C.

Mantenimiento de enriquecimientos activos y aislamiento de bacterias metanótrofas endófitas

Los enriquecimientos de metanótrofas endófitas obtenidos a partir del ensayo en invernáculo, se mantuvieron mediante subcultivos periódicos inoculando con un 10% del volumen de medio NMS. Se verificó la actividad en cada subcultivo mediante GC/TCD. Luego de 5 o 6 repiques sucesivos no se

observó consumo de metano. Debido a esta pérdida de viabilidad de los enriquecimientos se cambió la estrategia para el siguiente enriquecimiento planteado (ensayo in vitro con suelos).

Para el enriquecimiento a partir del ensayo in vitro utilizando suelos, los subcultivos se realizaron utilizando de 30 a 50% de inóculo. Esta estrategia permitió mantener la actividad del enriquecimiento original hasta 3 repiques sucesivos. Además, se mantuvo el enriquecimiento inicial agregando medio de cultivo fresco y metano una vez que se verificaba el consumo del metano agregado inicialmente. Esto funcionó durante 3 agregados sucesivos de medio de cultivo fresco, luego se pasó a un nuevo vial con medio fresco y se perdió la actividad.

Para el aislamiento de bacterias metanótrofas endófitas a partir de los enriquecimientos realizados se utilizaron dos estrategias:

- 1) Dilución por dilución hasta extinción en medio líquido. Se realizaron diluciones 1/10 hasta extinción (dil0 a dil-7) en medio de cultivo NMS² adicionando 7% de metano y se realizó el seguimiento de los cultivos por GC/TCD y microscopía de contraste de fases. Apenas comenzó el consumo activo de metano se realizaron nuevamente subcultivos en medio NMS y así sucesivamente al menos 4 veces.
- 2) Aislamiento en medio NMS sólido y purificación. Luego de la primera serie de diluciones seriadas en medio NMS líquido que presentaron crecimiento y actividad metanótrofa, se realizó aislamiento por estrías en medio sólido incubado en jarra con atmósfera aerobia conteniendo al menos 10% metano. Luego de la incubación durante 10 días a 30°C, se observaron las colonias presuntivas de corresponder a metanótrofas mediante observación microscópica de contraste de fases y se intentó verificar la pureza y la actividad oxidadora de metano mediante inoculación en medio NMS líquido con agregado de metano, incubación a 30°C y monitoreo de consumo de metano por GC/TCD.

Caracterización molecular de los enriquecimientos

Se realizó la caracterización de los enriquecimientos obtenidos en las diferentes instancias utilizando diferentes métodos moleculares como se detallan a continuación y en la Tabla 4.1.

Se extrajo ADN utilizando 2mL de cada uno de los enriquecimientos mediante el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Detección de genes *pmoA* y *nifH*

Se realizó la amplificación de los genes *pmoA* y *nifH* por PCR convencional a partir del ADN extraído de los enriquecimientos detallados en la Tabla 4.1 como fue explicado anteriormente para los tejidos vegetales.

²Se mantuvo la fuente de nitrógeno que se había adicionado, si correspondía, al medio de enriquecimiento original.

Se realizó la detección del gen *pmoA* para todos los enriquecimientos realizados.

En el caso de la detección de genes *nifH*, ésta se realizó para todos los enriquecimientos obtenidos a partir de hojas y raíces de arroz provenientes del ensayo in vitro con suelos, con o sin agregado de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno (enriquecimientos FitHNA, FitHN2, FitRNA, FitRN2).

T-RFLP del gen *pmoA*

Se utilizó el T-RFLP del gen *pmoA* para caracterizar la diversidad de bacterias metanótrofas presente en los enriquecimientos obtenidos del ensayo en invernáculo, tanto de raíces como de hojas de arroz, en suelo fertilizado y no fertilizado. Se caracterizaron las poblaciones de los enriquecimientos InvIFR dil0, InvINFR dil0, InvIFH dil-1, InvINFH dil-1 (Tabla 4.1), cuyos subcultivos mantuvieron la actividad después de 6 repiques sucesivos. Se incluyó en el análisis una cepa metanótrofa control del género *Methylocystis* (cepa H8), aislada en un trabajo anterior de un ecosistema arrocerero uruguayo (Ferrando y Tarlera, 2009). La técnica se llevó a cabo utilizando los mismos primers mencionados anteriormente para la detección del gen *pmoA* pero en este caso el primer A189gc utilizado estaba marcado en 5' con 6-carboxyfluoresceína. Las condiciones utilizadas para la amplificación por PCR, restricción con *MspI* y análisis de los datos son las descritas previamente por Ferrando y Tarlera (2009). Se realizaron triplicados técnicos (25 µL por reacción) de la amplificación que luego se mezclaron, concentraron y digirieron con *MspI*. Las muestras se analizaron en MACROGEN Korea utilizando el estándar de tamaño de fragmentos de ADN 500LIZ para asignar correctamente en cada corrida el tamaño de los fragmentos terminales marcados (T-RFs). Se analizaron los datos mediante el software PeakScanner®.

Los T-RFs menores de 45pb fueron descartados así como los picos con alturas menores de 200 unidades de fluorescencia. Se estandarizaron los datos de acuerdo a Dunbar et al. (2001). Brevemente, la intensidad total de fluorescencia presente en cada cromatograma se comparó con la obtenida para los demás y los datos de T-RFLP fueron estandarizados por un factor según el que presentó menor valor.

Clonado y secuenciación del *pmoA*

Se realizó el clonado del gen *pmoA* en las muestras de enriquecimientos de hojas de arroz inundado del ensayo de invernáculo en dos condiciones: fertilizado (InvIFH) y sin fertilizar (InvINFH). Se obtuvo el producto de PCR como fue explicado anteriormente y se clonó utilizando el kit TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron aproximadamente 100 clones para verificar que contuvieran el inserto del tamaño del gen de interés. Se realizó una PCR con los primers T3- T7 proporcionados junto con el kit de clonado y se verificó el tamaño del fragmento amplificado en gel de agarosa 1,5% en TBE 0,5x durante 30 min a 100v. Posteriormente, para aquellos clones que presentaron el fragmento de tamaño adecuado, se realizó una nueva PCR con los primers específicos para el gen *pmoA*, como fue detallado anteriormente. Finalmente, se secuenciaron los clones positivos en MacroGen Sequencing Service, Korea, que utiliza un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Secuenciación directa de genes *pmoA* y *nifH*

Para los enriquecimientos de hoja obtenidos del ensayo in vitro utilizando suelos, en los que se detectó la presencia de bacterias metanótrofas en ausencia de nitrógeno disuelto por actividad y presencia del gen *pmoA*, se realizó la amplificación directa (a partir de ADN extraído de los enriquecimientos) por PCR de los genes mencionados como ya fue explicado y se secuenció en Macrogen, Korea utilizando el primer A189gcf.

Asimismo, se realizó la secuenciación directa del gen *nifH* para esas mismas muestras como fue descrito anteriormente y se secuenció en Macrogen, Korea utilizando el primer PolF.

Las secuencias fueron depuradas y comparadas con las secuencias de la base de datos del ncbi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para su identificación.

Resultados y Discusión

Detección y Abundancia de genes *pmoA* en semillas, raíces y hojas de arroz

La cuantificación de genes *pmoA* en los tejidos de plantas de arroz provenientes del ensayo en invernáculo mostró que este gen se encuentra en concentraciones menores al límite de detección de la PCR cuantitativa optimizada ($3,2 \times 10^0$ copias de *pmoA*. μL de ADN⁻¹ o $5,3 \times 10^1$ copias de *pmoA*. g tejido fresco⁻¹).

Los resultados obtenidos por q-PCR y PCR convencional del gen *pmoA* fueron coincidentes para las hojas y semillas de arroz, mostrando que este gen se encuentra en muy baja concentración o ausente en estos tejidos. En cambio, mientras los resultados obtenidos por q-PCR de las raíces de arroz indican que el número de copias del gen *pmoA* presente en este tejido se encontró por debajo del límite de detección de la q-PCR, se obtuvo una débil amplificación mediante PCR convencional. Esta incoherencia resulta difícil de explicar. La presencia de inhibidores no parece ser un factor que esté afectando ya que en la cuantificación se probaron diferentes diluciones del ADN extraído (0 a -2), no observándose cambios en los resultados. Es posible que los ADN extraídos hayan sufrido cierta degradación parcial dado que han sido sometidos a sucesivas etapas de descongelado- congelado durante su almacenamiento y utilización. La cuantificación por q-PCR fue optimizada mucho tiempo después que la detección por PCR convencional y esto sumado a lo antes mencionado pueden haber causado que no se detectaran niveles apreciables del gen *pmoA* en estas muestras.

De forma general se puede decir que a pesar del alto número de bacterias metanótrofas encontrado a nivel de la rizósfera de arroz por diversos autores (Eller y Frenzel 2001; Ferrando y Tarlera, 2009), sólo unas pocas serían capaces de colonizar la planta de arroz, manteniéndose en números bajos en todos los tejidos de la planta de arroz.

Detección genes *nifH* en semillas, raíces y hojas de arroz

Los resultados de la detección de genes *nifH* en las muestras de hojas y raíces de arroz de los ensayos en invernáculo e in vitro con suelos, son los obtenidos en los capítulos II y III, respectivamente, y fueron comentados anteriormente pero se resumen en la Tabla 4.2 junto con los de semilla de forma de poder comparar los resultados.

Se detectó la presencia del gen *nifH* en raíces y hojas de arroz de ambos ensayos, no siendo así en el caso de la semilla de arroz, para la cual la amplificación de este gen dió negativo.

Enriquecimientos de bacterias metanótrofas

La búsqueda de metanótrofas endófitas se realizó sobre diferentes tejidos vegetales desinfectados superficialmente (semillas, raíces y hojas) correspondientes a dos variedades de arroz (INIA Olimar e INIA El Paso 144), en dos condiciones de fertilización (fertilizado y no fertilizado), y en plantas de arroz crecidas en diferentes tipos de ensayos (hidropónico, in vitro con suelo y en invernáculo). Se utilizaron dos fuentes de nitrógeno diferentes para el enriquecimiento para tratar de ampliar el rango de metanótrofas recuperadas por cultivo (Hanson & Hanson, 1996) y también se utilizaron medios de cultivo sin nitrógeno agregado. En todos los casos se recuperaron especies metanótrofas Tipo II muy relacionadas entre sí, que se discutirán en más detalle en las secciones siguientes, indicando que la estrategia no fue adecuada o no hay gran diversidad de metanótrofas endófitas.

Asimismo, de la serie de diluciones sembradas (dil0 a dil-7) a partir del macerado de material vegetal, sólo se recuperaron metanótrofas en las diluciones 0 y -1. Esto indica que, el grupo de bacterias que puede crecer en las condiciones utilizadas se encuentra en bajo número. Esto concuerda con los resultados discutidos en la sección anterior.

La actividad de las bacterias metanótrofas sólo se observó en plantas crecidas en suelo. No se obtuvieron evidencias de crecimiento ni consumo de metano cuando se intentó obtener enriquecimientos a partir de las semillas y tejidos vegetales provenientes del experimento hidropónico. Además, la detección molecular mediante amplificación del gen *pmoA* a partir del ADN extraído de estos tejidos y de los enriquecimientos realizados de este ensayo resultó negativa.

Estos resultados sugieren que la fuente principal de bacterias metanótrofas encontradas dentro de la planta de arroz es el suelo circundante, detectándose mediante enriquecimiento desde etapas tempranas del crecimiento de la planta y permaneciendo asociadas al cultivo al menos hasta los tres meses después de la siembra. De acuerdo a los resultados obtenidos y a las metodologías utilizadas en este trabajo, la presencia de bacterias metanótrofas en la semilla quedaría descartada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que algunas metanótrofas pueden no ser detectadas utilizando las metodologías planteadas, ya sea por el sesgo conocido que presentan los métodos de cultivo o por la ausencia del gen *pmoA* descrito para algunas cepas metanótrofas (*Methylocella palustris* y *Methyloferula stellata*; Dedysh et al. 2000 y Vorobev et al. 2010, respectivamente).

La presencia del gen *pmoA* fue confirmada en todos los enriquecimientos realizados a partir de los dos ensayos en suelo. Los enriquecimientos metanótrofos mostraron actividad oxidadora de metano entre 7 y 10 días después de iniciada la incubación en el caso de las raíces y a partir de los 15 días para los correspondientes a las hojas de arroz. Se detectó entre 30 y 100% de consumo de metano para los diferentes enriquecimientos obtenidos.

