



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología

Caracterización del microbioma endofítico asociado a plantas de *Sorghum bicolor* (sorgo dulce)

Cintia Mareque Acosta

Orientador

Dr. Federico Battistoni

Co-orientadora

Dra. Elena Fabiano

Tribunal

- Presidenta: Dra. María Inés Siri
- Vocal: Dra. Sabina Vidal
- Vocal: Dr. Omar Borsani

LABORATORIO DE INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO. DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y GENÓMICA MICROBIANAS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE-MEC
MONTEVIDEO, 2022

Agradecimientos

Es difícil plasmar los agradecimientos, pero sin duda que debo comenzar por agradecer a Fede. Por darme la oportunidad de formarme completamente en el tema que subestime me iba a atrapar de esa manera. Fueron muchos años y experiencias que me llevaron a la científica de hoy.

Luego seguir por todo el equipo de endófitos, fueron fundamentales en el desarrollo de esta tesis. En cierto modo voy a extrañar las horas interminables levantando ensayos de invernáculo. Fueron esenciales los aportes de Ceci, Delos, Gabi, Pati, Lau, Rubia, Dani, María, Vane y Rufo para llevar a cabo esta tesis. Gracias miles.

No dejar de agradecer a Ceci, María y Lau que fueron un salvavidas en la etapa final.

A mis familia, todos. Mis padres, a ellos le debo mi formación en esta carrera hermosa. A mis hermanos, elementales.

A Martin agradecer todo el apoyo durante el camino de la vida académica, que se sintió eterno e interminable a veces. Tremendo equipo.

A Emi por enseñarme que uno puede tener más de una fascinación en la vida y como ser mamá y científica.

A Emilia y las futuras científicas

Tabla de contenidos

Índices de figuras.....	7
Índices de tablas.....	9
Resumen	11
Introducción	12
i- El holobionte planta.....	12
Endófitos bacterianos	13
Interacción planta-endófito	15
Inmunidad vegetal y microbiota.....	21
Promoción del crecimiento vegetal por bacterias.....	23
ii- Estudio del genoma microbiano	27
El estudio del microbioma desde la perspectiva genómica	27
iii- Perfil transcripcional en la interacción planta-bacteria	28
Antecedentes de la línea de investigación.....	30
Modelo de estudio.....	31
Hipótesis	33
Objetivo general.....	33
CAPÍTULO I: La interacción entre la microbiota bacteriana endofítica y plantas de sorgo dulce (<i>Sorghum bicolor</i>) depende del genotipo de la planta y de la aplicación de fertilizante químico nitrogenado en condiciones de campo	34
Objetivo:	34
Estrategia	34
Materiales y Métodos.....	36
1.1. Cepas bacterianas y cultivares de plantas empleados.....	36
1.2 Ensayos de respuesta de plantas de sorgo dulce a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo	37
1.3 Muestreo de plantas de sorgo dulce y extracción de ADN endofítico.....	38
1.4 Cuantificación del microbioma bacteriano por PCR cuantitativa (qPCR).....	39
1.5 Secuenciación masiva del gen bacteriano <i>16S ARNr</i> mediante Ion Torrent®	40
Resultados.....	42
1.6 Respuesta de plantas de sorgo dulce a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.....	42
1.7 Cuantificación de los microbiomas endófitos y endófitos-diazotrófico.....	43
1.8 Composición del microbioma bacteriano endofítico asociado a plantas de sorgo dulce en condiciones de campo	44

Discusión	47
1.9 Efecto de la inoculación bacteriana en plantas de sorgo dulce.....	47
1.10 Estudio del efecto de la fertilización nitrogenada en el microbioma asociado a plantas de sorgo dulce en condiciones de campo	48
Conclusiones	51
CAPÍTULO II: Identificación y caracterización de probables mecanismos involucrados en la interacción entre las cepas <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 y <i>Rhizobium</i> sp. UYSB13 y plantas de sorgo dulce ..	52
Objetivo:	52
Estrategia	52
Materiales y Métodos.....	54
2.1. Cepas bacterianas y plásmidos empleados	54
2.2 Determinación <i>in vitro</i> de la presencia de posibles mecanismos vinculados a la interacción planta-bacteria en las cepas bacterianas en estudio.....	55
2.3 Secuenciación, ensamblado y anotación del genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45.....	56
2.4 Construcción de mutantes.	60
Resultados.....	69
2.5 Caracterización <i>in vitro</i> de enzimas vinculadas a PMI	69
2.6 Análisis del genoma de la cepa <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	71
2.7 Construcción de mutantes en los genes <i>acdS</i> , <i>ipdC</i> y <i>entF</i> en la cepa <i>Pantoea</i> sp. UYSB45..	85
2.8 Caracterización <i>in vitro</i> de la cepa mutante <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 Δ <i>entF</i>	90
Discusión	92
2.9 Genómica de la cepa <i>Pantoea dispersa</i> UYSB45.....	92
Conclusiones	104
CAPÍTULO III: Infección y colonización de plantas de sorgo dulce por la cepa <i>Pantoea dispersa</i> UYSB45.....	105
Objetivo:	105
Estrategia	105
Materiales y Métodos.....	107
3.1 Marcado molecular de cepas	107
3.2 Estudio del proceso de colonización e infección de las raíces de plantas de sorgo dulce var. M81E, por las cepas transformantes <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 y <i>P. dispersa</i> UYSB45 4662	110
Resultados.....	115
Modelo bacteriano: <i>P. dispersa</i> sp. UYSB45	115
3. 3 Infección y colonización de los tejidos internos de plantas de sorgo dulce cultivar M81E por la cepa <i>P. dispersa</i> . UYSB45.....	115
3.4 Cuantificación de la colonización de los tejidos internos de plantas de sorgo dulce cultivar M81E por la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45	123

Modelo bacteriano: cepa <i>Rhizobium</i> sp. UYSB13.....	127
Marcado molecular de cepas	127
Diseño y validación de cebadores específicos para el recuento bacteriano de la cepa <i>Rhizobium</i> sp. UYSB13 en los tejidos internos vegetales.....	129
Discusión	130
3.5 La cepa <i>Pantoea dispersa</i> UYSB45 es un endófito verdadero de plantas de sorgo dulce ...	130
Conclusiones	135
CAPÍTULO IV: Análisis de los perfiles transcripcionales de las interacciones entre plantas de sorgo dulce y la cepa promotora del crecimiento <i>Pantoea dispersa</i> UYSB45; o la cepa fitopatógena <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1.	136
Objetivo:	136
Estrategia	136
Materiales y Métodos.....	138
4.1 Cepas bacterianas y plantas empleadas.....	138
4.2 Ensayo de infección de plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010, con la cepa patógena <i>H. rubrisubalbicans</i> en condiciones <i>gnotobióticas</i>	138
4.3 Evaluación del crecimiento de la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 en distintos medios de cultivo para plantas.....	139
4.4 Extracción de ARN a partir de plantas de sorgo dulce inoculadas con las cepas en estudio	139
4.5 Verificación de la integridad y concentración del ARN obtenido	141
4.6 Secuenciación del ARN obtenido	142
4.7 Análisis de secuencias de ARN.....	142
Resultados.....	145
4.8 Optimización del crecimiento bacteriano y desarrollo de la enfermedad RSD en plantas de sorgo dulce.....	145
4.9 Obtención de ARN a partir de plantas de sorgo dulce inoculadas con las cepas en estudio	147
Discusión	165
4.10 <i>Sorghum bicolor</i> cv. ADV2010 es susceptible a <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, agente causante de RSD.....	165
4.11 Análisis de los transcriptos obtenidos mediante la técnica <i>dual RNA-seq</i>	165
4.12 Transcriptoma de la interacción entre plantas de sorgo dulce y la bacteria PCV o fitopatógena.....	167
Conclusiones	183
Perspectivas	184
Anexo I. Medios de cultivos y soluciones	186
Medios de cultivo para bacterias	186
Medios de cultivo para plantas	187
Otras soluciones	187

Anexo II. Tablas suplementarias Capítulo I.....	188
Metadatos utilizados para la construcción filogenética	188
Tablas de genes anotados según RAST	192
Sistemas de secreción	193
Quimiotaxis, formación de biopelículas y motilidad bacteriana	195
Genes relacionados a la protección contra el estrés	200
Genes relacionados a la PCV	201
Anexo III. Tablas suplementarias Capítulo IV	204
Tabla obtenido con el análisis de RNA-seq	204
Bibliografía	221