Muestras	Resultado de determinaciones en tejidos vegetales			Enriquecimientos y resultados de análisis realizados						
	Detección gen <i>nifH</i>	Detección gen <i>pmoA</i>	q-PCR <i>pmoA</i>	Detección gen <i>nifH</i>	Detección gen <i>pmoA</i>	Actividad metanótrofa	Secuencias del gen <i>pmoA</i> detectadas por clonado (N° Acceso)	Secuencias del gen <i>pmoA</i> del NCBI más similares a las detectadas por Clonado (>95%, N° Acceso)	Secuencias del gen <i>pmoA</i> detectadas por SDE (N° Acceso)	Secuencias del gen <i>pmoA</i> de NCBI más similares a las detectadas por SDE (>95%)
InvIFH ^a	+	-	< LD	+	Nd	+	Clones IFH 90, 7, y 102 (JX481163, JX481164, JX481165)	Methanotroph C9 (EU359001), <i>Methylosinus trichosporium</i> (AJ459037, AJ459021)	nd	nd
InvIFR ^a	+	+	(tenue)	+	Nd	+	nd	Nd	nd	nd
InvINFH ^a	+	-	< LD	+	Nd	+	Clones INFH 35, 23 y 11 (JX481160, JX481161, JX481162)	Methanotroph C9 (EU359001)	nd	nd
InvINFR ^a	+	+	(tenue)	+	Nd	+	nd	Nd	nd	nd
FitHNA ^b	+	Nd	nd	+	+	+	nd	Nd	CNH1 (JX481157)	Methanotroph C9 (EU359001)
FitHN2 ^c	+	Nd	nd	+	+	+	nd	Nd	SNH1, SNH2 (JX481159, JX481158)	<i>Methylosinus trichosporium</i> (AJ459037), <i>Methylocystis hirsuta</i> (DQ364434)
FitRNA ^b	+	Nd	nd	+	+	+	nd	Nd	+ ^d	nd
FitRN2 ^c	+	Nd	nd	+	+	+	nd	Nd	+ ^d	nd

Tabla4.2. Resultados de las determinaciones realizadas sobre tejidos vegetales y enriquecimientos metanótrofos para los distintos ensayos realizados y condiciones utilizadas.+: indica un resultado positivo del análisis; -: indica un resultado negativo del análisis; LD: límite de detección=5,3x10¹ copias de *pmoA*. g tejido fresco⁻¹ ;SDE: secuenciación directa de amplicón del gen *pmoA* obtenido a partir de enriquecimientos; nc: no corresponde; nd: no determinado; ^a KNO₃, ^b NH₄NO₃, ^c N₂ utilizadas como fuente de nitrógeno en enriquecimientos;^d se obtuvo resultado positivo de la amplificación pero no se secuenciaron.

Aislamiento de metanótrofas endófitas

A pesar de sucesivos intentos, no fue posible obtener cultivos puros que pudieran caracterizarse. Las estrategias empleadas para el aislamiento (dilución hasta extinción, repiques sucesivos apenas se verificaba consumo de metano, y aislamiento en medio sólido), aunque habían sido exitosamente utilizadas en otras oportunidades, no dieron buenos resultados en este caso. Se intentó aislar cepas metanótrofas mediante dilución hasta extinción en medio NMS líquido y sólido. A pesar de los subcultivos frecuentes, o por causa de ellos, los últimos subcultivos no presentaron actividad metanótrofa, por lo que no fue posible aislar bacterias metanótrofas por este método. Se obtuvieron cultivos altamente enriquecidos en metanótrofas pero no fue posible eliminar la flora acompañante, como por ejemplo bacterias del género *Hyphomicrobium*, metilótrofas de morfología característica, que se encuentran comúnmente como contaminantes de cultivos de metanótrofas. Adicionalmente, se observó también que luego de 5 o 6 repiques, los enriquecimientos perdían actividad, por lo cual no fue posible mantenerlos viables. Es factible que las metanótrofas endófitas necesiten componentes de la planta que no están presentes en el medio de cultivo y que la dilución de estos componentes en los subcultivos sucesivos resulte en un medio inadecuado para el crecimiento de estas bacterias. El agregado de medio de cultivo fresco y de metano sobre el enriquecimiento original tampoco resultó, ya que no es posible agregar medio fresco indefinidamente (se realizó tres veces) y además los desechos metabólicos pueden resultar tóxicos. Un resultado similar se obtuvo cuando se realizaron subcultivos con grandes volúmenes de inóculo (30- 50%). Es necesario innovar en las técnicas y condiciones de cultivo a utilizar para tener éxito en el aislamiento de este grupo bacteriano.

Dada la relevancia de recuperar e identificar las metanótrofas que se encuentran como bacterias endófitas de arroz, se decidió caracterizar los enriquecimientos mediante métodos moleculares (Tabla 4.2). Este abordaje permitiría obtener más información sobre el tipo de metanótrofo de que se trata y, eventualmente, mejorar las metodologías para su aislamiento.

Caracterización molecular de los enriquecimientos

Se realizó la caracterización molecular de los enriquecimientos obtenidos en los distintos enriquecimientos ensayados según se indicó en la Tabla 4.1. Los resultados se resumen en la Tabla 4.2.

Diversidad de metanótrofas en hojas y raíces de arroz

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de T-RFLP del gen *pmoA*, en los enriquecimientos de metanótrofas realizados sobre las muestras del ensayo en invernáculo después de inundar (hojas y raíces, fertilizado y no fertilizado) hay un sólo tipo de metanótrofa dominante que presenta un T-RF de 248-249 pb (Figura 4.1). Este fragmento coincide con el obtenido para la cepa H8, que está afiliada al género *Methylocystis* y fue utilizada como control. *Methylocystis* y *Methylosinus*, géneros muy relacionados entre sí pertenecientes a las metanótrofas Tipo II, presentan un T-RF teórico de 244- 245 pb. Por lo tanto, se puede asignar el fragmento terminal observado en los enriquecimientos de hojas y raíces de arroz, tanto fertilizado como no fertilizado, a una o más especies de los géneros mencionados.

Los restantes T-RFs observados no fue posible asignarlos a ningún género o especie, ya que no coinciden con ninguno de los fragmentos terminales que se obtienen por restricción teórica de las secuencias *pmoA* disponibles a la fecha en la base de datos, pudiendo corresponder a especies metanótrofas nuevas.

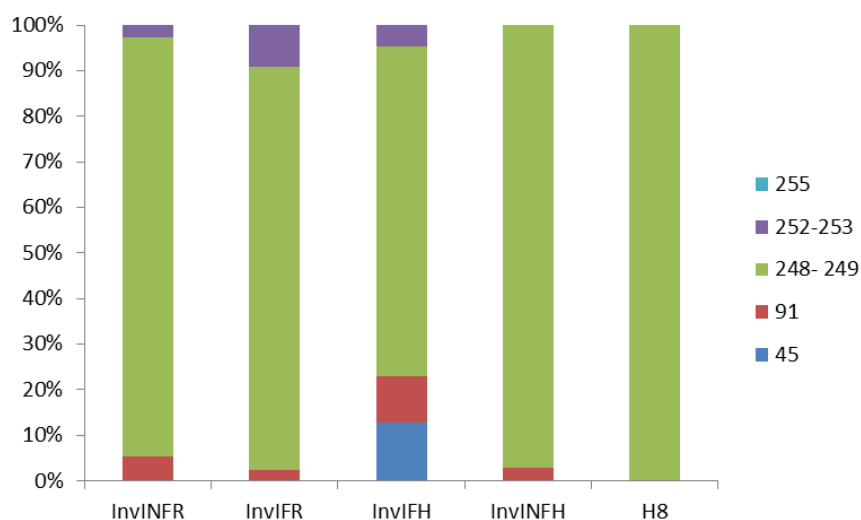


Figura4.1. Porcentaje relativo de los diferentes T-RFs obtenidos por T-RFLP del gen *pmoA* con *MspI*. Cada color indica un tamaño de fragmento diferente (pb). Inv: Ensayo Invernáculo; I: inundado; F: Fertilizado; NF No Fertilizado; R: raíz; H: Hoja. H8: cepa control *Methylocystis* spp.

Composición de enriquecimientos metanótrofos obtenidos: clonado gen *pmoA*

El clonado del gen *pmoA* realizado sobre los enriquecimientos de hojas de arroz variedad Olimar, inundado con y sin aplicación de fertilizante nitrogenado proveniente del ensayo en invernáculo (InvIFH e InvINFH), presentó dificultades. Se obtuvo una muy baja eficiencia de clonado del producto de interés. Se analizaron aproximadamente 100 clones de cada genoteca mediante PCR con los primers del vector T3-T7 para verificar el tamaño del inserto. Para aquellos clones con inserto del tamaño correcto, posteriormente se realizó una amplificación por PCR con primers específicos para el gen *pmoA*. Este screening arrojó que la mayoría de los clones obtenidos no presentaban el tamaño de inserto correcto y/o el inserto no correspondía al gen *pmoA*. Del total de clones analizados, finalmente sólo fue posible secuenciar 3 clones de cada condición de fertilización (INFH11, INFH23, INFH35 para InvINFH e IFH7, IFH90, IFH102 para InvIFH).

Se detectaron secuencias relacionadas a *Methylosinus trichosporium* (AJ459037 y AJ459021, >95% Identidad), y a la metanótrofa C9 (EU359001, 99% Identidad). La cepa C9 es una alfa-proteobacteria que fue previamente aislada de la rizósfera de arrozales uruguayos por Ferrando y Tarlera (2009), relacionada al género *Methylocystis*. La cepa de *Methylosinus trichosporium* M23 (AJ459037) se encontró asociada a raíces de mangles (Heyer et al. 2002). En el enriquecimiento realizado a partir de hojas fertilizadas, se detectó la presencia de secuencias similares a *Methylosinus trichosporium* y a la metanótrofa C9. En cambio, en la genoteca proveniente del enriquecimiento de hojas sin fertilizar la metanótrofa C9 fue la

que presentó la secuencia más similar a los clones recuperados. Las secuencias del gen *pmoA* pertenecientes a la metanótrofa C9 y a las cepas de *Methylosinus trichosporium* se encuentran muy relacionadas (>96% Identidad) lo cual podría indicar que la diversidad de metanótrofas endófitas que habitan las hojas de arroz es baja.

Secuenciación directa de los genes *nifH* y *pmoA* para enriquecimientos metanótrofos

La observación microscópica de los enriquecimientos reveló la presencia de distintas morfologías, pero como ya fue mencionado, no se tuvo éxito en el aislamiento de las cepas por lo que se decidió verificar si la diversidad de morfologías observadas se debía a metanótrofas diazótrofes o si correspondía a flora acompañante. Se detectó la presencia de genes *nifH*, además del gen *pmoA*, en los enriquecimientos metanótrofos realizados para hojas y raíces de arroz del ensayo in vitro con suelo, tanto para los que contenían nitrato de amonio como fuente de nitrógeno (FitHNA y FitRNA), como para los que no tenían fuente de nitrógeno adicionado (FitHN2 y FitRN2) (Tabla 4.2).

Hasta el momento sólo se secuenciaron genes *pmoA* y *nifH* provenientes de los enriquecimientos duplicados de hoja sin nitrógeno adicionado (FitHN2) y del control con NH_4NO_3 (FitHNA).

Los resultados obtenidos indican que en cada uno de los dos enriquecimientos metanótrofos analizados existía un solo tipo de metanótrofo pero más de un tipo de fijador de nitrógeno. Esto fue comprobado ya que las secuencias de *pmoA* obtenidas estaban puras. En cambio, en el caso de las secuencias de *nifH*, los cromatogramas presentaron superposición de secuencias y no fue posible identificar a qué especies correspondían. Una de las secuencias de *pmoA* recuperadas (SNH2) dió 99% similar a *Methylosinus trichosporium* M23 (AJ459037), cepa encontrada también en el clonado realizado para los enriquecimientos del ensayo en invernáculo. *Methylocystis hirsuta* CSC1 (DQ364434) fue la otra secuencia 99% similar a la secuencia SNH1 recuperada en la réplica del enriquecimiento. En ambos casos los enriquecimientos de los que provienen no contenían fuente de nitrógeno agregada. Para los enriquecimientos realizados en presencia de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, se obtuvo la secuencia CNH1 99% similar a la metanótrofa C9, también de tipo II, relacionada al género *Methylocystis* y que también fue recuperada en el ensayo en invernáculo. Los géneros *Methylocystis* y *Methylosinus* son fijadores de nitrógeno, como ya fue mencionado en la introducción del presente capítulo, por tanto todas las cepas metanótrofas detectadas presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Los cultivos enriquecidos en cepas metanótrofas se encontraban contaminados con otras cepas fijadoras de nitrógeno, por lo que no pudieron obtenerse las secuencias del gen *nifH* correspondientes.

El gen *nifH* fue detectado en todos los tejidos vegetales analizados (Tabla 4.2) menos en semilla, no siendo así en el caso de del gen *pmoA*, por tanto las metanótrofas fijadoras de nitrógeno no serían una población dominante dentro de las comunidades endófitas fijadoras de nitrógeno presentes en los distintos tejidos vegetales.

Las secuencias del gen *pmoA* recuperadas en la totalidad de los ensayos realizados (invernáculo o ensayo in vitro con suelos, en presencia o ausencia de fuente de nitrógeno, y en dos variedades de arroz) pertenecen a las metanótrofas Tipo II. La capacidad de fijar nitrógeno que presenta este grupo puede ser una ventaja importante a la hora de establecerse dentro de los tejidos vegetales de las plantas, y una

propiedad relevante en la interacción planta- metanótrofa. Aunque se ha reportado que el medio NMS recupera mayoritariamente metanótrofas Tipo II (Bussmann et al. 2004, Lindner et al. 2007), hay que destacar que este medio ha sido utilizado en trabajos anteriores en nuestro laboratorio, y ha permitido aislar la primera bacteria metanótrofa de Tipo I proveniente de ecosistemas arroceros (*Methylogaea oryzae*, Geymonat et al. 2011), por lo que el medio y las condiciones de cultivo no serían tan selectivos para este grupo.