Índices de figuras

Figura A: Representación esquemática de la distribución de los endófitos bacterianos provenientes del suelo y los patrones de colonización en la endósfera de la raíz de una planta	16
Figura 1.1: Esquema de la estrategia utilizada en el capítulo I	35
Figura 1.2: Efecto de la inoculación con las cepas <i>Pantoea</i> sp. UYSB45, <i>Rhizobium</i> sp. UYSB13 y <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 en plantas de <i>Sorghum bicolor</i> var: (A) ADV2010 y (B) M81E en condiciones de invernáculo	42
Figura 1.3: Cuantificación de copias de genes <i>16S ARNr</i> y <i>nifH</i> en muestras tomadas de diferentes órganos de plantas de sorgo dulce (cv. M81E) cultivadas en campo bajo fertilización alta (+) y baja (-) N	44
Figura 1.4: Curva de rarefacción de muestras de plantas de sorgo dulce tratadas en condiciones de alta y baja fertilización N (+N y -N respectivamente).....	45
Figura 1.5: Composición taxonómica de las muestras de <i>16S ARNr</i> asociadas con plantas de sorgo dulce (cv. M81E) cultivadas en el campo bajo diferentes niveles de fertilización con N (+/-N).	45
Figura 2.1: Esquema de la estrategia utilizada en el capítulo II.....	53
Figura 2.2: Esquema resumido de la metodología utilizada para la obtención de las cepas mutantes en los distintos genes.....	61
Figura 2.3: Organización de los vectores utilizados en la edición del genoma	64
Figura 2.4: Placas Petri con medios de cultivo donde se evaluaron las capacidades de movimiento de <i>swimming</i> , <i>twitching</i> y <i>swarming</i>	69
Figura 2.5: Vista de los ensayo realizados para la evaluación de la actividad lacasa en placas de petri con medio de cultivo TY.....	70
Figura 2.6: Distribución de secuencias codificantes dentro de cada categoría de los subsistemas de SEED.	71
Figura 2.7: Construcción de filogenia utilizando (A) 102 genomas del género <i>Pantoea</i> (B) sección del nodo de <i>Pantoea dispersa</i> UYSB45.....	73
Figura 2.9: Esquema de los sistemas de secreción presentes en bacterias y los genes codificantes	76
Figura 2.10: Esquema de los genes involucrados en la quimiotaxis bacteriana.....	77
Figura 2.11: Esquema de los genes involucrados en la formación de biopelículas.	78
Figura 2.12: Esquema del aparato flagelar y genes involucrados en su ensamblado.....	79
Figura 2.13: Algunos de los genes codificante para SDC relacionados a la interacción planta-bacteria identificados en el genoma de la cepa UYSB45	80
Figura 2.14: Sección del metabolismo del Trp y genes involucrados en la producción de AIA.	82
Figura 2.15: Genes involucrados en la biosíntesis de sideróforos.....	83
Figura 2.16: Gel de agarosa mostrando la verificación por PCR de las distintas etapas en la construcción de las cepas mutantes en los 3 genes	87
Figura 2.17: A: Placas de inducción con ambas aproximaciones, de las cuales se eligió las colonias con las cual seguir trabajando	89
Figura 2.18: Curvas de crecimiento en medios de cultivos: (A) TSB (B) LGI (C) LGI-Fe de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 y <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 Δ entF.....	90
Figura C: Principales vías de síntesis de AIA bacteriano dependientes de Trp.....	100
Figura 3.1: Esquema de la estrategia utilizada en el capítulo III.....	106
Figura 3.2: Esquema de la estrategia utilizada en esta sección.....	110
Figura 3.3: Confirmación del marcado de la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45.....	116
Figura 3.4: Curvas de crecimiento de las cepas <i>P. dispersa</i> UYSB45 y <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 en medios de cultivos: (A) TSB (B) LGI.....	117
Figura 3.5: Colonización de la raíz principal de plantas de sorgo dulce por la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 a las 4 h.p.i.....	118
Figura 3.6: Colonización de la raíz principal de plantas de sorgo dulce por la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 a las 16 h.p.i.....	119
Figura 3.7: Colonización superficial e interna de raíces de sorgo dulce por la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 a las 48 h.p.i.....	120
Figura 3.8: Colonización superficial e interna de raíces de sorgo dulce por la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 a las 72 h.p.i.....	122
Figura 3.9: Cortes transversales de raíces de sorgo dulce inoculadas con la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 mostrando la colonización de los haces vasculares de la raíz a las 144 h.p.i.	122

Figura 3.10: Curvas de A: Amplificación y B: Melting de la puesta a punto de la reacción de qPCR con los cebadores diseñados.....	124
Figura 3.11: Cuantificación del número de copias del gen <i>16S ARNr</i> de la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 4655 en plantas de <i>Sorghum bicolor</i> cultivar M81E crecidas en condiciones <i>gnotobióticas</i> a diferentes tiempo pos-inoculación.....	125
Figura 4.1: Esquema de la estrategia Dual RNA-seq empleada.....	137
Figura 4.2: Esquema de la estrategia utilizada para la extracción de ARN	140
Figura 4.3: Flujo de trabajo utilizado en Macrogen.....	142
Figura 4.4: Vista de los distintos ensayos en los que se evaluó la metodología de inoculación bacteriana para el desarrollo de la enfermedad por la cepa patógena M1 en plantas de <i>Shorghum bicolor</i> cultivar ADV2010	145
Figura 4.5: Curvas de crecimiento de la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 en diferentes medios de cultivos bacterianos y de plantas.	146
Figura 4.6: Electroforesis capilar generada por Bioanalyzer, de las extracciones de ARN obtenido a partir de plantas de sorgo dulce.....	147
Figura 4.7: Flujo de trabajo del análisis de los datos de ARN-seq	149
Figura 4.8: Visualización de mapas de calor (<i>heatmap</i>) de genes expresados diferencialmente (DEG) en plantas de sorgo dulce inoculadas con T1: <i>P. dispersa</i> UYSB45 T3: <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 y T4: Plantas de sorgo dulce sin inocular	151
Figura 4.10: Representación gráfica del recuento de los receptores de plantas relacionados a la respuesta a la inoculación bacteriana y su distribución por nodos.....	154
Figura 4.11: Transducción de señales de fitohormonas.	155
Figura 4.13: Distintas categorías GO y su porcentaje relativo al total de categorías GO encontrados en los tratamientos T1, T2 y T3.....	159
Figura E: Visualización del <i>heatmap</i> de los transcriptos expresados diferencialmente (DEG) en plantas de sorgo involucrados en procesos regulatorios en plantas inoculadas con: (A) <i>P. dispersa</i> UYSB45 o (B) <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	169
Figura F: Los transcriptos expresados diferencialmente (DEG) en plantas de sorgo colonizadas por (A) <i>P. dispersa</i> UYSB45 o (B) <i>H. rubrisubalbicans</i>	171
Figura G: Genes expresados en ambos tratamientos T1 (estilo de vida endofítica) y T2 (estilo de vida planctónica).	179
Figura H: Genes expresados exclusivamente en la condición de vida endofítico por la cepa UYSB45 (T1) (Tabla A17).	181
Figura I: Sistemas de 2 componentes	198

Índices de tablas

Tabla 1.1: Características PCV detectadas <i>in vitro</i> en los aislamientos en estudio	36
Tabla 1.2: Cebadores utilizados para la amplificación por qPCR	39
Tabla 1.3: Cebadores utilizados en el análisis por secuenciación por IonTorrent	40
Tabla 2.1: Cepas y plásmidos utilizados para la generación de mutante en este capítulo	54
Tabla 2.2: Lista de los códigos de acceso de los genomas utilizados para los estudios de clasificación taxonómica	58
Tabla 2.3: Cebadores diseñado y utilizados para la generación de las mutantes en los genes <i>acdS</i> , <i>ipdC</i> y <i>entF62</i>	72
Tabla 2.4: Resultados de ANIb, ANIm y TETRA obtenidos con el servicio JSpeciesWS	72
Tabla 2.5: Genes relacionados con la resistencia a antibióticos presentes en el genoma de la cepa <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 bajo el criterio del servicio web CARD <i>Strict</i>	84
Tabla 2.6: Tamaños esperados de los productos de amplificación de las reacciones de PCR realizadas para confirmar las distintas construcciones.	87
Tabla 2.7: Tiempo de generación para las condiciones y cepas ensayadas expresado en horas	91
Tabla 2.8: Ensayo para la detección de producción de sideróforos	91
Tabla 2.9: Características posiblemente relacionadas con la interacción y la PCV presentes en la cepa UYSB45 detectadas <i>in vitro</i>	93
Tabla 2.10: Genes relacionados a la protección contra estrés presentes en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB4597	107
Tabla 3.1: Concentraciones máximas de antibióticos ensayadas (µg/ml)	107
Tabla 3.2: Plásmidos y cepas utilizados en este trabajo	108
Tabla 3.3: Transformantes obtenidas	115
Tabla 3.4: Tiempo de generación(g) para las condiciones y cepas ensayadas.....	117
Tabla 3.6: Cebadores diseñados en este trabajo para la localización dentro de los tejidos vegetales.	123
Tabla 3.7: Transformante obtenida	128
Tabla 3.8: Cebadores diseñados en este trabajo para la localización dentro de los tejidos vegetales.	129
Tabla 4.1: Kits comerciales y muestras estudiadas.....	140
Tabla 4.2: Tiempo de generación (g) de la cepa <i>P. dispersa</i> UYSB45 en los diferentes medios de cultivo evaluados	147
Tabla 4.3: Concentración y valor de RIN de las extracciones de ARN de los diferentes tratamientos	148
Tabla 4.4: Datos obtenidos luego de ser procesados siguiendo el flujo de trabajo utilizado.	148
Tabla 4.5: Número de transcritos mapeados en cada tratamiento en relación con el genoma de referencia en cada caso	150
Tabla 4.5: Recuentos de genes dentro de las 3 principales categorías GO, según agrupación por nodo	153
Tabla 4.6: Listado de genes de interés involucrados en la transducción de señales de fitohormonas y sus respectivos valores TPM.	155
Tabla 4.7: valores TPM y algunos de los genes de interés involucrados en la interacción planta-patógeno.....	157
Tabla 4.8: Algunos de los genes detectados en los tratamientos T1 y T2 y sus TPM correspondientes.....	160
Tabla 4.9: Genes de interés encontrados en T1 y T2	163
Tabla A1: Metadatos de las cepas utilizadas para la construcción del árbol filogenético. AP: Asociado a planta, E: Endófito, P: Patógeno, C: Clínico, S: Suelo, SA: Simbionte de animal, A: Acuático. Marcadas en negrita: genomas que se agruparon en el mismo nodo que <i>Pantoea dispersa</i> UYSB45.	188
Tabla A2: Listado de la abundancia relativa de los genes anotados en las distintas subcategorías según RAST	192
Tabla A3: Genes pertenecientes a sistemas de secreción (SS) presentes en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	193
Tabla A4: Genes pertenecientes a movilidad y quimiotaxis en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	195
Tabla A5: Genes pertenecientes a MCPs encontrados en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 y no asignados a ningún subsistema de RAST	196
Tabla A6: Genes pertenecientes a la quimiotaxis bacteriana encontrados en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 y no asignados a ningún subsistema de RAST.....	197
Tabla A7: Genes pertenecientes a la formación de biopelículas encontrados en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45 y no asignados a ningún subsistema de RAST.....	197
Tabla A8: Genes pertenecientes a los SDC encontrados en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	199
Tabla A9: Genes pertenecientes al <i>quorum sensing</i> encontrados en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	199
Tabla A10: Genes pertenecientes a los SDC encontrados en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	199

Tabla A11: Genes pertenecientes a enzimas relacionadas a la protección contra el estrés en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	200
Tabla A12: Genes pertenecientes a la producción y regulación de fitohormonas en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	201
Tabla A13: Genes pertenecientes a sideróforos, adquisición y metabolismo de Fe en el genoma de <i>Pantoea</i> sp. UYSB45	201
Tabla A14: DEG en <i>S. bicolor</i> en los tratamientos T1, T3 y T4 organizados dentro de su categoría GO	204
Tabla A15: Valores de DEG seleccionados en <i>S. bicolor</i> en los tratamientos T1, T3 y T4 en los nodos 1, 3 y 4.	207
Tabla A16: Valores de DEG seleccionados en <i>S. bicolor</i> en los tratamientos T1, T3 y T4 en los nodos 5 y 6.	211
Tabla A17: genes encontrados solamente en <i>P. dispersa</i> UYSB45 endófito (T1)	213
Tabla A18: Genes de interés encontrados en T3, se muestra en 1 de las categorías encontradas.....	219

Resumen

Las plantas han co-evolucionado con una gran diversidad de microorganismos asociados (microbiota), que tienen funciones claves en el desarrollo y salud de las mismas. Particularmente, la microbiota endofítica bacteriana, es aquella que está asociada a los tejidos internos de las plantas, y es parte esencial de la microbiota asociada a las plantas. Relevar la funcionalidad de las interacciones planta-microbiota y los factores involucrados, permite un mejor entendimiento de las plantas como un meta-organismo y como éstas se benefician de sus socios bacterianos. El objetivo de esta tesis fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos básicos implicados en la interacción entre la microbiota y cultivares de plantas de *Sorghum bicolor* (sorgo dulce), cultivados en Uruguay. En primera instancia se evaluaron los efectos de la fertilización química nitrogenada, mediante metodologías independiente de cultivo; sobre la estructura, diversidad, abundancia y composición de los microbiomas bacterianos endofítico y diazotrófico asociados a plantas de sorgo dulce cultivadas en campo. Se comprobó que la fertilización afecta significativamente la abundancia de los endófitos bacterianos, sobre todo en las raíces. En una segunda instancia, mediante caracterizaciones fisiológicas, genómicas y moleculares se identificaron y caracterizaron algunos de los potenciales mecanismos relacionados a la interacción con hospedero, en la cepas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13; particularmente aquellos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal (PCV). Posteriormente, se estudió mediante técnicas de biología molecular y de microscopía confocal, el proceso colonización e infección de raíces de plantas de sorgo dulce por la cepa UYSB45, definiéndose como una endófita verdadera. Por último, se empleó la técnica “dual RNA-seq”, para analizar comparativamente la expresión génica de los dos componentes de la interacción, al ser inoculadas plantas de sorgo dulce con la cepa endófita UYSB45 o la cepa fitopatógena *Herbasprillum rubrisubalbicans* M1. Se demostró que la planta responde a la inoculación bacteriana expresando diferencialmente genes codificantes para receptores relacionados a la defensa vegetal y a la percepción bacteriana según el tipo de cepa inoculada. Adicionalmente se detectó que en el estilo de vida endófito, la cepa *P. dispersa* UYSB45 expresa diferencialmente genes relacionados al estrés.

Introducción

i- El holobionte planta

El término actual de holobionte refiere a una asociación estrecha entre diferentes individuos y suele utilizarse en el contexto de una simbiosis hospedero-microbiota donde juntos forman unidades anatómicas, fisiológicas, inmunológicas y evolutivas únicas (1). Por lo antedicho las plantas no deben verse como entidades autónomas sino como holobiontes (el hospedero y su microbiota asociada) donde todos los organismos que interactúan contribuyen a la estabilidad general del sistema (2).

Las plantas han evolucionado y se han adaptado para hacer frente a la mayoría de los estreses bióticos y abióticos, dependiendo de su microbiota para realizar muchas funciones biológicas vitales. Algunos de los procesos que involucran a la microbiota incluyen la adquisición de nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico, la protección contra patógenos y la regulación inmunológica del hospedero (3). Conocer la microbiota asociada, ofrece la oportunidad de lograr un efecto sobre las capacidades previamente nombradas, asimismo se deberá contar con la comprensión de cómo los genotipos de las plantas tienen un efecto en la colonización de microorganismos específicos que ayudarían a potenciar las características beneficiosas de la misma (4). En ese sentido, aún es necesario profundizar sobre él o los mecanismos por los cuales el hospedero influye en la microbiota asociada, tanto en condiciones naturales como de laboratorio (5).

La estructura de la microbiota asociada a plantas depende tanto de las interacciones planta-microbiota como del contexto comunitario, incluidas las interacciones microbiota-microbiota y microbiota-planta-microbiota (6). Se ha planteado que la estructura del microbioma del suelo y los parámetros ambientales asociados, son los factores más importantes al momento de la estructuración del microbioma de la planta, más allá del genotipo o la especie de la planta (7, 8).

El holobioma, es decir el genoma del hospedero y el microbioma asociado, puede verse como el reflejo genómico de la compleja red de interacciones simbióticas que vinculan a un individuo de un taxón dado con su microbioma asociado (9). Por lo cual el microbioma

asociado a la planta puede verse como un reservorio de genes y funciones esenciales para el crecimiento y aptitud de la misma (10).

Relevar la funcionalidad de las interacciones plantas-microorganismos así como los factores involucrados, nos llevará a un mejor entendimiento de la planta como un meta-organismo y como estas se pueden beneficiar de sus socios bacterianos (11, 12).

Endófitos bacterianos

El componente microbiano del holobionte vegetal se denomina microbiota vegetal (todos los microorganismos presentes) o microbioma vegetal (todo el material genético de la microbiota presente en la rizósfera, la filósfera y la endósfera). Diversos estudios han determinado que dicho componente tiene importantes funciones relacionadas al crecimiento y la salud vegetal (13). Dentro de la microbiota vegetal se incluyen arqueas, bacterias, hongos y protistas, en este trabajo se hará foco en el componente bacteriano.

Las bacterias endófitas son una parte esencial del microbioma vegetal, siendo transferidas principalmente de forma horizontal (14–16). Dicho lo anterior, las plantas reclutan activamente la microbiota del entorno del suelo, la rizósfera (zona del suelo estrechamente asociado e influenciado por las raíces), la filósfera (la superficie de la hoja que se relaciona con el ambiente externo), la antósfera (la superficie externa de las flores), la espermósfera (la superficie exterior de la semilla germinada) y la carpósfera (la superficie externa de la fruta) (11). Sin embargo, las bacterias también pueden transmitirse verticalmente a través de la semilla; estas representan una fuente importante de microorganismos que proliferan en las raíces de la planta en desarrollo (15, 16). Estas bacterias endofíticas transmitidas por semillas desempeñan un papel fundamental en la germinación; promoviendo el bienestar y crecimiento de la planta desde dicho momento y mejorando así la supervivencia de las mismas (17, 18). Se han descrito casos donde las bacterias colonizadoras de las semillas son recuperados como epífitas, sugiriendo que los endófitos transmitidos de esta manera también pueden colonizar los entornos adyacentes del hospedero a medida que se da el crecimiento y expansión de la misma (16).

En base en la composición de los microbiomas endosféricos y rizoféricos provenientes del suelo, se ha propuesto que las plantas ensamblan sus microbiomas en dos pasos. El primero implica un reclutamiento general de los microorganismos a la vecindad de la raíz y el segundo la entrada de determinados microorganismos a la planta (19). Aunque esta es una hipótesis

plausible, todavía no se ha proporcionado evidencia directa para este modelo. Además, el papel de la microbiota de la superficie de la raíz o rizoplaneo (que forma la interfaz crítica entre las plantas y el suelo) sigue siendo poco conocida, al igual que su composición en relación con la de la rizósfera y la endósfera (20). En el ensamblado del microbioma del arroz, se ha descrito un modelo de varios pasos con tres microbiomas distintos y superpuestos; la rizósfera, el rizoplaneo y la endósfera. Cada uno de estos compartimentos contiene un subconjunto del microbioma proveniente de los demás, el cual se mueve desde las secciones externas hacia las internas de la planta (20).

Formalmente, las bacterias endófitas son aquellas que colonizan activamente los tejidos internos de las plantas y establecen asociaciones sin causarle daño aparente a las mismas (21, 22). Este tipo de bacterias pueden clasificarse según sus estilos de vida en endófitos obligados, oportunistas o facultativos. Los endófitos obligados son aquellos que están estrictamente unidos a las plantas y completan una parte importante o incluso todo su ciclo de vida dentro de estas. Los endófitos oportunistas por su parte, viven principalmente fuera de los tejidos vegetales (epífitas) y colonizan esporádicamente los tejidos internos de la planta (23). Entre éstos se encuentran los colonizadores competitivos de la rizósfera, como las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azospirillum* ampliamente estudiados (11). Finalmente, los endófitos facultativos comprenden a la gran mayoría de los endófitos y son aquellos que pueden escoger habitar la planta u otro ambiente, en distintos momentos de su vida. Aún no está esclarecido si los endófitos facultativos usan sus hospederos vegetales como un vector para la diseminación o si el hospedero los selecciona activamente; siendo lo más probable un balance entre ambas (16, 24) (Figura A).

Mediante el empleo de la técnica de secuenciación masiva del gen *16S ARNr*, ha sido posible la identificación taxonómica del microbioma endofítico asociado a distintos cultivos. Los filos bacterianos más comunes identificados pertenecen a las Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes en ese orden de abundancia (11). Asimismo, los géneros bacterianos más abundantes identificados son *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Massilia*, *Variovorax*, *Collimonas*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* (11).

La relevancia en el estudio de los endófitos bacteriano radica en que mejoran la tolerancia de las plantas a los cambios ambientales y en que promueven el crecimiento de las mismas. Estas características han llevado a la discusión en torno a la utilización de los endófitos como alternativas para el aumento de la producción de cultivos de interés agronómico. Se plantea que la forma de lograr estos beneficios en asociación con las plantas es a partir: (i) de la biodisponibilidad de nutrientes; (ii) del control biológico de patógenos; (iii) del aumento de la tolerancia a los estreses abióticos; (iv) la modulación en el desarrollo vegetal y (v) la supresión del crecimiento de malezas (25).