Lüke y Frenzel (2011) encontraron que los suelos de arroz, caracterizados por pirosecuenciamiento del gen *pmoA*, presentaban una gran abundancia de metanótrofas Tipo II (secuencias relacionadas a *Methylocystis* y *Methylosinus*) y que además presentaban una alta diversidad de bacterias metanótrofas Tipo Ib, que incluyen secuencias relacionadas a *Methylocaldum*, *Methylococcus*, *Methylogaea* y *Methylothermus*, y otros grupos de secuencias pertenecientes a organismos no cultivados. Las bacterias metanótrofas se encuentran en alto número asociadas a las raíces de arroz. La densidad de bacterias recuperadas por cultivo de homogeneizados de raíces se encontraría en el rango de 5×10^7 a 2×10^8 metanótrofas. g^{-1} de raíz seca, de acuerdo a Takeda et al. 2008. Esto sugiere que, dado que en el presente trabajo se detectaron metanótrofas en bajo número, sólo una pequeña porción de la población de metanótrofas asociadas a las raíces sería capaz de colonizar los tejidos internos de la planta. Los resultados obtenidos en esta tesis se alínean con los reportados por otros autores ya que dentro de las bacterias metanótrofas, las Tipo II se encontraron como dominantes en rizósfera de arroz y asociadas a las raíces (Eller et al. 2005, Gilbert et al. 1998).

Resulta significativo e interesante el hecho que en este estudio no se hayan recuperado metanótrofas ni de semillas ni de tejidos de arroz crecido en condiciones hidropónicas a partir de semillas desinfectadas sugiere que estas cepas pueden colonizar los tejidos de la planta en etapas tempranas del cultivo desde el suelo debiendo por tanto migrar hasta las hojas de la planta para establecerse allí. Esto indica que la interacción entre estas especies metanótrofas y la planta debe ser fuerte, y deben por esto ser estudiadas en mayor profundidad. Recientemente, Iguchi et al. (2012) encontraron, también mediante detección molecular sobre enriquecimientos metanótrofos, metanótrofas asociadas (endófitas más epifíticas) a hojas, raíces, flores y cortezas de diferentes tipos de plantas. En ese experimento se obtuvieron metanótrofas en 12% de las muestras de filósfera y en el 59% de las muestras de rizoplano. Estos autores sugieren que la abundancia de bacterias metanótrofas en las hojas es baja debido a la escasez de nutrientes o a la competencia con otros microorganismos.

Es necesario considerar también, que la presencia de oxígeno y metano puede no ser el principal factor que favorezca la metanotrofia en los tejidos internos de las plantas sino también la posibilidad de utilizar otros sustratos monocarbonados producto del metabolismo vegetal, como metanol, o eventualmente que pudieran estar presentes metanótrofas facultativas aún no identificadas (Dedysh et al. 2005).

Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se confirmó que las bacterias metanótrofas son endófitas de arroz. Si bien estarían en bajo número, fue posible obtener bacterias metanótrofas activas en enriquecimientos inoculados con

tejidos vegetales. Se detectó la presencia de metanótrofas endófitas tanto en hojas como en raíces de plantas de arroz cultivadas sobre suelo en distintos ensayos (invernáculo y ensayo in vitro con suelos), mediante la caracterización molecular de estos enriquecimientos. Sin embargo, utilizando esta combinación de metodologías, no se detectaron metanótrofas en semillas ni en tejidos de arroz crecido en condiciones hidropónicas. Estos resultados sugieren que el origen de las metanótrofas endófitas no está en la semilla sino en el suelo, existiendo especies metanótrofas de suelo que son capaces de colonizar la planta de arroz y migrar hasta sus hojas durante el crecimiento de la planta para allí establecerse.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las comunidades metanótrofas endófitas de arroz serían poco diversas, a diferencia de las comunidades metanótrofas rizosféricas y de suelo, como fue mencionado en la sección anterior. Si bien el clonado y secuenciación directa del gen *pmoA* se realizaron para enriquecimientos de hoja, los resultados obtenidos del análisis de T-RFLP de los enriquecimientos indican que las raíces presentan un comportamiento similar. Unas pocas cepas metanótrofas de Tipo II, cuyas secuencias del gen *pmoA* se encuentran muy relacionadas entre sí y que presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, están ampliamente distribuidas en los tejidos de arroz cultivado en Uruguay independientemente de la variedad de arroz, la fertilización, el régimen de agua y el tipo de suelo. Las cepas dominantes en los cultivos enriquecidos que fueron caracterizadas mediante clonado o secuenciación directa del gen *pmoA*, se encuentran muy relacionadas a la metanótrofa C9 (aislada previamente de rizósfera de arroz uruguayo), a *Methylosinus trichosporium* M23 y *Methylocystis hirsuta*.

En particular, sería interesante realizar estudios para explorar la interacción que presenta la cepa C9 con la planta de arroz. Su detección en rizósfera y en hoja de arroz podría no ser fortuita, ya que ha sido aislada de ensayos de arroz de diferentes características y llevados a cabo con 10 años de diferencia. Asimismo, se podría profundizar en el estudio de adaptaciones que estas cepas de suelo podrían experimentar para convertirse en endófitas de difícil recuperación por cultivo.

Hasta la fecha se desconoce la contribución de las metanótrofas endófitas a la disminución de las emisiones de metano en los ecosistemas arroceros. Sería interesante determinar si este grupo se encuentra consumiendo metano activamente dentro de los tejidos vegetales.

También es importante considerar que este grupo fisiológico, que hasta el momento ha sido considerado únicamente de relevancia ambiental por mitigar las emisiones de metano, podría presentar otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal, además de la fijación de nitrógeno, que valdría la pena evaluar. En forma general, el rol ecológico de las metanótrofas endófitas debe ser explorado en mayor profundidad.

Discusión y Conclusiones Generales

El trabajo llevado a cabo en esta tesis permite realizar algunas consideraciones generales y reflexiones en relación a la comunidad de bacterias endófitas de arroz y los factores que afectan su composición, abundancia y diversidad. Se abordaron aspectos cuali y cuantitativos de estas comunidades bacterianas, caracterizando tanto la comunidad total como dos grupos fisiológicos importantes de ese ecosistema y combinando metodologías clásicas con métodos moleculares. Se profundizó en distintos factores que pueden afectar la composición y dinámica de estas comunidades en distintas etapas del ciclo de cultivo.

La hoja de arroz es un ambiente selectivo para el establecimiento de comunidades endófitas. Los nutrientes presentes en hojas de plantas maduras están menos disponibles para las bacterias que allí habitan dado que en esa etapa los carbohidratos acumulados en hojas y tallos son direccionados hacia los granos para completar su formación. Estas condiciones pueden seleccionar aquellas bacterias que presenten una interacción más fuerte con la planta y que se adapten fácilmente a los cambios fisiológicos que sufren. Asimismo, hay reportes en la bibliografía que muestran que en etapas tempranas del crecimiento de la planta de arroz la comunidad bacteriana establecida en la parte aérea es más similar a la presente en la semilla, indicando que el origen de estas comunidades, al menos en etapas tempranas, puede estar más ligado a la semilla que al suelo, a diferencia de las comunidades de raíces que sufren gran intercambio de nutrientes y microorganismos con el suelo circundante (Hardoim et al. 2012).

Aunque las poblaciones heterótrofas endófitas de hoja recuperadas por cultivo son abundantes en todas las etapas del cultivo (Loaces et al. 2011), hay grupos fisiológicos bacterianos particulares que se encuentran en bajo número en hojas maduras de arroz, como lo indican los resultados obtenidos para las bacterias diazótrofes tanto por métodos de cultivo (Capítulo I) como por la cuantificación de genes *nifH* realizada mediante q-PCR (Capítulo II). También las bacterias metanótrofes están presentes en bajo número como endófitas de tejidos de plantas de arroz crecidas en suelo, de acuerdo a los resultados de la cuantificación del gen funcional *pmoA* ($<5,3 \times 10^1$ copias del gen *pmoA*.g tejido fresco⁻¹) y a los enriquecimientos de las diluciones originales para las que se verificó actividad metanótrofa (Capítulo IV).

Asimismo, en contraste a lo señalado por Hardoim et al. (2012), en el caso de las bacterias metanótrofes endófitas encontradas en hoja (cepas relacionadas a *Methylosinus trichosporium* M23, *Methylocystis hirsuta* y a la metanótrofa C9 aislada de rizósfera de arroz uruguayo), se puede concluir que este grupo fisiológico no proviene de las semillas ya que no pudo detectarse en este tejido ni en plantas de arroz crecidas en condiciones hidropónicas. Esto sugiere que las metanótrofes encontradas colonizan la planta de arroz desde el suelo y son capaces de migrar hasta tejidos distantes del suelo como hojas y tallos. Además, las cepas detectadas presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico lo cual le aportaría ventajas importantes a la hora establecerse dentro de tejidos vegetales. Hasta la fecha, este trabajo representa el primer reporte de obtención de cultivos altamente enriquecidos de metanótrofes endófitas. A pesar de la dificultad encontrada en la purificación y aislamiento de estas cepas, se abren nuevos horizontes para su caracterización y para explorar la interacción de este grupo bacteriano con la planta de arroz.

Las raíces de arroz albergan una mayor abundancia de bacterias diazótrofes endófitas que las establecidas en hojas. La abundancia de secuencias *nifH* presentes en raíz resultó significativamente

mayor (2 a 4 órdenes logarítmicos) que la presente en hojas de arroz, tanto en plantas jóvenes (Capítulo III) como en plantas maduras (Capítulo II), independientemente de la variedad de arroz estudiada.

La variedad de arroz parece no afectar significativamente ni la abundancia, ni la diversidad y estructura de las comunidades endófitas totales establecidas en las hojas maduras. El número de bacterias endófitas heterótrofas fue cercana a $4 \log_{10}$ u.f.c. g peso fresco⁻¹ en las tres variedades de arroz analizadas. Los perfiles de diversidad obtenidos mediante T-RFLP del gen 16S rRNA, muestran que las comunidades endófitas de las tres variedades son muy similares. Los aislamientos realizados mostraron que un grupo reducido de especies se encontró fuertemente asociado a las hojas de arroz, independientemente de la variedad, en dos ciclos sucesivos de cultivo. *Pantoea* fue el género dominante, aislado de todas las tres variedades y en dos años consecutivos, alcanzando el 44% de los aislamientos realizados seguido por *Pseudomonas* en segundo lugar. Estos resultados sugieren que existiría una fuerte capacidad colonizadora de estas bacterias que estaría involucrada en la selección de este conjunto de bacterias por las distintas variedades de arroz y en diferentes cosechas.

Los grupos filogenéticos dominantes de estas comunidades, obtenidos tanto por cultivo como por clonado del gen 16S rRNA, estuvieron distribuidos entre *Alfa*-, *Beta*- y *Gamaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y el grupo *Cytophaga*- *Flexibacter*- *Bacteroidetes*, siendo *Alfaproteobacteria* la clase dominante de acuerdo a las genotecas de 16S rRNA construidas. Este análisis molecular mostró que *Brevundimonas* es el género dominante, aunque no se obtuvieron aislamientos relacionados a este género.

La inundación del cultivo de arroz luego de 30- 40 días de sembrado constituye una práctica agrícola habitual en nuestro país. Las comunidades diazótrofes que habitan los tejidos internos de las raíces de arroz se vieron fuertemente impactadas por este factor. Se observaron cambios significativos tanto en la abundancia de secuencias *nifH* como en la diversidad y estructura de las comunidades diazótrofes endófitas, determinadas mediante T-RFLP y clonado del gen *nifH*. De acuerdo al análisis de PCA, los perfiles de T-RFLP obtenidos de las raíces de arroz se agrupan de acuerdo al régimen de agua. La comunidad diazótropa endófitas de raíces de arroz sin inundar se encontró ampliamente dominada por secuencias *nifH* afiliadas a *Gammaproteobacteria* (66%, representando *Stenotrophomonas* el 50% de la genoteca del gen *nifH*). En cambio, luego de la inundación del cultivo se dio un cambio drástico en las poblaciones dominantes, tornándose significativamente más diversas. La Clase *Betaproteobacteria* se encontró como dominante, seguida de *Alfa* y *Gammaproteobacteria* (34, 18 y 4%, respectivamente). A diferencia de lo observado para las raíces sin inundar, se obtuvo una gran diversidad de bacterias diazótrofes anaerobias con diferentes metabolismos incluyendo además *Spirochaetas*, *Chlorobi*, *Deltaproteobacteria* y diversos *Firmicutes*. Estos hallazgos sugieren que las bacterias anaerobias podrían tener un papel activo en la fijación de nitrógeno en este ecosistema, cuando se inunda el cultivo y se establecen condiciones anaerobias. Durante el mayor tiempo de vida de la planta, cuando ya casi no se aplican fertilizantes, estas bacterias podrían contribuir a la incorporación de nitrógeno a la planta. Si bien hasta el momento la producción de inoculantes a base de bacterias anaerobias y la inoculación parecen tecnologías sofisticadas, en un futuro podría justificarse explorar esta alternativa.