Interacción planta-endófito

En esta sección se describirá el proceso de colonización de las plantas por las bacterias endófitas en el contexto donde la rizósfera es la fuente de dichas bacterias. La colonización de las plantas por parte de las bacterias endófitas es un proceso complejo que se puede dividir en las siguiente etapas: **(i)** reconocimiento de exudados radiculares y movilidad hacia la planta, **(ii)** adhesión a la superficie radicular y formación de biopelícula, **(iii)** penetración de la superficie de la raíz y **(iv)** colonización del córtex de la planta (14) (Figura A).

i-Reconocimiento de exudados radiculares y movilidad hacia la planta

En la periferia de las raíces, la rizósfera constituye el primer hábitat influenciado por las plantas que las bacterias del suelo encuentran. Esta delgada capa de suelo que rodea las raíces está profundamente influenciada por el metabolismo de las plantas a través de la liberación de oxígeno y la secreción de una gran variedad de exudados. Estos exudados incluye no solo moléculas ricas en carbono que pueden ser utilizadas como fuentes de energía por las bacterias, sino también compuestos antimicrobianos y señales moleculares (2).

La capacidad de detectar y responder rápidamente a estas señales que producen las plantas es uno de los principales factores que influyen la colonización exitosa por las bacterias endofíticas.

Utilización de sustrato: Además de ser un atrayente quimiotáctico para las bacterias, los exudados de las raíces también son la fuente de los nutrientes que permiten las actividades microbianas en la rizósfera facilitando la unión y siguiente colonización interna de los tejidos vegetales. Los exudados de las raíces consisten principalmente en azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos grasos, esteroides, fenoles,

reguladores del crecimiento de las plantas, metabolitos secundarios, proteínas y enzimas. La composición de los exudados de la raíz cambia a medida que la planta se desarrolla o responde a estímulos exógenos (26).

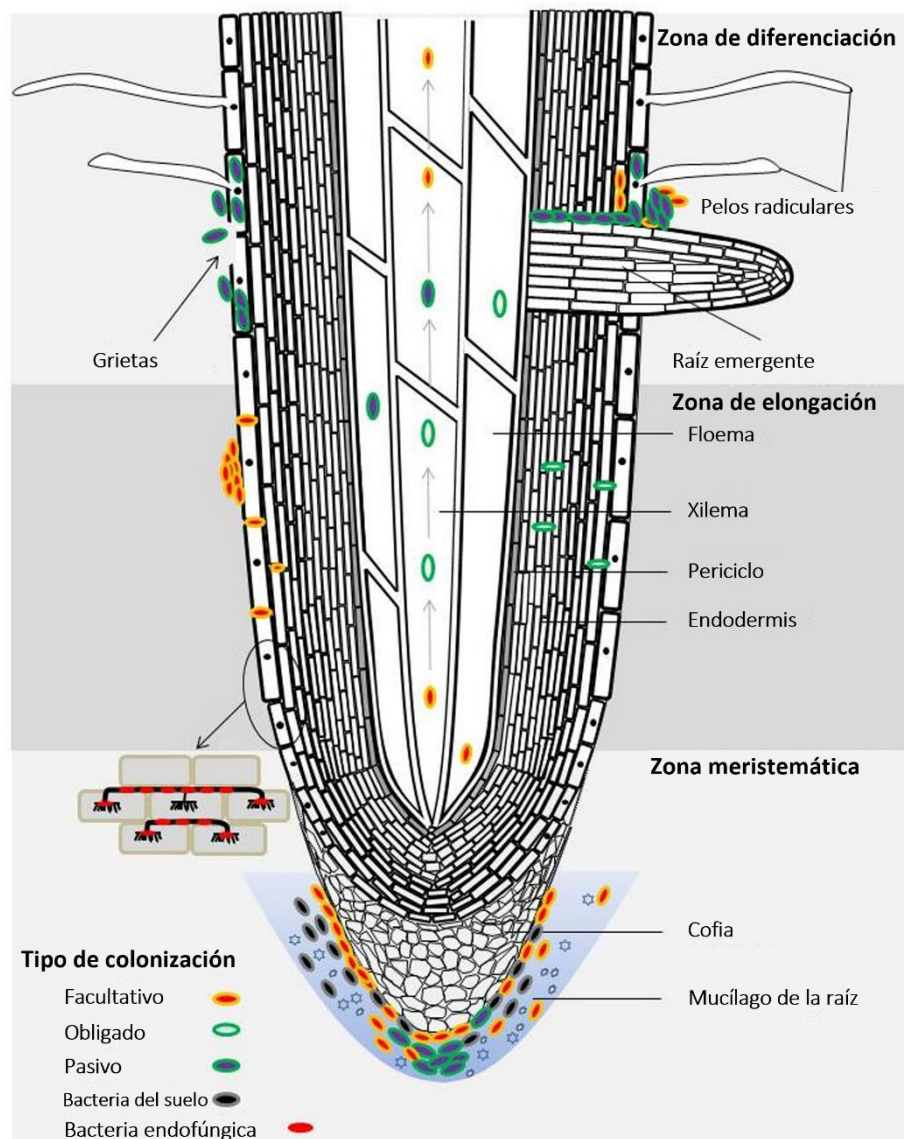


Figura A: Representación esquemática de la distribución de los endófitos bacterianos provenientes del suelo y los patrones de colonización en la endósfera de la raíz de una planta. Los sitios emergentes de raíces laterales se encuentran entre los puntos principales de colonización bacteriana. Las flechas verdes representan la translocación de bacterias dentro del xilema y el floema. Las bacterias endófitas pueden tener diferentes estilos de vida como se muestra en los óvalos de colores. Imagen tomada de Liu y colaboradores, 2017 (27).

Por otro lado, el almacenamiento de carbono por la bacteria también juega un rol importante en la supervivencia de esta luego del establecimiento de la asociación con las plantas, proporcionando una ventaja competitiva para la colonización. En este sentido, una de las ventajas adaptativas descritas es la producción y almacenamiento de polihidroxibutirato

(PHB) por parte de algunas bacterias bajo condiciones de estrés (28). Al estudiar la colonización de plantas de maíz por la cepa *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, se observó una estimulación en la producción de PHB en las células adheridas a la raíz cuando la disponibilidad de nitrógeno y oxígeno era baja. Por su parte, la cepa de *H. seropedicae* SmR1 mutante en la producción de PHB tuvo una baja eficiencia en las primeras etapas de la colonización. Sin embargo, en los días posteriores no se observaron diferencias significativas en la capacidad de colonización entre la cepa de tipo salvaje y mutante, sugiriendo que la importancia de la producción de PHB radica en las etapas tempranas de la colonización (28).

Quimiotaxis y movilidad bacteriana: La colonización de las raíces comienza con el movimiento de las bacterias de vida libre presentes en la rizósfera hacia las raíces, seguido de la colonización del rizoplasma, procesos mediados por flagelos y pili. Las proteínas de quimiotaxisceptoras de metilo (MCPs, por sus siglas en inglés *Methyl-accepting chemotaxis proteins*), juegan un papel importante en estas primeras etapas. Estas proteínas son sensores transmembrana que permiten detectar moléculas señales que rodean a las bacterias para dirigir las hacia los atrayentes o alejarlas de los repelentes, proceso mediado por flagelos (29). La relevancia que tienen los MCPs en la colonización de las plantas fue demostrado en la cepa *H. seropedicae* SmR1. Al inactivarse en dicha bacteria el gen *che*, codificante para una MCPs, el fenotipo de la cepa mutante mostró una reducción a la mitad en la capacidad de adhesión a la raíz al ser comparado con la cepa salvaje (28).

Como se mencionó, el movimiento de las bacterias rizosféricas hacia la raíz es posible debido a la presencia de estructuras celulares como el flagelo y el pili. En el caso de la cepa *Azoarcus olearius* BH72, un endófito-diazótrofo de arroz, los pilis del tipo IV son imprescindibles para la unión a la superficie radicular (30). Definir el papel exacto de los flagelos no es sencillo, dado que sus componentes proteicos pueden también ser reconocidos como patrones moleculares asociados a microbios (MAMP, por sus siglas en inglés *microbe-associated molecular patterns*) y desencadenar la resistencia sistémica inducida en plantas (ISR, *induced systemic resistance*). Se demostró para el caso de la cepa *A. olearius* BH72 que los flagelos no son reconocidos por la planta y no generan una respuesta de defensa por parte de ésta. Sin embargo, los flagelos son necesarios para la colonización endofítica de *A. olearius* BH72 en la interacción con plantas de arroz y probablemente para su propagación dentro de la misma (30).

ii- Adhesión a la superficie radicular y formación de biopelícula

La unión de las bacterias a la superficie de las raíces en parte es posible por su capacidad de formar biopelículas que actúan (entre otros roles importante dentro de la interacción), como una barrera física protegiendo a las células bacterianas. La biopelícula producida por las bacterias está formada por agua, proteínas, polisacáridos, ADN extracelular, ARN e iones (14). La celulosa es un componente importante de la biopelícula en algunas especies, como el caso de la cepa *Salmonella enterica* Newport. Mutantes de dicha cepa en el gen *bcsA* (que codifica para la subunidad catalítica de celulosa sintasa), mostraron una reducción en la formación de la biopelícula y la colonización de la planta de alfalfa, resaltando su rol en esta interacción (31).

Reguladores transcripcionales y proteínas protectoras: La capacidad de las bacterias para responder precisamente a los cambios ambientales es a través de reguladores transcripcionales de procesos esenciales como el migrar hacia una planta, unirse a su superficie y colonizarla. En este sentido, los reguladores involucrados en la formación y adhesión de biopelículas, reguladas a través del *quorum sensing*, cumplen un rol fundamental (14). La función de este tipo de reguladores en la interacción planta-endófito se ha reportado para las cepas *S. enterica*, *Bacillus mycoides* EC18 y *G. diazotrophicus* PAL5, en las cuales mutantes en los reguladores RpoS, factor sigma-28 y GreA respectivamente, presentan disminuida su capacidad de unión a las raíces del hospedero (31–33).

Lipopolisacáridos y proteínas de membrana: Los componentes de la superficie bacteriana juegan un rol importante en las etapas iniciales de unión y colonización de las raíces de las plantas, tal como el caso de los lipopolisacáridos (LPS) en la cepa *H. seropedicae* SmR1, endófito diazótrofo de maíz y otras bacterias Gram negativas (34, 35). Las proteínas componentes de las membranas bacterianas, también juegan un rol importante en la interacción planta-endófito. Tal es el caso de la permeasa de muropéptidos (*ampG*), involucrada en el reciclaje de peptidoglucano de la pared celular bacteriana. Cepas mutantes de *H. seropedicae* SmR1 en el gen que codifica esta permeasa, presentaron una mayor sensibilidad al detergente SDS y alteraciones en la biosíntesis de LPS así como también una reducción de su colonización endofítica de raíces de plantas de maíz de unas diez veces (36).

ii- Penetración de la superficie de la raíz

El lugar preferencial de adhesión bacteriana y posterior infección de los tejidos internos, son la zona apical de la raíz, los pelos radiculares (ingreso activo), así como las zonas basales de las raíces con grietas causadas por el nacimiento de raíces laterales (ingreso pasivo) (Figura A). Durante el ingreso pasivo no es necesaria la hidrólisis de la pared celular, ya que las grietas presentes en la planta facilitan la infección bacteriana. Por lo tanto, aquellas bacterias endófitas capaces de entrar por las rupturas naturales de las raíces laterales de la planta son capaces de ser “invisibles” al sistema inmune de la misma, siendo exitosas en su colonización. Este tipo de mecanismo ha sido descrito para las interacciones de las cepas *H. seropedicae* Z67 y *Burkholderia vietnamiensis* con plantas de *Oryza sativa* (arroz)(37, 38), la cepa *Burkholderia. phytofirmans* PsJN con plantas de vid (39), las cepas *Bacillus subtilis* Lu144 y *Burkholderia cepacia* Lu10-1 con plantas de mora (40, 41), así como para la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 con plantas de caña de azúcar (42).

Sin embargo, para el ingreso activo a la planta, las bacterias endófitas deben poseer una batería de enzimas celulolíticas capaces de hidrolizar la pared de las células de la raíz (39, 43). Algunos endófitos bacterianos son capaces de producir y secretar enzimas degradadoras de celulosa, xilulosa y pectinas, todos componentes de la pared celular de las plantas. Es importante resaltar que las enzimas bacterianas degradadoras de pared celular, están también implicadas en el desencadenamiento de las vías de defensa en la planta (14). La inducción de esta respuesta resulta en una disminución de la propagación de patógenos dentro de la planta. En el caso de las bacterias endófitas, las mismas deben ser capaces de eludir la respuesta inmune de la planta o incluso reducirla con el fin de poder infectar la misma. Cuando se evaluó la mutante en la actividad endoglucanasa de *A. olearius* BH72 se observó una disminución en la colonización de las raíces de plantas de arroz; como así también una disminución en la propagación hacia las partes aéreas de la planta (43).

iv- Colonización del córtex de la planta

Luego de atravesada la barrera exodérmica, una posibilidad es que las bacterias permanezcan en los lugares de entrada o se muevan hacia los tejidos interiores, ocupando así el espacio intercelular del córtex (39, 42, 44).

En el xilema, ocurre el transporte de agua, iones y compuestos de bajo peso molecular como azúcares y aminoácidos hacia toda la planta. Diversos trabajos han demostrado que las

concentraciones de los compuestos antes mencionados son suficientes para el crecimiento bacteriano (45, 46). Una vez en estos vasos las bacterias endófitas pueden ser transportadas a distintas secciones de la planta colonizando así nuevos órganos como el tallo y hojas.

A pesar de la evidencia de la diseminación de los endófitos dentro de la planta, no se puede descartar la posibilidad de que la mayoría de los endófitos que se encuentran dentro de los tejidos de las hojas provengan del ambiente externo siendo su primer punto de colonización la superficie de la hoja (2). En el caso de las cepas *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en interacción con planas de caña de azúcar y de la cepa *Streptomyces galbus* con *Rhododendron ferrugineum* rododendro, se han reportado formas diferentes de ingreso a través de los estomas (47, 48).

Una vez en los tejidos internos de la planta, los endófitos deben contar con ciertas características funcionales para sobrevivir en el nuevo ambiente incluyendo:

Protección contra el estrés: Durante la transición entre la rizósfera y la endósfera, las bacterias deben adaptarse al nuevo ambiente que presenta diferencias en pH, presión osmótica y disponibilidad de O₂. También tienen que superar las respuestas de defensa de la planta, esto incluye la producción de especies reactivas de O₂ (ROS) y de especies reactivas de N (RNS). Para esto, las bacterias endófitas deben ser capaces de detoxificar dichas especies reactivas para su sobrevivencia dentro de la planta. Las mismas poseen enzimas captadoras de ROS y RNS que participan en la reducción de los efectos del estrés incluyendo la catalasa y la reductasa de óxido nítrico entre otras (11). Caracterización de mutantes en la enzima catalasa en la cepa *G. diazotrophicus* PAL5, mostraron que la misma es importante para la desintoxicación de ROS en las etapas tempranas de la colonización de plantas de caña de arroz (49).

La importancia de los sideróforos en la interacción planta-endófito, fue demostrada al caracterizarse una mutante en la producción de sideróforos de la cepa *Serratia marcescens* (90–166). Al compararse la colonización de la rizósfera entre la cepa salvaje y la cepa mutante no se observó diferencias, sin embargo si se observó una reducción en la colonización endofítica demostrándose el rol de los sideróforos en la interacción planta-bacteria (50).

Sistema de secreción bacterianos: Los sistemas de secreción (SS) bacterianos juegan un papel fundamental en la interacción planta-endófito. Los distintos SS han sido descriptos como involucrados tanto en la patogénesis como en la adhesión a células eucariotas. También tienen un rol fundamental en evitar que las bacterias sean eliminadas por el sistema inmune

de la planta (27, 51). Se han descrito ocho tipos diferentes de sistemas de secreción para las bacterias gramnegativas (sistema de secreción de tipo I (SST1) a SST7; Sec y Tat).

El SST3 está involucrado en el transporte de proteínas efectoras al citosol de las células eucariotas, las cuales son capaces de manipular el metabolismo del hospedero y la respuesta del sistema inmune. En el caso de las bacterias endófitas y su interacción con la planta, se ha reportado que cepas mutantes en el SST3 de *H. rubrisubalbicans* M1, se ven afectadas en la colonización endofítica de plantas de arroz (52).

Los sistemas de secreción también pueden delimitar la colonización endofítica, como fue demostrado en la cepa mutante en el SST6 de *A. olearius* BH72. En este caso la cepa mutante presentó una mayor capacidad de colonización que la cepa de tipo salvaje. Esta evidencia indicaría que algunos de los efectores traslocados por el SST6 podrían provocar una respuesta de defensa local del hospedero limitando la colonización endofítica, aunque esto también puede estar dado por una reacción específica del hospedero (53).

Inmunidad vegetal y microbiota

Los mecanismos involucrados en las interacciones planta-microbiota son complejos. Este proceso implica varios niveles de comunicaciones entre organismos, activación e inactivación de genes, así como la inducción y represión de respuestas a diversas señales. Para comprender cómo las bacterias pueden vivir dentro o sobre las plantas hospedadoras, es necesario centrarse en descifrar y entender el diálogo molecular entre la planta y su microbiota (54).

La primera línea de reconocimiento de bacterias fitopatógenas por ejemplo, involucra un conjunto de proteínas receptoras (PRR, por sus siglas en inglés *Pattern Recognition Receptors*) que reconocen una serie de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs por sus siglas en inglés *Damage-Associated Molecular Pattern*) (55). El reconocimiento de PAMPs o DAMPs, desencadena una respuesta de inmune denominada inmunidad activada por patrones moleculares (PTI, por sus siglas en inglés *pattern-triggered immunity*) asociada a patógenos y la inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés *effector-triggered immunity*) (56). La PTI se basa en las acciones de un sistema inmunológico basal, que puede activarse por señales genéricas de un patógeno, como flagelinas bacterianas, lipopolisacáridos y factores de elongación. Por otro lado, la ETI se basa

en las acciones de un sistema inmune innato, que tiene un reconocimiento específico de los genes de resistencia a las enfermedades de las plantas (genes *R*) y de los genes de avirulencia de patógenos (genes *Avr*) (57). Los mecanismos de respuesta de la ETI son similares a los desencadenados por la PTI diferenciándose en la rapidez y la intensidad. La ETI a menudo acompaña a una respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés *hypersensitive response*), que es la muerte celular rápida en células vecinas y adyacentes, así como en el sitio infectado (58), restringiendo así el crecimiento de patógenos en los sitios de infección, empleándose como sello distintivo de la respuesta de ETI (58). Por otro lado, la resistencia sistémica adquirida inducida por patógenos (SAR, por sus siglas en inglés *systemic acquired resistance*) también se induce en respuesta de tipo ETI. En este sentido el estudio de Samain y col., se describió que al utilizar ciertas cepas biocontroladoras de *Paenibacillus*, éstas inducían la regulación positiva de genes codificantes para proteínas relacionadas a patógenos (receptor PR1, por sus siglas en inglés *pathogenesis-related protein 1*), así como la actividad quitinasa, las cual están consideradas como marcadores de SAR (63).