Dado que las bacterias endófitas provienen principalmente del suelo, la existencia de diferencias en sus propiedades fisicoquímicas puede determinar o afectar a la comunidad de endófitas de las plantas de arroz crecidas en esos suelos. En particular, la abundancia de genes *nifH* presentes en suelos agrícolas se ve afectada por diversos factores como el contenido de materia orgánica, el pH, la historia de uso del suelo así como las prácticas de manejo agrícola utilizadas. Los suelos utilizados en este trabajo provenientes de las tres zonas arroceras de nuestro país (zona norte, este y y noroeste), presentaron diferentes características fisicoquímicas que los separan claramente en dos grupos, de acuerdo al análisis de componentes principales realizado. De acuerdo a los parámetros evaluados para las plantas de arroz (producción de material vegetal y abundancia de genes *nifH*) cultivadas en condiciones controladas en esos suelos, se diferenciaron dos grupos según el contenido de materia orgánica del suelo. Resulta interesante que, mientras la abundancia de secuencias *nifH* en hojas y suelo no se vió afectada por el tipo de suelo utilizado, en el caso de las raíces se pudieron ver diferencias significativas. Las raíces de arroz provenientes de suelos de alta fertilidad con historia previa de cultivo de arroz presentaron mayor cantidad de genes *nifH* que el resto de las raíces, incluso las de plantas crecidas en suelos de alta fertilidad de características fisicoquímicas similares pero que no habían sido utilizados previamente para el cultivo de arroz. Esto sugiere que la historia agrícola del suelo puede afectar, directa o indirectamente, a las poblaciones diazótrofes de raíz. En el caso particular del cultivo de arroz, cuyo sistema de producción incluye rotación con gramíneas forrajeras y leguminosas para alimentación animal, es posible que las comunidades que persisten luego de la alternancia de los distintos cultivos se vea afectada por esta práctica, pudiendo influir en el pool de bacterias disponibles en el suelo para ser captadas por la planta de arroz. Este es un aspecto interesante a explorar.

En general, los grupos fisiológicos bacterianos particulares presentes en los tejidos de la planta de arroz podrían resultar mejores indicadores que las bacterias totales para medir el impacto de distintos factores ligados a las prácticas agrícolas habituales, diferentes variedades de arroz utilizadas, etc. Además, este abordaje permite estudiar las poblaciones endófitas evitando los problemas asociados al estudio de la comunidad total de bacterias endófitas utilizando el gen 16S rRNA como marcador debido a la interferencia de los organelos de la planta.

El estudio realizado permitió profundizar en el conocimiento de las comunidades de bacterias endófitas nativas de arroz y de los factores que las afectan aportando información relevante en la búsqueda de nuevas cepas con potencial biotecnológico y en la racionalización del uso potencial de inoculantes en el cultivo de arroz. El conocimiento obtenido acerca de la composición y dinámica de las comunidades endófitas nativas que están presentes en plantas de arroz sometidas a distintas condiciones de manejo agrícola, cultivadas en suelos de propiedades fisicoquímicas diferentes y con distinta historia de cultivo, permite tener una visión más precisa y realista de la competencia directa que tendrá cualquier microorganismo que pretenda ser utilizado como inoculante de arroz teniendo en cuenta las distintas etapas y condiciones por las que pasa el cultivo.

Anexos

Anexo I

¿Qué integrantes de la comunidad de diazótrofos endófitos arroz se encuentran activos dentro de la planta en diferentes condiciones de manejo de agua? Estudios preliminares

Autores: Ferrando, Lucía y Fernández Scavino, Ana.
Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química, Universidad de la
República. Gral. Flores 2124, Código Postal 11800. Montevideo, Uruguay

Palabras clave: arroz, diazótrofas endófitas, expresión *nifH*, RT-PCR, q-PCR

Objetivos

Debido al marcado cambio observado en la composición de las comunidades diazótrofes endófitas de raíces de arroz luego de la inundación del cultivo (según fue detallado en el Capítulo II de esta tesis), se propuso estudiar qué miembros de la comunidad fijadora de nitrógeno endófitos de arroz se encontraban realmente activos en dos condiciones de manejo de agua diferentes (inundado y sin inundar). En el Capítulo III los análisis se realizaron sobre las plantas en diferente estado fisiológico, antes y después de inundar, tal cual se corresponde con las prácticas agrícolas habituales. En el presente trabajo, se plantea comparar el efecto de la inundación en plantas de arroz en el mismo estadio fisiológico, y evaluar la actividad diazotrofa y expresión de genes *nifH* en los dos tratamientos seleccionados. De acuerdo a esto se plantearon los siguientes objetivos:

Optimizar las metodologías de extracción de ARN y cuantificación de la expresión de genes *nifH* mediante transcripción reversa y q-PCR.

Evaluar la expresión de genes *nifH* de las comunidades diazótrofes endófitas de raíces de arroz provenientes de plantas crecidas en suelos sometidos condiciones de manejo de agua diferentes.

Determinar la actividad fijadora de nitrógeno in planta mediante ensayo de reducción de acetileno (A.R.A.).

Materiales y Métodos

Ensayo en fitotrón utilizando suelo

Se utilizó el ensayo en fitotrón utilizando suelo descrito en el capítulo IV de esta tesis. Se cultivaron plantas de arroz variedad INIA El Paso 144, en condiciones controladas de temperatura (25°C), humedad (80%) y ciclo luz/oscuridad (16/8 hs). A los 40 DDS, tres de las seis macetas (conteniendo 2 plantas de arroz cada una) fueron inundadas (I) y tres permanecieron sin inundar (NI) hasta alcanzar los 90 DDS, cuando las plantas de arroz fueron procesadas.

Muestreo, desinfección y procesamiento de plantas

Se procesaron las muestras de ambas condiciones de manejo de agua, realizando medidas de rendimiento del cultivo (peso fresco y longitud de parte aérea y raíces).

Las muestras de raíces y hojas de los dos tratamientos fueron desinfectadas superficialmente con NaClO 2% como fue explicado anteriormente. Cada replicado fue procesado individualmente, seleccionando una planta de cada replicado para la extracción de ARN y la otra para realizar el ensayo de reducción de acetileno in planta. Las plantas seleccionadas para la extracción de ARN fueron procesadas separando las raíces de la parte aérea y posteriormente se congelaron con N₂ líquido y molieron en mortero estéril previamente enfriado, dispensando el material pulverizado en eppendorfs conteniendo entre 50 y 100mg

de material vegetal. El material vegetal pulverizado y alicuotado fue mantenido a -70°C hasta el momento de la extracción de ARN.

Actividad fijadora de nitrógeno in planta

Ensayo de Reducción de Acetileno in planta

La evaluación de la actividad fijadora de nitrógeno in planta se realizó mediante ensayo de reducción de acetileno (A.R.A., modificado de James et al. 1994).

Se enjuagaron las plantas con agua estéril hasta no observarse desprendimiento de suelo de las raíces. Se realizaron duplicados colocandouna planta de arroz entera por vial de 20mL, con tapón de butilo con septo. A uno de los duplicados se le agregó un 10% (v/v) del volumen del headspace de acetileno (AGA, 99.95% de pureza). El segundo duplicado se utilizó como control de la posible contribución de la planta a la producción de etileno por lo que no se le agregó acetileno. Ambos viales se incubaron a 30°C en la oscuridad. Se evaluó la aparición de etileno a las 24 hs y a los 7 días de incubación mediante cromatografía gaseosa en un cromatógrafoSRI 8610 (Ca, USA) equipado con detector de ionización de llama (con flujo de Hidrógeno entre 15-16 ml min⁻¹) y una columna Porapak R (80/100 mesh, 6 feet x 1/8 inch, Supelco, USA), utilizando N₂ como gas carrier (con un flujo de 54 ml min⁻¹), con 45°C de temperatura de horno. Se registraron las áreas de acetileno y etileno y se consideró como resultado positivo del ensayo la aparición de áreas de etileno $\geq 10\%$ mayores que el nivel basal de controles con acetileno y sin planta.

Extracción y cuantificación de ARN

Se realizó la extracción de ARN total (vegetal + comunidad bacteriana endófito) para raíces y parte aérea de un subset de las muestras procesadas para optimizar la metodología. Se utilizó el reactivo Trizol® (Invitrogen), y se procedió según protocolo indicado por el fabricante, partiendo de entre 50 y 100mg de material vegetal pulverizado. Brevemente, la técnica consistió en realizar la lisis celular y mantenimiento de la integridad del ARN con el reactivo Trizol y posterior extracción con cloroformo. El ARN contenido en la fase acuosa, fue posteriormente sometido a precipitación con isopropanol y se resuspendió en 50µL agua libre de RNAasa.

Se verificó el éxito de la extracción y la calidad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TBE 0,5X preparado con agua libre de ARNasa, a 120V durante 10 min, no obtuyendose resultados positivos en ninguna de las pruebas realizadas.

Se realizó la cuantificación del ARN extraído para las distintas muestras diluídas 1/50 mediante espectrofotometría a 260 y 280nm y cálculo de la relación de absorbancias A_{260nm}/A_{280nm} .

Controles del método de extracción de ARN

Se realizó un control de la extracción de ARN mediante el agregado de un número conocido de una cepa fijadora de nitrógeno, *Azospirillum lipoferum* cepa 20, muestras de los dos tejidos vegetales analizados (hoja y raíz), y en paralelo se realizó la extracción de ARN de una cantidad conocida de células de la cepa de utilizada y de las muestras vegetales sin agregado de bacterias.

Para ello se preparó un cultivo de *Azospirillum lipoferum* en medio NFB sin nitrógeno agregado y con baja concentración de extracto de levadura (por composición ver ANEXO III), a partir de un cultivo fresco del microorganismo en medio R2A Agar (Difco).

Se incubó el cultivo con agitación a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0,3 (12 hs de incubación). Se ajustó a una concentración de 1×10^8 células/ ml utilizando la escala de McFarland, se prepararon diluciones adecuadas de modo de inocular aprox. 10^5 células por cada 100mg de tejido vegetal. Se consideró que este número estaba dentro del rango de concentraciones de diazótrofos que se han obtenido por recuento por métodos tradicionales en trabajos anteriores (Rariz, 2012; Stoltzfus et al. 1997).

El agregado de células de *Azospirillum lipoferum* se realizó luego de haber agregado el reactivo Trizol, para evitar que la hidratación del material vegetal pulverizado, que se mantuvo congelado a -70°C hasta ese momento, sufriera degradación de su ARN.

Tratamiento con DNAasa y síntesis de cDNA

Se realizó un tratamiento con DNAasa sobre las extracciones de ARN realizadas para eliminar ADN que pudiera haberse coextraído conjuntamente con el ARN y que pudiera interferir posteriormente en la cuantificación de la expresión del gen *nifH* a partir del DNAc obtenido. Se utilizó la DNAasa I, Amplification grade (Invitrogen) y se realizó una mezcla de reacción conteniendo Buffer 10X (1µL), DNAasa I 1U/µL (0,4µL) y aprox. 1µg de ARN (8µL). Una vez agregado el ARN, se incubó a temperatura ambiente durante 17min. Culminada esa etapa se realizó la preinactivación de la enzima mediante el agregado de EDTA 25mM pH 8,0 (1µL) y posteriormente se inactivó la DNAasa por calor (10min a 65°C) en termociclador.

Todo el volumen de mix obtenida del tratamiento con DNAasa fue utilizado para obtener el cDNA mediante la reacción de RT-PCR.

Se preparó la mezcla de reacción conteniendo: dNTPs (1µL), random primers 200 ng/µL (1µL), First strand buffer 5X (4µL), DTT 0,1M (2µL), inhibidor de RNAasa 40U/µL (RNaseOUT®, Invitrogen, 1µL), M-MLV Reverse Transcriptase 200U/µL (Invitrogen, 1µL). El ciclo térmico utilizado consistió en 10min a 25°C, 50min a 37°C, y finalmente 15min a 70°C para inactivar la transcriptasa reversa.

Cuantificación de la expresión de genes *nifH*

La cuantificación de la expresión de los genes *nifH* se realizó mediante q-PCR a partir de los ADNc obtenidos diluidos $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{40}$ como fue explicado anteriormente. Se utilizó el protocolo de q-PCR detallado

en el capítulo II de la presente tesis. Se utilizaron los primers diseñados por Poly et al. (2001a) y el kit Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany).

Controles realizados

Se incluyeron controles en la cuantificación para verificar la eficiencia de las distintas etapas de obtención y purificación de ADNc y la correcta actividad de las enzimas utilizadas (Figura 1-A1). Estos controles incluyeron: verificación de ausencia de ADN remanente luego del tratamiento con DNAasa (control B), verificación de que en el tratamiento con DNAasa no hubo degradación de RNA (control C), verificación de que no se extrajo ADN conjuntamente con el ARN (control D). Asimismo, se realizó un control con agregado de un número conocido de copias de genes *nifH* del estándar utilizado al cDNA obtenido para verificar que no hubiese inhibición de la amplificación ($3,38 \times 10^2$ copias *nifH*. μL^{-1}).

Además, se utilizó un RNA eucariota control positivo, a partir del cual se había realizado anteriormente la obtención de ADNc mediante RT-PCR y posterior cuantificación de un gen determinado, de forma de verificar si el tratamiento con DNAasa, las reacciones de RT-PCR y cuantificación por real time-PCR de ADNc estaban funcionando correctamente o si había alguna falla metodológica o de los reactivos.

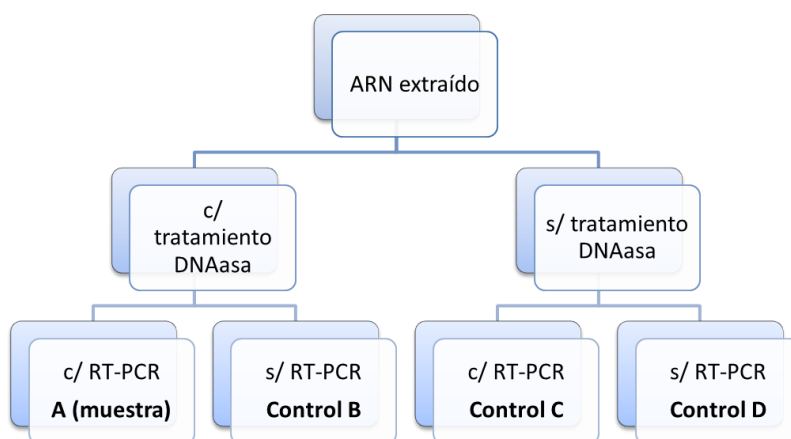


Figura AI-1. Controles realizados en la evaluación de la expresión de genes *nifH* por q-PCR.