Por otro lado, la resistencia sistémica inducida (ISR por su sigla en inglés *induced systemic resistance*), es la respuesta activada por las bacterias no-patogénicas, incluyendo las promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), la cual se asocia con la regulación positiva de genes involucrados en las vías del ácido jasmónico y el etileno (59). Se asocia también a la ISR, las respuestas en el aumento de la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y metabolitos fenólicos por la planta. Asimismo, los cambios bioquímicos provocados en las plantas inoculadas con BPCV, se correlacionan a menudo con alteraciones anatómicas tales como la deposición de calosa y lignina en los tejidos colonizados por endófitos (60, 61). Un ejemplo de esto es la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* la cual induce la deposición de calosa en la pared celular de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, reforzándolas y evitando así la colonización por la cepa *Ralstonia solanacearum*, responsable de la enfermedad del marchitamiento (62). Por otro lado, la capacidad de producir sideróforos (moléculas quelantes de hierro) por las bacterias ha sido también reportada como involucradas en la protección de la planta. El mecanismo de acción propuesto sería el de limitar a los microorganismo fitopatógenos del hierro nutricional y estimular una resistencia sistémica inducida (ISR)(50).

Promoción del crecimiento vegetal por bacterias

El microbioma vegetal es sujeto de muchos estudios, ya que representa un enorme potencial para la agricultura. Numerosos estudios describen la importancia de los microorganismos para el suministro de nutrientes a las plantas y la resistencia a enfermedades (64). Por lo tanto, son una potencial solución para la transición a una agricultura sostenible manteniendo el rendimiento de los cultivos (65).

Diferentes BPCV han sido aisladas de la rizósfera y de los tejidos internos de plantas de interés agronómico, presentándose como una alternativa biotecnológica a los métodos clásicos de fertilización (22).

El efecto promotor del crecimiento vegetal por las bacterias o moléculas producidas por las mismas se debe a una estimulación del crecimiento de la planta o al mejoramiento del vigor así como del estado sanitario de la misma. Dichos efectos pueden darse por mecanismos en forma directa o indirecta.

Los mecanismos de acción directa conocidos incluyen **(i)** la producción de estimulantes del crecimiento, como las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), así como enzimas que regulan su concentración, **(ii)** el incremento en la capacidad de absorción de minerales como el fósforo, el hierro y el nitrógeno y **(iii)** la producción de sustancias fenólicas como las quinonas, involucradas en la estimulación de la germinación de semillas así como en la emergencia y el establecimiento de la plántula (66). Aquellas bacterias que fijan N_2 (diazótrofos), solubilizan fosfato y/o producen sideróforos son considerados biofertilizantes, ya que aumentan la disponibilidad de estos nutrientes limitantes para la planta.

Por otro lado, los mecanismos de acción indirectos son, **(iv)** el control biológico y **(v)** la estimulación de la resistencia sistémica inducida en plantas. El control biológico de fitopatógenos es realizado por las BPCV a través de la competencia por espacio, nutrientes, agua, luz y oxígeno; o mediante la producción de compuestos químicos antagónicos como antibióticos o bacteriocinas tales como el ácido cianídrico. En esta sección, se pondrá énfasis en la descripción de los mecanismos PCV de acción directa empleados por bacterias.

Fijación biológica del N_2 atmosférico

De los nutrientes fundamentales para el desarrollo vegetal, el nitrógeno es uno de los elementos más estudiados y frecuentemente limitante del crecimiento vegetal. El mismo se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera (N_2), sin embargo bajo esa forma no está

biodisponible para las plantas. Las mismas son capaces de asimilar el nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+), siendo la fertilización química nitrogenada una de las fuentes más comunes para disponer de nitrógeno. Esto supone graves problemas ambientales, dado que solo el 50% del fertilizante suministrado es asimilado por la planta mientras que el resto se pierde por lixiviación, contaminando cursos de aguas superficiales y capas freáticas (67).

La capacidad de fijar biológicamente el N atmosférico (diazotrofía), es exclusiva de los procariotas, siendo un proceso llevado a cabo por la enzima nitrogenasa. Los simbioses diazótrofos más estudiados son los rizobios los cuales inducen estructuras especializadas en las raíces (nódulos) en plantas de leguminosas donde realizan la fijación biológica de nitrógeno (FBN)(68). Además de los diazótrofos-simbioses, existen también los diazótrofos-asociados, los cuales incluyen bacterias de diferentes géneros: *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* (69).

Producción de sideróforos

Otro elemento esencial para los microorganismos es el Fe, el cual participa en un gran número de reacciones metabólicas así como en macromoléculas. Este elemento, es abundante en el suelo pero poco soluble, por lo que no se encuentra biodisponible para las plantas. En respuesta a la limitación de Fe, las plantas producen y excretan fitosideróforos que unen el Fe^{3+} y lo transportan a la superficie de la raíz donde es reducido a Fe^{2+} y absorbido por la planta, sin embargo, los mismos son de muy baja afinidad en comparación con los sideróforos bacterianos (70). Los sideróforos bacterianos, son metabolitos de bajo peso molecular con alta afinidad por el Fe^{3+} producidos en condiciones limitantes en este metal (71).

Se pueden distinguir cuatro tipos químicos de sideróforos en función a la naturaleza química del grupo funcional implicado en la quelación de hierro. Estos son los de tipo catecol, fenolato, hidroxamato y carboxilato, así como también son comunes las mezclas de los diversos tipos. Los sideróforos se sintetizan comúnmente mediante sintetasas peptídicas no ribosómicas (NRPS) o poliquétido sintasa (PKS), mientras que una fracción más pequeña de sideróforos es producida también por vías independientes (72). Uno de los reguladores más común de la homeóstasis del hierro es la proteína Fur (por sus siglas en inglés "*ferric uptake regulator*"), el cual es un represor transcripcional de la vía de síntesis de sideróforos.

Las bacterias que presentan esta ventaja, son muy buenos competidores en la rizósfera lo que contribuye a facilitar la asociación planta-bacteria mediante la colonización de raíces (73, 74). Esta propiedad ha sido ampliamente demostrada en bacterias endófitas aisladas como antagonistas de patógenos en asociación con plantas de arroz, algodón y papa (75–77).

Producción de fitohormonas

Las fitohormonas, son producidas por la planta teniendo un efecto a concentraciones del orden de los micromoles. Las mismas regulan diferentes procesos básicos de la planta a nivel celular así como la respuesta de esta a diferentes factores bióticos y abióticos. Diversos trabajos han demostrado la producción *in vitro* de fitohormonas por bacterias las cuales tienen consecuencia sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (78, 79). Existen seis clases de fitohormonas entre las que se encuentran las auxinas y el etileno.

Auxinas: La auxina más abundante en la planta es el ácido indol-3-acético (AIA). Se ha estimado que cerca del 80% de las bacterias rizosféricas pueden sintetizar esta hormona influenciando los niveles hormonales endógenos de la planta. El efecto de la auxina bacteriana exógena sobre la planta es un aumento en el sistema radicular (largo y área), lo que trae como consecuencia una mayor exploración y captación de agua y nutrientes por las raíces (80). Las vías de síntesis del AIA utilizadas por las rizobacterias descritas hasta el momento son las dependiente del triptófano: la vía indol-3-piruvato (IPyA), indol-3-acetamida (IAM), triptamina (TAM), triptófano oxidasa de cadena lateral (TSO), indol-3-acetonitrilo (IAN); así como una vía independiente del triptófano. Las más comunes son las dependiente del triptófano, precursor secretado por la planta como un exudado radicular (81). Uno de los casos más estudiados es el de la bacteria diazótrofa, *Azospirillum brasilense*, la cual es capaz de promover el crecimiento vegetal mediante la síntesis de AIA (82). Se ha reportado que cuando los niveles de exudados radiculares son limitantes para el crecimiento bacteriano, *Azospirillum brasilense* aumenta su producción de AIA. Esto estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares, lo que trae como consecuencia un aumento de los niveles de exudados radiculares logrando un aumento del crecimiento bacteriano (83).

1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa: El etileno (ET) es una hormona gaseosa que induce la maduración de la fruta y la senescencia de la flor. El ET generalmente estimula la elongación de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y promueve la formación de pelos radiculares. El mismo es sintetizado también bajo condiciones de estrés biótico como la

infección por patógenos, o por estrés abiótico como la sequía o la concentración de sal en el suelo, siendo conocida como la hormona del estrés. La biosíntesis de la hormona en la planta comienza con la conversión del S-adenosil metionina (SAM) en ACC y en 5'-metiltioadenosina (MTA) por la enzima ACC sintasa (84). Según el modelo planteado por Glick, el AIA bacteriano desencadena la expresión de la ACC sintasa en la plantas y como consecuencia la producción de ACC (precursor del ET). El ACC secretado por las raíces es clivado mediante la acción de la enzima ACC desaminasa, convirtiéndolo en α -ketobutirato y amonio reduciendo así los niveles de ET que lleva a la senescencia de la planta. De esta manera las bacterias que poseen la enzima ACC desaminasa, modulan la señalización de la hormona ET resultando en plantas más tolerantes a los estreses ambientales (85). La presencia de la enzima ACC desaminasa ha sido reportada en varias bacterias rizosféricas, de vida libre y endófitas estando distribuida en varios géneros del dominio Bacteria incluyendo *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Achromobacter* y *Variovorax* (86).

ii- Estudio del genoma microbiano

Descifrar los mecanismos moleculares imperantes de las interacciones planta-microbioma es crucial para comprender los efectos beneficiosos o patogénicos que el microbioma puede ejercer sobre la planta. Los estudios basados en las herramientas "ómicas" y las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han demostrado ser herramientas valiosas para estudiar las interacciones entre el microbioma y su hospedero (87).

El estudio del microbioma desde la perspectiva genómica

En los últimos años, se ha hecho evidente que la estructura del microbioma asociado a las plantas juega un rol central en la salud vegetal (88). Dado su rol importante en la agricultura sustentable, se ha puesto énfasis en el estudio de estos microbiomas y sus interacciones. En este sentido las tecnologías de NGS han proporcionado nuevos conocimientos sobre la composición y la organización del microbioma vegetal bacteriano, asociado a plantas de *Arabidopsis*, *Populus* y *Zea mays* (7, 8, 19, 89). Particularmente se realizó la caracterización detallada del microbioma endofítico central asociado a la raíz de *Arabidopsis*, mostrando que los filos dominantes dentro de la misma, son menos diversos que aquellos asociados al suelo alrededor de la raíz (7, 8). A su vez, se observó que el microbioma endofítico presenta una variación dependiente del genotipo dentro de las especies de *Arabidopsis* evaluadas, y una mayor variación cuando se examinan otras especies relacionadas (9-11).