Resultados y discusión

Actividad diazótrofa in planta

El ensayo de reducción de acetileno realizado sobre las plantas no arrojó resultados positivos. No se detectó actividad nitrogenasa durante el período en que se llevó a cabo la incubación, observándose en todos los casos áreas de etileno menores al 10% del área del acetileno adicionado.

Extracción y Detección de la expresión de genes *nifH*

Se ensayaron diferentes cantidades de partida de material vegetal para ver cuál presentaba mejor rendimiento de ARN. Se realizó una electroforesis de los ARN extraídos en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE 0.5X a 120V, 10min, para verificar el éxito y la calidad de la extracción, no obteniéndose bandas observables en ninguna de las extracciones ensayadas. A pesar de esto, la cuantificación del ARN extraído mediante espectrofotometría mostró niveles apreciables de ARN de una calidad satisfactoria (concentración entre 0,100 y 0,400 µg de ARN/ µL y relación A_{260}/A_{280} entre 1,2 y 1,8). Por este motivo se prosiguió con el tratamiento con DNAasa y la RT-PCR seguida de la cuantificación por q-PCR del cDNA.

En ningún caso pudieron detectarse niveles apreciables de cADN de *nifH* en los ARN extraídos para raíces y hojas de arroz de los dos tratamientos. Los controles C y D (RNA sin tratamiento con DNAasa y con RT-PCR, y RNA original sin ningún tratamiento, respectivamente, Figura AI-1), mostraron niveles de ADNc de *nifH* indetectables mediante la técnica utilizada en ambos casos. Estos resultados sugieren tres posibilidades: o el nivel de expresión de genes *nifH* es realmente muy bajo en las muestras, o existe algún tipo de inhibición de la reacción de q-PCR o existieron problemas en la etapa de extracción de ARN.

Se comprobó la ausencia de inhibidores de la reacción de cuantificación del ADNc mediante el control realizado con agregado de un número de copias de *nifH* conocido a la mezcla de reacción ya que se obtuvieron niveles de *nifH* similares a los obtenidos para el estándar en ausencia de ADNc.

Asimismo, se realizó un control para verificar la aptitud de los reactivos y enzimas utilizadas en el tratamiento con DNAasa, RT-PCR y en la cuantificación por q-PCR. Para ello se utilizó un RNA eucariota, extraído anteriormente, para el cual se habían realizado exitosamente las distintas etapas mencionadas. Los resultados obtenidos de la cuantificación del control indican que los reactivos no serían la causa de la no detección de transcritos *nifH* ya que la cuantificación del gen utilizado dio resultados similares a los obtenidos anteriormente.

La existencia de problemas en las etapas de purificación de ARN y obtención y cuantificación de los transcritos de *nifH* fue descartada, por lo que por último se verificó si la etapa de extracción de ARN presentaba inconvenientes. Según fue explicado en materiales y métodos, se inocularon muestras de hojas y raíces pulverizadas con una cantidad conocida de células de *Azospirillum lipoferum* alcanzando una concentración de 10^6 células/g tejido vegetal fresco. Esta concentración de diazótrofos fue del orden de las reportadas por otros autores (Verma et al., 2001; Prakamhang et al., 2009) en diferentes tejidos de arroz. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio indican que la abundancia de diazótrofos recuperada por cultivo es menor a $2,31 \times 10^3$ diazótrofos por gramo peso fresco (Ferrando et al. 2012, capítulo I de esta tesis), alcanzando valores mayores a 10^6 por gramo cuando las plantas fueron inoculadas con *Azospirillum brasilense* en un ensayo hidropónico en condiciones controladas (Rariz et al. 2012, no publicado).

Los resultados del procesamiento de las muestras inoculadas para la extracción de ARN no arrojaron resultados favorables ya que no fue posible obtener ARN de las muestras inoculadas ni de las células

bacterianas utilizadas como control. Es posible que la cantidad de células bacterianas utilizada haya sido demasiado baja para la detección mediante extracción de ARN, RT-PCR y q-PCR

Hurek et al (2002) estimaron mediante número más probable semicuantitativo acoplado a RT-PCR (MPN-RT-PCR) a partir de RNA total extraído para cultivos puros de la cepadiazótrofa *Azoarcus* sp. BH72 que el límite de detección de la RT-PCR era de $3,3 \times 10^7$ células. Asimismo, un análisis similar fue realizado por estos autores para estimar el límite de detección de transcritos de *nifH* en raíces de *Oryza minuta* inoculadas con la cepa *Azoarcus* sp. BH72 (10^8 células), estimando que en este caso estaría en 1×10^{10} bacterias fijadoras de nitrógeno por gramo de raíz (peso seco). Asimismo, Knauth et al. (2005) estudiaron la influencia del cultivar de arroz en la expresión del pool de genes *nifH* asociado a raíces de arroz. Estos autores estimaron, de igual forma que Hurek et al. (2002), que para los niveles de expresión de *nifH* encontrados en las raíces de arroz se requerirían 1×10^9 células fijadoras de nitrógeno por gramo de peso fresco de raíz. En el presente trabajo, las plantas de arroz no fueron inoculadas con cepas diazótrofes por lo que los niveles de expresión se esperaba que fueran menores a los reportados por Hurek et al. (2002).

A pesar de los posibles problemas en la extracción de ARN y/o en las distintas etapas subsiguientes para lograr la cuantificación de los transcritos de *nifH*, hay que considerar que puede que los niveles de expresión de genes *nifH* presentes en las raíces de arroz fueran bajos y difíciles de detectar mediante esta metodología.

Perspectivas

Como perspectiva de este trabajo es necesario optimizar el método de extracción de ARN a partir de tejidos vegetales, variando el método o utilizando kits comerciales. Asimismo, las condiciones de toma de las muestras y de su almacenamiento hasta el momento de procesarlas son críticas por lo que se requiere mejorar este aspecto para obtener resultados. Además, la necesidad de desinfectar superficialmente los tejidos vegetales para estudiar la flora endófitas una vez extraídas las muestras de plantas hace que los tiempos entre la extracción y almacenamiento de las muestras sean grandes. La exposición al hipoclorito de sodio durante la desinfección podría causar la degradación del ARN bacteriano de interés. Tal vez sea necesario sacrificar la etapa de desinfección y evaluar la expresión de genes *nifH* de la flora total (endófitas y epifíticas) asociada a las raíces.

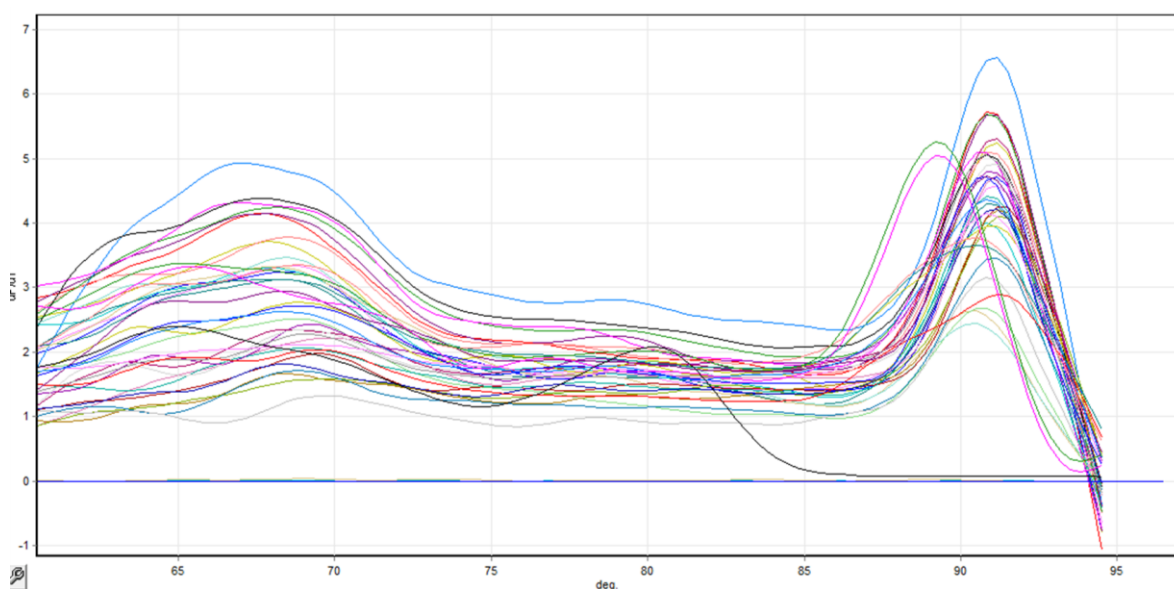
Como indica el título de este trabajo, era nuestro interés poder determinar no sólo los niveles de expresión de genes *nifH* sino evaluar qué diazótrofos se encontraban activos en las dos condiciones de manejo de agua estudiadas, lo que aportaría información muy relevante que permitiría confirmar que el cambio drástico observado en la comunidad diazótrofa endófitas de raíces de arroz luego de la inundación, no sólo se da a nivel de su estructura sino también a nivel de la comunidad activa. Por esto, como perspectiva general del trabajo se encuentra, luego de la optimización de la extracción de ARN y posterior síntesis de cDNA, estudiar la composición de las comunidades activas en ambas condiciones de manejo de agua.

Anexo II: Información suplementaria, Gráficos y Figuras adicionales

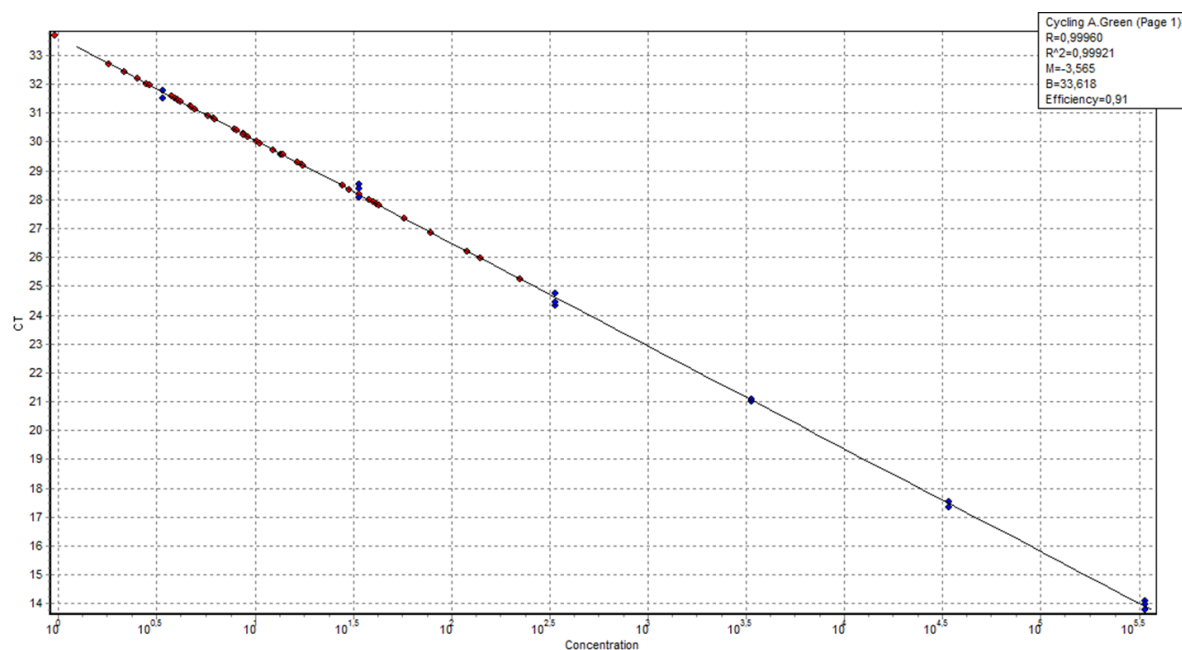
Capítulo II

Optimización de la cuantificación de genes *nifH* por q-PCR

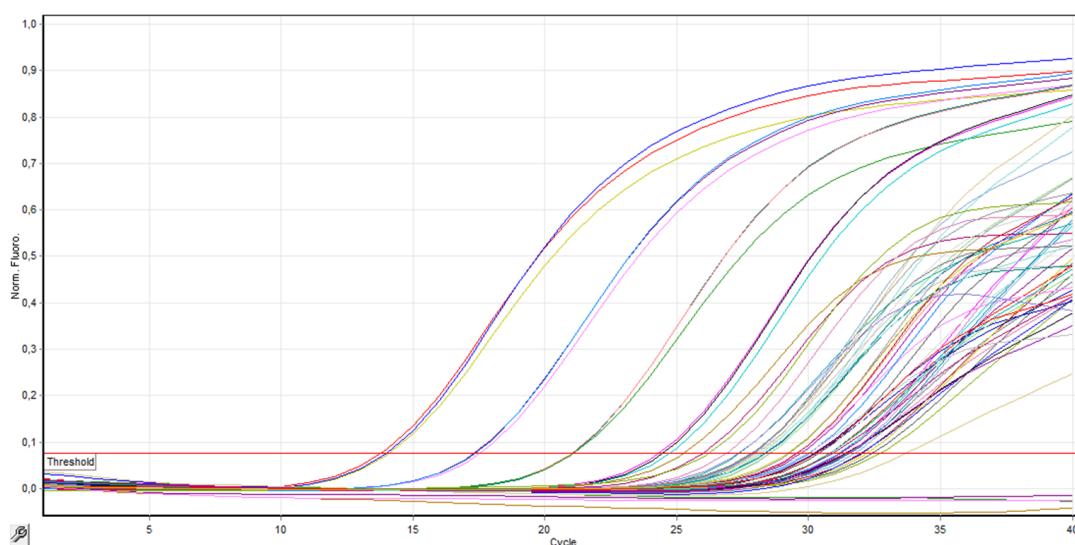
La optimización de la cuantificación de genes *nifH* por q-PCR se realizó utilizando ADN de cepas fijadoras de nitrógeno patrón (*Azospirillum brasilense* sp7 y *Azospirillum brasilense* Az39). Se probaron diferentes concentraciones de primers (Poly et al., 2001, 0.5 y 1 μ M) y diferentes temperaturas de adquisición de fluorescencia (60 y 82°C). Asimismo, se utilizó una cepa no fijadora de nitrógeno como control negativo (*Bosea* sp.) y se realizó la curva de melting en todos los casos para verificar la especificidad del producto de amplificación obtenido.



FiguraAII-1. Ejemplo de Curva de melting obtenida para los puntos de la curva de calibración (T_m de 87 a 93°C), los controles negativos, y las muestras analizadas.



FiguraAII-2. Ejemplo de curva estándar (C_T vs concentración) obtenida para la cuantificación de los genes *nifH* por q-PCR. Puntos de color azul corresponden a las diluciones del estándar (triplicados, desde dil-5 a dil-10); en rojo se encuentran los resultados para las muestras analizadas. En el extremo superior derecho se muestran los parámetros de la curva de calibración obtenida.



FiguraAII-3. Ejemplo de curvas de cuantificación del gen *nifH* obtenidas mediante q-PCR para los puntos de la curva de calibración, los controles negativos y las muestras analizadas correspondientes a diluciones 0 y -1 de raíces y hojas del ensayo en invernáculo (escala lineal). Línea roja: umbral establecido.

Plot	Tissue	BF		AF	
		<i>nifH</i> copy number	SD	<i>nifH</i> copy number	SD
2	R	6.5×10^2	8×10^1	1.1×10^4	4×10^3
	L	1.3×10^0	7×10^{-1}	2.2×10^0	(*)
6	R	5.0×10^2	2×10^2	2.2×10^3	4×10^2
	L	1.3×10^0	(*)	1.4×10^0	4×10^{-1}
7	R	8.0×10^2	1×10^2	3.2×10^3	7×10^2
	L	1.33×10^0	8×10^{-3}	1.3×10^0	6×10^{-1}
8	R	3.5×10^2	5×10^1	4.1×10^3	0×10^0
	L	3.0×10^0	1×10^0	1.5×10^0	(*)

Table AII-1. Abundance of *nifH* sequences in rice leaves (L) and roots (R) per replicate from different water regime (before (B) and after (A) flooding (F)). Values are expressed per ng of total DNA extracted. BF: Before flooding; AF: After flooding; SD: standard deviation calculated from technical duplicates. (*) There is only one available value from these samples.

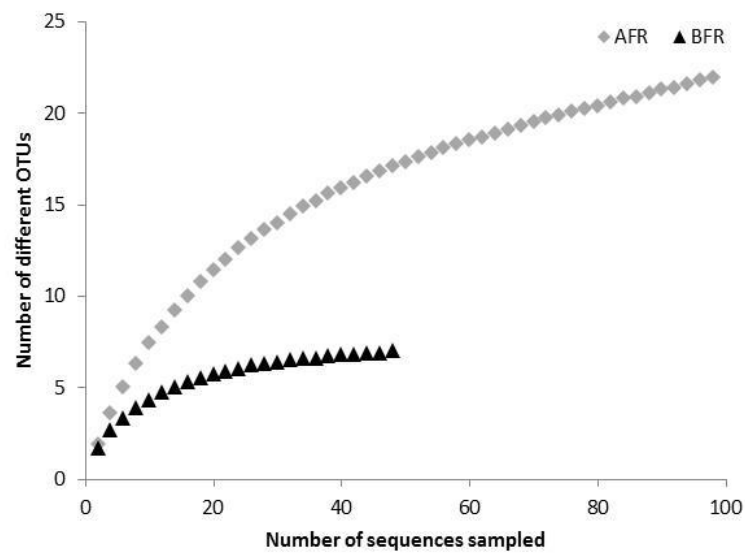
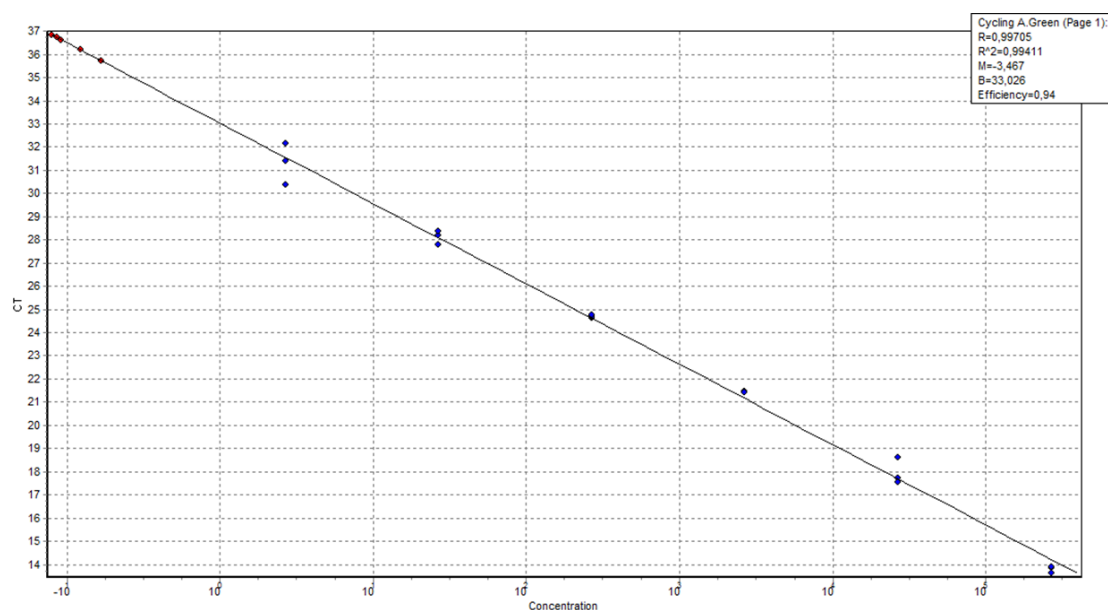
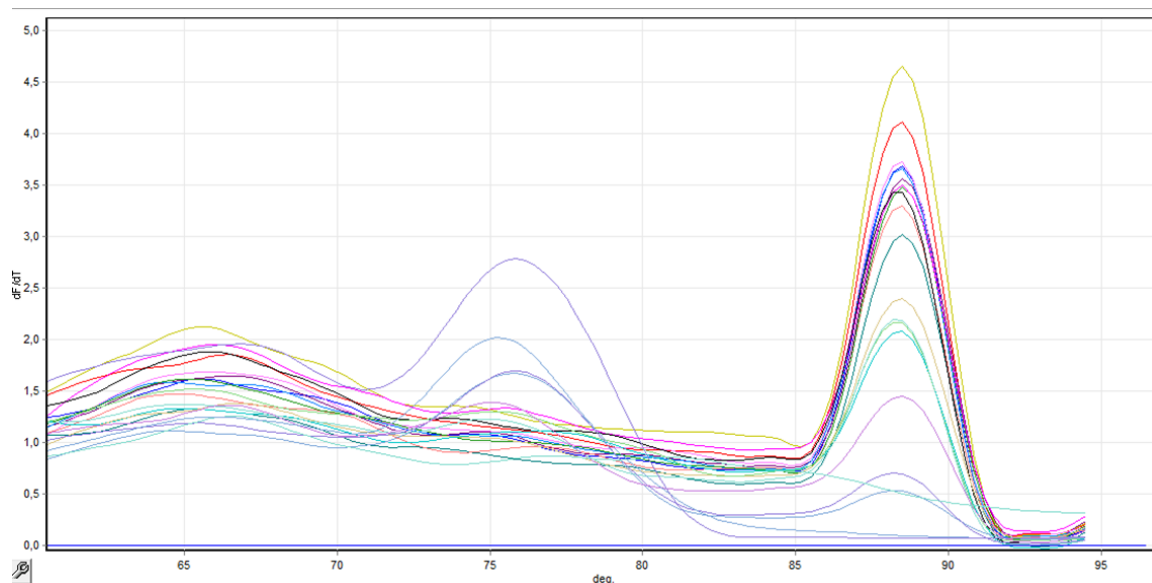


Figure AII-4. Rarefaction curves of observed operational taxonomic units (OTU) based on *nifH* sequences retrieved from rice roots from the two water regimes. AFR: after flooding roots; BFR: before flooding roots.

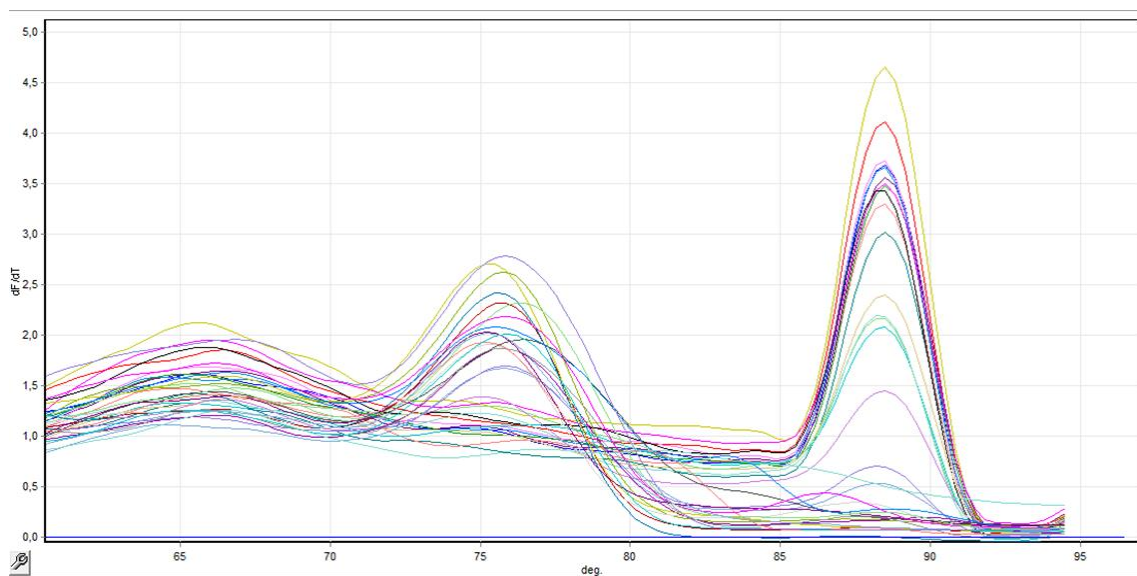
Capítulo IV



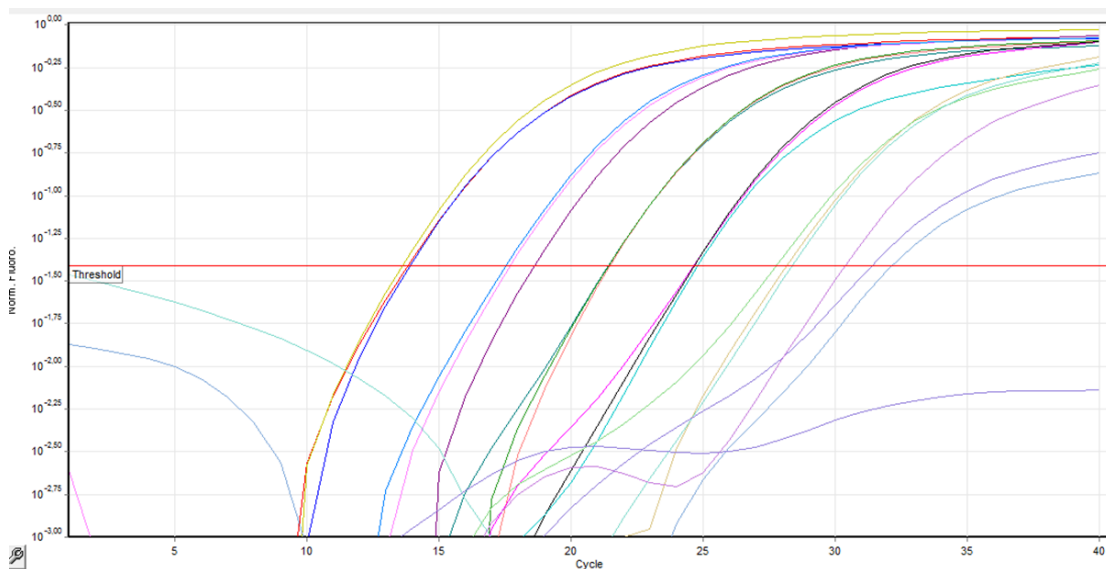
FiguraAII-5. Ejemplo de curva de calibración (C_T vs concentración) obtenida para la cuantificación los genes *pmoA* por q-PCR. Puntos de color azul corresponden a las diluciones del estándar (triplicados, desde dil-5 a dil-10); en rojo se encuentran los resultados para las muestras analizadas. En el extremo superior derecho se muestran los parámetros de la curva de calibración obtenida.



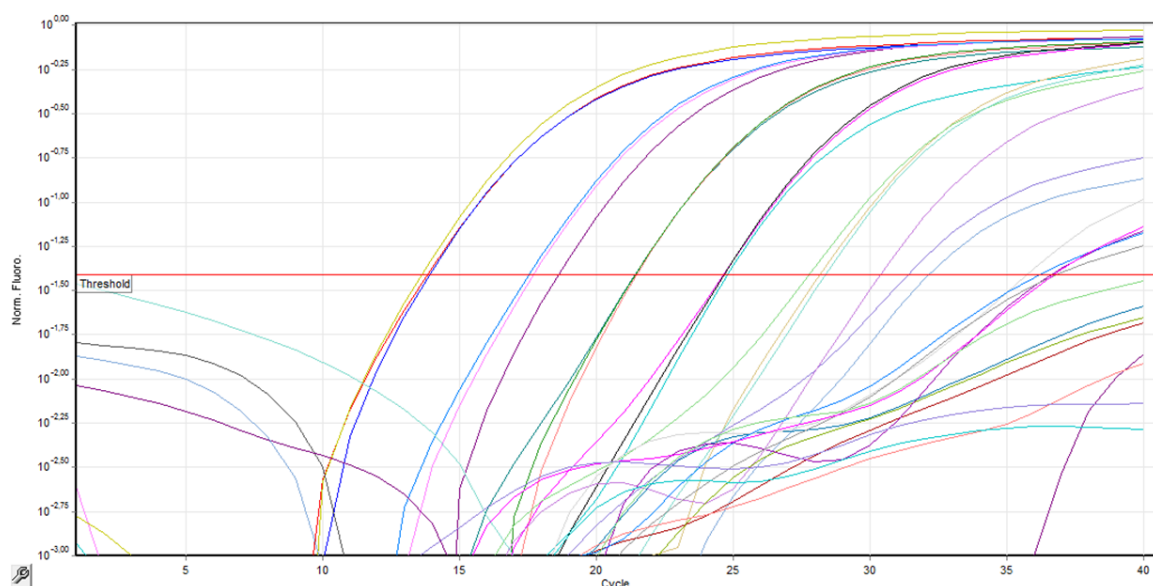
FiguraAII-6. Curva de melting obtenida para los puntos de la curva de calibración ($T_m=88,5^\circ\text{C}$) y los controles negativos (formación de dímeros aprox. $T_m=76^\circ\text{C}$).



FiguraAII-7. Curva de melting obtenida para los puntos de la curva de calibración, ($T_m=88,5^{\circ}\text{C}$), los controles negativos (formación de dímeros aprox. $T_m= 76^{\circ}\text{C}$), y las muestras analizadas correspondientes a diluciones 0 y - 1 de raíces y hojas del ensayo en invernáculo.



FiguraAII-8. Curvas de cuantificación del gen *pmoA* obtenidas mediante q-PCR para los puntos de la curva de calibración y los controles negativos (escala logarítmica). Línea roja: umbral establecido.



FiguraAII-9. Curvas de cuantificación del gen *pmoA* obtenidas mediante q-PCR para los puntos de la curva de calibración, los controles negativos y las muestras analizadas correspondientes a diluciones 0 y -1 de raíces y hojas del ensayo en invernáculo (escala logarítmica). Línea roja: umbral establecido.

Anexo III: Medios de cultivo

Medio de cultivo hidropónico Yoshida (modificado de Gregorio et al. 1997)

Solución A concentrada x10 (x 1 L)

NH_4Cl 0,800 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,040 g

K_2SO_4 0,092 g

CaCl_2 0,160 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,380 g

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,010 g

Solución B concentrada x100 (x1 L)

$\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,180 g

H_3BO_3 0,112 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,044 g

Solución C concentrada x1000 (x1 L)

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,040 g

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,092 g

pH final del medio 5,0

Para preparar 1L de medio Yoshida diluido $\frac{1}{2}$, se agregan 50mL de solución A, 5mL de solución B y 0,5 mL de solución C, llevando a volumen con agua destilada estéril y ajustando el pH final del medio a 5,0.

Composición del Medio NMS (Nitrate Mineral Salt) convencional (Whittenbury et al. 1970) y con modificaciones

<i>Componente</i>	<i>NMS</i>	<i>NMS CN</i>	<i>NMS SN</i>
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0g	1,0g	1,0g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2g	0,2g	0,2g
Solución FeCl ₃ .6H ₂ O- Na ₂ EDTA.2H ₂ O 1μM	10mL	10mL	10mL
KNO ₃	1,0g	-----	-----
NH ₄ NO ₃	-----	0,8g	-----
Solución de elementos traza	5mL	5mL	5mL
KH ₂ PO ₄ *	0,272g	0,272g	0,272g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O*	0,717g	0,717g	0,717g
Agua destilada	c.s.p 1L	c.s.p 1L	c.s.p 1L

*Se agregaron después de autoclavar. En el caso de los medios NMS CN y NMS SN que se utilizaron diluidos 1/5, estas sales se agregaron en concentración normal luego de autoclavar, sin diluir.

pH= 6,8

Solución de elementos traza (x1L)

	<i>Cantidad (mg)</i>
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	500
FeSO ₄ .7H ₂ O	200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	3
H ₃ BO ₃	30
CoCl ₂ .2H ₂ O	20
NiCl ₂ .6H ₂ O	2
CuCl ₂ .2H ₂ O	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3

Medio Nfb (modificado)

Composición (x1 L de medio)

Ac. málico 2,5 g

Glucosa 2,5 g

K₂HPO₄ 0,2 g

KH₂PO₄ 0,6 g

MgSO₄·7H₂O 0,2 g

NaCl 0,1 g

CaCl₂·2H₂O 0,02 g

Extracto de levadura 0,1g

Micronutrientes^a 2,0 ml

Solución Fe-EDTA^b 4,0 ml

Vitaminas^c 1,0 ml

pH 6,0

^a- CuSO₄·5H₂O, 0,4g; ZnSO₄·7H₂O, 0,12g; H₂BO₃, 1,4g; NaMoO₄·2H₂O, 1,0g; MnSO₄·H₂O, 1,5g; en 1 litro de agua destilada.

^b- Solución 1.64% de FeCl₃·6H₂O-Na₂EDTA·2H₂O (p/v).

^c- Biotina 10 mg y clorhidrato de piridoxal 20 mg en 100 ml de agua destilada. Se filtra por membrana y se conserva en oscuridad.

Referencias

- Ando S, Goto M, Mcunchang S, Thongra-ar P, Fujiwara T, et al. (2005) Detection of *nifH* sequences in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *Soil Sci Plant Nutr* 51:303-308.
- Auman AJ, Stolyar S, Costello A, Lidstrom ME (2000) Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl Environ Microbiol* 66:5259-5266
- Baldani JI, Caruso LV, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-leguminous plants. *Soil Biol Biochem* 29:911-922
- Baldani JI, Reis VM, Baldani VLD, Dobereiner J (2002) A brief story of nitrogenfixation in sugarcane. Reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*, 29:417-423
- Barraquio TB, Joseph CM, Yang G, Phillips DA, Nelson LM (1997) Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194:15-24.
- Becker R, Behrendt U, Hommel B, Kropf S, Ulrich A (2008) Effects of transgenic fructan-producing potatoes on the community structure of rhizosphere and phyllosphere bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 66:411–425.
- Blanco PH, Gaggero MT, Pérez de Vida FB, Ávila S, Zorrilla G, Lavecchia A, Marchesi C, Capdevielle F, Castillo A (2003) Cultivar development at the rice breeding program of INIA- Uruguay. In: *Proceedings 3rd International Temperate Rice Conference* pp. 141. Punta del Este, Uruguay.
- Bodelier PLE (2003) Interaction between oxygen- releasing roots and microbial processes in flooded soils and sediments. *Ecol Studies* 168:331- 362.
- Bowman J (2006) The methanotrophs-the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*, p. 266–289. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, and Stackebrandt E (ed.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd ed., Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. Springer Science+Business Media, LLC, New York
- Briones AM, Okabe S, Umekiya Y, Ramsing NB, Reichardt W, Okuyama H (2002) Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Appl Environ Microbiol* 68:3067–3075.
- Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu SF, Nelson TA. (2008) $^{15}\text{N}_2$ -DNA-stable isotope probing of diazotrophic methanotrophs in soil. *Soil Biol Biochem* 40:1272–1283
- Bussmann I, Pester M, Brune A, Schink B (2004) Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* 47:179-189
- Calhoun A and King GM (1998) Characterization of root-associated methanotrophs from three freshwater macrophytes: *Pontederia cordata*, *Sparganium eurycarpum*, and *Sagittaria latifolia*. *Appl Environ Microbiol* 64:1099

- Chelius MK, Triplett EW (2001) The diversity of archaeal and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbiol Ecol* 41:252- 263.
- Chowdhury SP, Schmid M, Hartmann A, Tripathi AK (2009) Diversity of 16S-RNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus sindicus*. *E J Soil Biol* 45: 114-122
- Das S, Bhattacharyya P, Adhya TK (2011) Impact of elevated CO₂, flooding, and temperature interaction on heterotrophic nitrogen fixation in tropical rice soils. *Biol Fertil Soils* 47:25-30
- De-Bashan, LE, Hernández JP, Bashan Y (2011) The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation: A comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol* doi:10.1016
- De Boer W, Wagenaar AK, Klein Gunnewiek PJA, van Veen JA (2007) In vitro suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 59:177–185.
- Dedysh SN, Liesack W, Khmelenina VN, Suzina NE, Trotsenko YA, Semrau JD, Bares AM, Panikov NS and Tiedje JM (2000) *Methylocella palustris* gen. nov., sp nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs, *Int J Syst Evol Micr* 50:955–969
- Dedysh, SN, Knief C and Dunfield PF (2005) *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *J Bacteriol* 187:4665–4670
- Demba Diallo M, Reinhold-Hurek B, Hurek T (2008) Evaluation of PCR primers for universal *nifH* gene targeting and for assessment of transcribed *nifH* pools in roots of *Oryza longistaminata* with and without low nitrogen input. *FEMS Microbiol Ecol* 65:220–228
- Dilworth MJ (1966) Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum* *Biochim Biophys Acta* 127:285–294
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67: 190-197.
- Dunfield PF, Yuryev A, Senin P, Smirnova AV, Stott MB, Hou S, Saw JH, Zhou Z, Ren Y, Wang J, Mountain BW, Crowe MA, Weatherby TM, Bodelier PLE, Liesack W, Feng L, Wang L, and Alam M (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature* 450: 879-882
- Elbeltagy A and Ando Y (2008) Expression of nitrogenase gene (*nifH*) in roots and stems of rice, *Oryza sativa*, by endophytic nitrogen-fixing communities. *African J Biotechnol* 7:1950-1957
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* 67: 5285–5293.

- Eller G and Frenzel P (2001) Changes in activity and community structure of methane oxidizing bacteria over the growth period of rice. *Appl Environ Microbiol* 67:2395–2403
- Eller G, Krüger M, and Frenzel P (2005) Comparing field and microcosm experiments: a case study on methano- and methylotrophic bacteria in paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol* 51:279–291
- Enya J, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi H, Suyama K, Tsushima S (2007) Culturable Leaf-Associated Bacteria on Tomato Plants and Their Potential as Biological Control Agents. *Microbiol Ecol* 53:524-536.
- Feng Y, Sheng D, Song W (2006) Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *J. Appl Microbiol* 100:938-945
- Ferrando L, Tarlera S (2009) Activity and diversity of methanotrophs in the soil–water interface and rhizospheric soil from a flooded temperate rice field 106:306–316
- Gaby JC, Buckley DH (2011) A global census of nitrogenase diversity. *Environ Microbiol* 13:1790–1799
- Gaby JC, Buckley DH (2012) A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PlosONE* 7(7):1-12.
- Gamalero E, Lingua G, Tombolini R, Avidano L, Pivato B, Berta G (2005) Colonization of tomato root seedling by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio temporal dynamics localization, organization, viability and culturability. *Microbial Ecology* 50, 289e297
- García de Salamone I, Funes J, Di Salvo L, Escobar-Ortega J, D'Auria F, Ferrando L, Fernandez-Scavino A (2012) Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Appl Soil Ecol* 61:196– 204
- Geymonat E, Ferrando L, and Tarlera SE (2011) *Methylogaea oryzae* gen. nov., sp. nov., a mesophilic methanotroph from a rice paddy field. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2568–2572
- Gilbert B, Aßmus B, Hartmann A, Frenzel P (1998) In situ localization of two methanotrophic strains in the rhizosphere of rice plants *FEMS Microbiology Ecology* 25:117-128
- Gottel N, Castro H, Kerley M, Yang Z, Pelletier D, Podar M, Karpinets T, Uberbacher E, Tuskan G, Vilgalys R, Doktycz M, Schad C (2011) Distinct Microbial communities within the endosphere and rizosphere of *Populus deltoids* roots across contrasting soil types. *Appl Environ Microbiol* 77: 5934-5944
- Graff A, Conrad R (2005) Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 401–415
- Gregorio GB, Senadhira D, Mendoza RD (1997) Screening rice for salinity tolerance. Plant Breeding, Genetics, and Biochemistry Division. IRRI discussion paper series. 22: 1-30
- Gupta VVSR, Roper MM (2010) Protection of free-living nitrogen fixing bacteria within the soil matrix. *Soil Till Res* 109:50–54

- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895-914.
- Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW (1999) Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol Biochem* 31:551–560.
- Hanson, RS, Hanson, TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Reviews* 60:439-471
- Hardoim PR, Hardoim CCP, van Overbeek LS, van Elsas JD(2012) Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PlosOne* 7(2) e30438
- Heyer J, Galchenko VF, Dunfield PF (2002) Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* 148:2831-2846
- Hiraishi A & Imhoff JF (2005) Genus VII. *Porphyrobacter*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM, eds). pp. 275–279. Springer, New York.
- Hoffmann T, Horz HP, Kemnitz D, and Conrad R (2002) Diversity of the particulate methane monooxygenase gene in methanotrophic samples from different ricefield soils in China and the Philippines. *System Appl Microbiol* 25:267–274
- Hsu SF, Buckley DH (2009) Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME Journal* 3:124–136
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y, (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 233e242
- Hurek T, Reinhold-Hurek B (2005) Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with graminaceous plants. In *Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. Werner D, Newton WE (Eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A (2004) Bacterial Communities Associated with Flowering Plants of the Ni Hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol*. 70:2667–2677.
- Iguchi H, Sato I, Sakakibara M, Yurimoto H, Sakai Y (2012) Distribution of Methanotrophs in the Phyllosphere. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(8), 120281-1-4
- Ikeda S, Kaneko T, Okubo T, Rallos LEE, Eda S, Mitsui H, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Minamisawa K (2009) Development of a Bacterial Cell Enrichment Method and its Application to the Community Analysis in Soybean Stems. *Microb Ecol* 58:703–714
- InfoStat (2002). InfoStat version 1.1. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
- James K, Olivares FL (1997) Infection and colonization of sugar cane and other Gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* 17:77-119

- James, EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JI, Döbereiner J (1994) Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J Exp Bot 45:757–766
- Jukes TH & Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. Mammalian Protein Metabolism (Munro HN, ed), pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Juraeva D, George E, Davranov K, Ruppel S (2006) Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. Can J Microbiol 52 (8):731-739
- Kaga H, Mano H, Tanaka F, Watanabe A, Kaneko S, Morisaki H (2009) Rice seeds as sources of endophytic bacteria. Microb Environ 24:154–162
- Keppler F, Hamilton JTG, Brab M, Rockmann T (2006) Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. Nature 439:187-191
- Kip N, Fritz C, Langelaan ES, Pan Y, Bodrossy L, Pancotto V, Jetten MSM, Smolders AJP, and Op den Camp HJM (2012) Methanotrophic activity and diversity in different *Sphagnum magellanicum* dominated habitats in the southern most peat bogs of Patagonia. Biogeosciences 9:47–55
- Knauth, S, Hurek, T, Brar, D, Reinhold-Hurek, B (2005) Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. Environ Microbiol 7: 1725–1733.
- Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, Von Mering C, Vorholt JA (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. ISME Journal 6:1378-1390
- Kögel-Knabner I, Amelung W, Cao Z, Fiedler S, Frenzel P, Jahn R, Kalbitz K, Kölbl A, Schlöter M (2010) Biogeochemistry of paddy soils. Geoderma 157:1–14
- Lafferty DS (2011) Nitrogen-Fixing Endophytic Bacteria for Improved Plant Growth. In: DK Maheshwari (ed.), Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses, pp 183-199. Springer-Verlag Berlin
- Le Mer J, Roger P (2001) Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. Eur. J. Soil Biol. 37:25–50
- Lidstrom ME (2006) Aerobic Methylophilic Prokaryotes. In Prokaryotes 2:618–634
- Lindner AS, Pacheco A, Aldrich HC, Costello SA, Uz I, Hodson DJ (2007) *Methylocystis hirsuta* sp. nov., a novel methanotroph isolated from a groundwater aquifer. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1891-1900
- Loaces I, Ferrando L, Fernández Scavino A (2011) Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. Microbiol Ecol. 61:606-618.
- Lücke C, Bodrossy L, Lupotto E, Frenzel P (2011) Methanotrophic bacteria associated to rice roots: the cultivar effect assessed by T-RFLP and microarray analysis. Environ Microbiol Reports 3:518–525
- Mano H, Morisaki H (2008) Endophytic Bacteria in the Rice Plant. Microbes Environ 23:109-117.
- Mano H, Tanaka F, Nakamura C, Kaga H, Morisaki H (2007) Culturable Endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy soil. Microbes Environ. 22:175-185.

- Mano, H, Tanaka F, Nakamura C, Watanabe A, Kaga H, Okunishi S and Morisaki H (2006) Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes Environ* 21:86-100.
- Mao Y, Yannarell AC, Davis SC, Mackie RI (2012) Impact of different bioenergy crops on N-cycling bacterial and archaeal communities in soil. *Environ Microbiol* (in press)
- Martensson L, Díez B, Wartianinen I, Zheng W, El-Shehawy R, Rasmussen U (2009) Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant Soil* 325:207-218
- Martínez Romero E (2006) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Strackebrandt E.(eds). *The Prokaryotes*. Springer: NewYork. pp 793-817
- McInroy JA, and Kloepper JW (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342.
- Muthukumarasamy R, Kang UG, Park KD et al. (2007) Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *J Appl Microbiol* 102: 981-991
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M, Simonet P (1996) ITS analysis of prokaryotes. *Molecular Microbial Ecology Manual* (Akkermans ADL, Van Elsas JD, De Bruijn FJ, eds) pp. 1-12. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Okunishi S., Sako K., Mano H., Imamura A., Morisaki H (2005) Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes Environ* 20: 168-177.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in root, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. *Biol Fertil Soils* 21:197-200
- Orr CH, Leifert C, Cummings SP, Cooper JM (2012) Impacts of Organic and Conventional Crop Management on Diversity and Activity of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria and Total Bacteria Are Subsidiary to Temporal Effects. 7:12, e52891
- Osborn AM, Moore E, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol*, 2:39-50.
- Pains Rodrigues E, Rodrigues LS, Martínez de Oliveira AL, Baldani VLD, dos Santos Teixeira KR, Urquiaga S, Massena Reis V (2008) *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 302: 249-261.
- Palmer N (2012) Uruguay: A small country, big in rice. *Rice Today* 11(3):21-23
- Paolino G, Fernández A (2006) Dinámica y diversidad de la comunidad bacteriana fijadora de nitrógeno en suelos de arroz. Tesis de Maestría en Química- Universidad de la República, Uruguay

- Parmentier FJW, van Huissteden J, Kip N, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Maximov TC and Dolman AJ (2011) The role of endophytic methane-oxidizing bacteria in submerged *Sphagnum* in determining methane emissions of Northeastern Siberian tundra. *Biogeosciences* 8:1267–1278
- Peng G, W Zhang, H Luo, H Xie, W Lai, Z Tan (2009) *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International J Syst Evol Microbiol* 59: 1650-1655
- Pereira e Silva MC, Semenov AV, van Elsas JD, Falcão Salles J (2011) Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils *FEMS Microbiol Ecol* 77:57–68
- Poly F, Jocteur Monrozier L, Bally R (2001a) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* 152:95–103.
- Poly F, Ranjard L, Goubi  re SNF, Jocteur Monrozier L (2001b) Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl Environ Microb* 67: 2255–2262.
- Prakamhang J, Boonkerd N, Teaumroong N (2010) Rice Endophytic Diazotrophic Bacteria. In: D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, pp: 317-352. Springer-Verlag Berlin
- Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, Boonkerd N, Teaumroong N (2009) The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *App Soil Ecol* 42: 141- 149
- Punschke K, Carlomagno M, Labandera C (2001) Potencial agron  mico de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas de arroz. Disponible en: <http://fp.chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/TraTe/Trate.htm>, accedido en Julio 2006.
- Raghoebarsing AA, Smolders AJP, Schmid MC, Rijpstra IC, Wolters-Arts M, Derksen J, Jetten MSM, Schouten S, et al. (2005) Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. *Nature* 436:25
- Ramos PL, Van Trappen S, Thompson FL, Rocha RCS; Barbosa HR, De Vos P, Moreira-Filho CA (2011) Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *IJSEM* 61:926-931
- Rariz G (2012) Competencia entre *Azospirillum brasilense* y bacterias endófitas nativas de semilla de arroz (*Oryza sativa*). Tesina de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, UdelAR
- Rasche F, Trondl R, Naglreiter C, Reichenauer TG, Sessitsch A (2006) Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Can J Microbiol* 52:1036–1045
- Reinhold- Hurek B, and T Hurek (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*. 6:139-144
- Ringelberg D, Foley K, Reynolds CM (2012) Bacterial endophyte communities of two wheatgrass varieties following propagation in different growing media. *Can J Microbiol* 58:67–80

- Roesch LFW, Camargo FAO, Bento FM, Triplett EW (2008) Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant and Soil* 302:91-104
- Roper M & Smith N (1991) Straw decomposition and nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) by free-living microorganisms from soil: effects of pH and clay content. *Soil Biol Biochem* 23: 275–283
- Rosenblueth M & Martínez-Romero E (2006) Bacterial Endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microb Interact* 19:827–837.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, and Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278:1-9
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D and Dow JM (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas* 7:514-525
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Scheid D, Stubner S, Conrad R (2004) Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition *FEMS Microbiol Ecol* 50:101–110
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56
- Seghers D, Wittebolle L, Top EM, Verstraete W, Siciliano SD (2004) Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl Environ Microbiol* 70:1475–1482
- Senthilkumar M, Anandham R, Madhaiyan M, Venkateswaran V, Tongmin Sa (2011) Endophytic Bacteria: Perspectives and Applications in Agricultural Crop Production. *In*: D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiological: Crop Ecosystems*, DOI 10.1007/978-3-642-18357-7_3, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, and Reinhold-Hurek B (2012) Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:28–36
- Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, Wilhelm E (2002) Cultivation- independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes- specific PCR of 16S rDNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 39:23-32.
- Shi Y, Lou K, Li C (2009) Isolation, quantity distribution and characterization of endophytic microorganisms within sugar beet. *African J Biotechnol* 8: 835-840.
- Shiba T & Imhoff J F (2005) Genus IV. *Erythrobacter* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM, eds). Springer, NY
- Stoltzfus, J, So R, Malarvithi P, Ladha J, and Bruijn F (1997) Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil* 194:25-36.

- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ, Buchanan NA (1999) Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol.* 48:360-369
- Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W (2008) Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbiol Ecol.* 55:415-424.
- Surette MA, Sturz AV, Lada RR, Nowak J (2003) Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil* 253: 381–390.
- Takeda K, Tonouchi A, Takada M, Suko T, Suzuki S, Kimura Y, Matsuyama N, Fujita T (2008) Characterization of cultivable methanotrophs from paddy soils and rice roots. *Soil Sci Plant Nutr* 54:876-885
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Tan KH (2005) Soil pH measurement and lime requirements. In: *Soil sampling, preparation and analysis*, second edition (Tan KH, ed) pp 189-214, Taylor & Francis Group, Boca Raton
- Thomas P, Swarna GK, Roy PK, Patil P (2008) Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 93:55–63.
- Tian X, Cao L, Tan H, Han W, Chen M, Liu Y, Zhou S (2007) Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microbial Ecol* 53: 700-707.
- Tikhonovich IA, Provorov NA (2011) Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. *Ann Appl Biol* 159:155-168
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T (1995) Remarkable N₂-Fixing Bacterial Diversity Detected in Rice Roots by Molecular Evolutionary Analysis of *nifH* Gene Sequences. *J Bact* 177:1414–1417
- Ueki A, Akasaka H, Suzuki D and Ueki K (2006) *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *International J Syst Evol Microbiol* 56:39–44
- Verma SC, Singh A, Chowdhury SP, Tripathi AK (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnol Letters* 26: 425–429.
- Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews* 10:828-840

- Vorobev AV, Baani M, Doronina NV, Brady AL, Liesack W, Dunfield PF and Dedysh SN (2010) *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium possessing only a soluble methane monooxygenase. *Int J Syst Evol Micr* 61:2456–2463. doi:10.1099/ij.s.0.028118-0, 2010.
- Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson, JF (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J Gen Microbiol* 61:205-218
- Wind, T. and Conrad, R. (1997) Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochemistry* 37, 253–278.
- Wu L, K Ma, Y Lu (2009) Prevalence of betaproteobacterial sequences in *nifH* gene pools associated with roots of modern rice cultivars. *Microb Ecol* 57: 58- 68
- Yang JH, Liu HX, Zhu GM, Pan YL, Xu LP, Guo J-H (2008) Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *J Appl Microbiol* 104: 91-104.
- Yoshida S (1981) *Fundamentals of Rice Crop Science*, International Rice Research Institute, pp 17-25.
- You M, Nishiguchi T, Saito A, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2005) Expression of *nifH* gene of *Herbaspirillum* endophyte in wild rice species: daily rhythm during the light- dark cycle. *Appl Environ Microbiol* 71:8183- 8190
- Young JPW (2005) The phylogeny and evolution of nitrogenases. In *Genomes and genomics of Nitrogen-Fixing Organisms*. Palacios R, Newton WE (eds.). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp 221-241.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF(2003) Nitrogenase gene diversity an microbial community structure: a cross- system comparison. *Environ Microbiol* 5:539-554
- Zehr JP, McReynolds LA (1989) Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* 55: 2522–2526
- Zhang L, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2007) A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms. *Microbial Ecol* 53: 456–470
- Zheng L, Li G, Wang X, Pan W, Li L, Hua L, Liu F, Dang L, Mo M, Zhang K (2008) Nematicidal endophytic bacteria obtained from plants. *Annals Microbiol* 58: 569-572.