Sin embargo se ha reportado la importancia de combinar métodos tanto dependientes como independientes del cultivo para caracterizar la microbiota de las plantas, evidenciándose que ningún método puede capturar el microbioma de la planta en su totalidad. Esto parece ser especialmente relevante para la caracterización del microbioma endofítico que habitan en ambientes nutricionalmente pobres, tales como los vasos del xilema (90).

iii- Perfil transcripcional en la interacción planta-bacteria

El análisis transcriptómico de bacterias asociadas a plantas utilizando la tecnología de secuenciación masiva del ARNm (RNA-seq), ha revelado genes que se expresan diferencialmente bajo diferentes condiciones (91). Alguno de los géneros bacterianos ampliamente estudiados en su interacción con la planta son *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Bacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, y (Para-) *Burkholderia* entre otros (91). La mayoría de los estudios han hecho foco en la respuesta de la bacteria a la interacción con el hospedero (principalmente por exposición a exudados radiculares), mientras que los menos analizaron la respuesta transcripcional de las plantas (53, 92, 93). En estos últimos trabajos, se ha descrito que la regulación transcripcional puede ir desde la disminución de la respuesta de defensa, la señalización hormonal, la reprogramación del desarrollo vegetal hasta la homeostasis del hierro (94–98). Hasta la fecha, la mayoría de los estudios transcriptómicos de bacterias asociadas a plantas se han realizado cultivando las bacterias y el hospedero independientemente. Para sortear esta limitación experimental, han surgido los estudios de transcriptomas de aislamientos bacterianos *in planta*. Estos, son capaces de reportar la expresión simultánea de genes bacterianos y vegetales (denominado “dual RNA-seq”) (94, 99, 100).

En este sentido al realizarse un perfil transcripcional de raíces de trigo colonizadas por la cepa PCV *A. brasilense* FP2 utilizando la estrategia de dual RNA-seq, se evidenció el cambio en la expresión de genes vegetales debido a la colonización bacteriana. Los resultados mostraron que los genes que se vieron afectados pertenecen a varias categorías funcionales, incluyendo la actividad de transporte, la regulación biológica, así como también los mecanismos de defensa, producción de fitohormonas y fitoquímicos. Por otro lado, se observó que los genes bacterianos que presentaron expresión diferencial en la cepa *A. brasilense* FP2, estaban relacionados a la quimiotaxis bacteriana, la formación de biopelícula y la FBN (101). El desafío para el estudio de transcriptomas bacterianos *in planta* es el hecho de que con esta estrategia se obtienen un número mayor de transcritos pertenecientes a la planta, en comparación con los transcritos bacterianos. A su vez, la mayoría de estos transcritos bacterianos son codificantes para ARN ribosomales *housekeeping*. Dicho esto, es difícil lograr una

concentración suficiente de transcriptos de ARNm bacteriano para la secuenciación y el análisis de su expresión diferencial. Para enriquecer significativamente los transcriptos de la cepa *P. syringae* en un modelo de infección de hojas de *Arabidopsis* se utilizó durante el aislamiento, una solución tampón que estabiliza el ARN bacteriano durante el triturado de hojas, logrando de esta manera mantener la integridad de las moléculas de ARN y una optimización en la extracción de ARN bacteriano (102).

Por otra parte, también se ha utilizado este tipo de aproximación tecnológica en el caso de las interacciones entre bacterias patógenas y sus respectivos hospederos. Cuando se analizó el modelo *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* infectando plantas de arroz, los resultados revelaron la dinámica entre los actores involucrados y las estrategias explotadas por parte del patógeno para causar la enfermedad (103). Otro de los modelos bacteriano patogénico estudiado es la cepa *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, agente causal de la enfermedad de la raya roja (RSD, por sus siglas en inglés: *red stripe disease*) y enfermedad de las rayas moteadas en plantas de sorgo y caña de azúcar respectivamente. De los 63 genotipos de *Sorghum bicolor* inoculados con *H. rubrisubalbicans* M1, 59 mostraron síntomas de RSD (104). El análisis de las secuencias del ARN de las plantas inoculadas con el patógeno se identificaron genes cuyos niveles de transcripción eran regulados diferencialmente durante la infección los cuales estaban relacionados a la interacción planta-patógeno. Entre ellos, los receptores repetidos ricos en leucina, proteína quinasa, proteínas de unión a calcio, factores de unión a elementos sensibles al etileno y calosa sintasa (104).

También se ha resaltado la importancia del analizar los datos de secuenciación a partir del dual RNA-seq correctamente ya que los resultados pueden variar según la estrategia de mapeo utilizada. Esto puede guiar a interpretaciones incorrectas al momento del estudio de la interacción entre organismos (105).

Finalmente, para una mejor comprensión de las bases moleculares sobre la resistencia a enfermedades, así como sobre la PCV mediada por endófitos, resulta interesante el realizar un análisis comparativo del transcriptoma de plantas infectadas con endófitos PCV, y plantas no inoculadas o inoculadas con un patógeno. Asimismo, estudios comparativos con respecto a los perfiles de expresión diferencial de endófitos dentro y fuera del hospedero también pueden ser útiles para identificar los factores de interacción involucrados en el mantenimiento de la relación benéfica (106).

Antecedentes de la línea de investigación

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana (BIOGEM) del IIBCE-MEC, cuenta con una extensa experiencia en el estudio de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Gran parte de los esfuerzos se han orientado a profundizar en el conocimiento de las bacterias nativas asociadas a distintos cultivos vegetales, por considerar que constituyen una riqueza natural de nuestro suelo sobre la cual existe muy escasa información. El grupo se ha focaliado en el estudio de la interacción entre bacterias PCV y leguminosas (107–113) así como con gramíneas (114–118). Particularmente el grupo de investigación en el cual se realizó esta tesis focaliza su estudio en las bacterias endófitas capaces de promover el crecimiento de cultivos de interés agronómico. Entre los cultivos que se estudian se encuentran la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), la canola (*Brassica napus*), la festuca (*Festuca arundinacea*) y el cannabis (*Cannabis sativa* L) (114, 116, 118). Esta línea de investigación tienen como objetivo general generar insumos que aporten a la disminución del uso de la fertilización química en dichos cultivos mediante el empleo de BPCV. Uno de los proyectos enmarcado en esta línea de investigación y precedente a esta tesis de Doctorado, tuvo como objetivo conocer los mecanismos básicos de la interacción entre cultivares de sorgo dulce cultivadas en Uruguay y sus bacterias nativas promotoras del crecimiento vegetal asociadas. En dicho proyecto, y a partir de una colección de bacterias nativas asociada a la cultivar comercial M81E, se han identificado 2 aislamientos con capacidad PCV en la cultivar de sorgo dulce mencionada, en condiciones de invernáculo, *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 (116).

Modelo de estudio

Sorghum bicolor

Las plantas de la especie *Sorghum bicolor* (L) Moench (sorgo dulce), pertenecen a la familia de las Poaceae, las cuales se caracterizan por presentar espigas que nacen de a pares. Se especula que las mismas son originarias de África Central (Etiopía o Sudán), pues es ahí donde se encuentra la mayor diversidad de especies (119). Este cultivo presenta una altura de 1 a 2 metros exhibiendo en algunos casos macollos, los cuales se forman a partir de las yemas axilares y son de maduración más tardía que el tallo principal. La presencia de éstos es varietal y está influenciada por la fertilidad y las condiciones hídricas. Las plantas adultas pueden desarrollar entre 7 a 24 hojas, las cuales son alternas, opuestas y de forma linear lanceolada. La nervadura media de la misma es blanquecina o amarilla, en los sorgos de médula seca, o verde en los de médula jugosa. El borde de las hojas presenta dientes curvos, filosos y numerosas células motoras ubicadas cerca de la nervadura central del haz las cuales facilitan el arrollamiento de la lámina durante períodos de sequía. Las plantas de sorgo presentan inflorescencias en forma de panoja, semilla de 3mm, esférica y oblonga, de color negro, rojizo y amarillento; así como flores con estambres y pistilos. Asimismo, presenta un sistema radicular que puede llegar en terrenos permeables hasta 2 m de profundidad (FAO).

El sorgo dulce, es el quinto cultivo en importancia en el mundo después del trigo, el arroz, el maíz y la cebada, con una producción mundial de aproximadamente 60 millones de toneladas por año (FAO).

En las latitudes de nuestro país, el cultivo de sorgo dulce presenta un ciclo anual de 120 a 180 días, siendo complementario al del cultivo de caña de azúcar lo que permite ser incluidos en ciclos de rotación para la producción de biocombustibles (120, 121). Presenta una alta adaptación a la sequía, a la heladas y puede ser cosechado mecánicamente. Este conjunto de características hacen que este cultivo presente condiciones agroclimáticas muy óptimas para su explotación en nuestro país (122). Sin embargo la fertilización química empleada para su óptimo crecimiento representa una alta proporción del costo total de producción, siendo aplicada en la mayoría de los casos en exceso. Más aún, solo la mitad de la totalidad del fertilizante suministrado es asimilada por la planta perdiéndose el restante por lixiviación o escorrentía. Esto trae como consecuencia la contaminación de los cursos de aguas superficiales así como el de las capas freáticas (67). Esta problemática enfatiza el hecho de la

necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías para ser empleadas en la agricultura con el fin de lograr sistemas de producción más sustentables.

***Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45**

Las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 fueron aisladas de órganos de plantas de *Sorghum bicolor* (cultivar M81E) provenientes de parcelas de campo sin historia de fertilización y de plantas trampa, respectivamente. Las raíces y tallos fueron tratados con agentes químicos para la eliminación de los microorganismos presentes en la superficie, por lo que *a priori* los definimos como posibles endófitos. Ambas bacterias en estudio presentan la actividad ACC-desaminasa así como la capacidad de producir la fitohormona ácido indolacético (AIA). Específicamente la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 presenta el gen *nifH*, codificante para una de las subunidades de la enzima nitrogenasa, y también es capaz de crecer en medio semisólido sin fuente de N, por lo que lo definimos como un potencial diazótrofo. Por otro lado, la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 presenta la capacidad de biodisponibilizar P y Fe. Asimismo, ambas cepas presentaron la capacidad de PCV al ser inoculadas en el cultivar de sorgo dulce de las que fueron aisladas, en condiciones de invernáculo (116).

***Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1**

H. rubrisubalbicans, es una bacteria endofítica fijadora de nitrógeno que se encuentra en asociación con varios importantes cultivos como el maíz (*Zea mays*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y el arroz (*Oryza sativa*) (123). Aunque forma asociaciones beneficiosas con varias especies de plantas, la cepa *H. rubrisubalbicans* M1 también se ha descrito como patógena de plantas de sorgo y caña de azúcar (124, 125). Esta bacteria se aisló por primera vez de hojas de caña de azúcar (B-4362) en Barbados, donde se demostró que era el agente causante de la enfermedad de la raya moteada y posteriormente se demostró que causa la enfermedad de la raya roja (RSD) en genotipos de sorgo susceptibles (124, 126). Recientemente se ha planteado como modelo fitopatógeno para estudiar el sistema inmunológico de plantas de *Sorghum bicolor* (104).

Hipótesis

El fenotipo resultante de la interacción entre plantas de sorgo dulce y su microbiota endofítica bacteriana asociada, depende del paquete tecnológico aplicado, del genotipo de la planta, así como del tipo de bacteria implicada.

Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos básicos y su regulación, implicados en la interacción entre cultivares comerciales de plantas de *Sorghum bicolor* utilizados en Uruguay y su microbiota bacteriana endofítica asociada.

CAPÍTULO I: La interacción entre la microbiota bacteriana endofítica y plantas de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) depende del genotipo de la planta y de la aplicación de fertilizante químico nitrogenado en condiciones de campo

Objetivo:

- 1- Evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal por parte de aislamientos seleccionados en los cultivares comerciales de sorgo dulce, M81E y ADV2010
- 2- Evaluar los efectos de la fertilización nitrogenada sobre la estructura, diversidad, abundancia y composición del microbioma endofítico y diazotrófico asociado con plantas de sorgo dulce en condiciones de campo.

Estrategia

En trabajos previos se describió parte de la microbiota asociada al cv. M81E de sorgo dulce. Aislamientos de esta microbiota mostraron características *in vitro*, asociadas a la promoción del crecimiento vegetal (PCV), y algunos de ellos fueron descritos como PCV del cv. M81E en condiciones *in vitro* y de invernáculo (116). En este capítulo en primera instancia, se evaluó la capacidad PCV de las cepas UYSB45 y UYSB13, en condiciones de invernáculo en dos de los cultivares de sorgo dulce empleadas para la producción de biocombustibles M81E y ADV2010 (figura 1.1).

Por otro lado, se evaluó mediante PCR cuantitativa (qPCR) y secuenciación masiva de genes marcadores, el efecto de la fertilización química nitrogenada sobre el microbioma endofítico y endofítico-diazotrófico, asociado a plantas de sorgo dulce (cv. M81E), crecidas en condiciones de campo (figura 1.1).

En su conjunto los resultados obtenidos aportaron insumos para el entendimiento de la interacción entre el microbioma endofítico bacteriano y su interacción con el hospedero con miras al desarrollo de un bioinoculante.

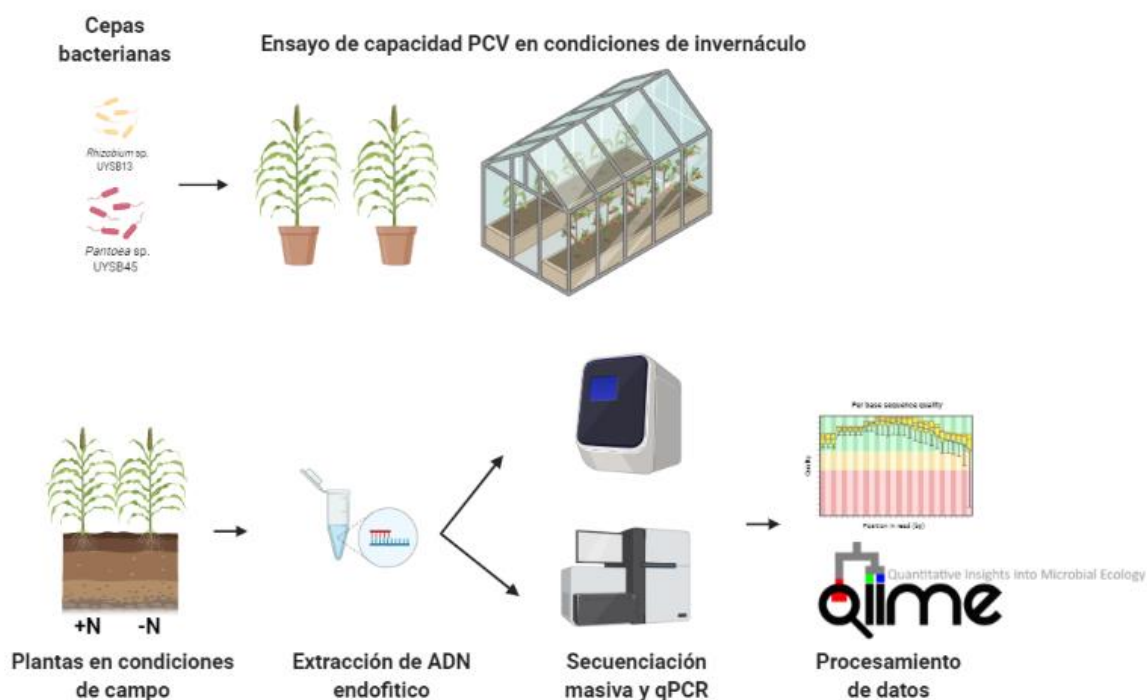


Figura 1.1: Esquema de la estrategia utilizada en el capítulo I. La capacidad PCV de las cepas UYSB45 y UYSB13 fue evaluada en condiciones de invernáculo en dos cultivares de sorgo dulce empleados para la producción de biocombustibles (M81 y ADV2010). Por otro lado, para estudiar el efecto de la fertilización química sobre los microbiomas presentes en las plantas de sorgo dulce (cv M81E), crecidas en condiciones de campo, se extrajo el ADN del microbioma endofítico mediante kit comercial y se utilizaron las técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) empleando cebadores para los genes *16S ARNr* y *nifH* y de secuenciación masiva del gen *16S ARNr*. Creado con BioRender.com.

Materiales y Métodos

1.1. Cepas bacterianas y cultivares de plantas empleados

Las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 utilizadas en este trabajo forman parte de una colección de bacterias asociadas a plantas del cultivar de sorgo dulce cv. M81E (116). Las mismas fueron seleccionadas dadas sus características PCV identificadas *in vitro* así como su capacidad *in vivo* de promover el crecimiento de plantas de sorgo dulce. Entre las características *in vitro* identificadas se encuentra la producción de sideróforos, la actividad ACC-desaminasa así como la capacidad de producir la fitohormona ácido indolacético (AIA) (116) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Características PCV detectadas *in vitro* en los aislamientos en estudio

Aislamientos	Bioestimulación ^a		Biofertilización ^b				Infección ^c			
	IAA	ACC	<i>nifH</i>	CP	Ca ₃ PO ₄	SID	CE	HC	PROT	BIO
<i>Rhizobium</i> sp. UYSB13	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	+	nd	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^aIAA: producción de ácido indol-3-acético; ACC: actividad aminocyclopropane-1-carboxylato desaminasa. ^b*nifH*: presencia del gen *nifH*, codificante para una de las unidades de la nitrogenasas, detectado por PCR; CP: crecimiento en película; Ca₃PO₄: solubilización de fosfato de calcio inorgánico; SID: producción de sideróforos. ^cCE: actividad exo-celulosa; HC: actividad hemicelulosa; PROT: actividad proteasa; BIOFILM: Producción de biopelículas

Las semillas de sorgo dulce utilizadas en este trabajo corresponden a los cultivares de sorgo dulce M81E y el híbrido ADV2010, provistas por la empresa ALUR S.A. El cultivar M81E es del cual originalmente fueron aisladas las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis. Dicho cultivar fue desarrollado por Mississippi State University-Meridian, a partir de la variedad *S. saccharatum* (127). Por otro lado, el cultivar ADV2010 fue desarrollado por la empresa Advanta semillas, a partir de la hibridación de las variedades *S. bicolor* y *S. saccharatum* siendo el cultivar utilizado en la actualidad en Uruguay para la producción de biocombustibles. Cabe resaltar que ambos cultivares presentan un elevado contenido de azúcares solubles y rendimiento estimado de etanol, entre otras características positivas de interés industrial (128).

1.2 Ensayos de respuesta de plantas de sorgo dulce a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo

Para esto se desinfectaron en la superficie semillas de los cultivares M81E y ADV2010 de sorgo dulce mediante una incubación de 5 min con EtOH 70% (v/v) seguido de 4 lavados con agua desionizada estéril. El control de esterilidad se realizó mediante el rolado de 20 semillas en placas con medio de cultivo TSA la cuales fueron incubadas por 48hs. Se considero una desinfección exitosa cuando no se observaron colonias bacterianas en la placa control. La inoculación bacteriana se realizó mediante el método de inmersión; el mismo consiste en incubar en agitación leve durante 3 horas 300 semillas en una suspensión bacteriana de 1×10^7 ufc/ml de la cepa de interés. Posteriormente las semillas inoculadas, fueron transferidas a macetas de 1,5 kg de mezcla suelo:arena estéril (1:1) como sustrato.

El experimento contó con 5 tratamientos: plantas de sorgo dulce inoculadas con la cepas a evaluar **1-** *Pantoea* sp. UYSB45, **2-** *Rhizobium* sp. UYSB13, **3-** plantas inoculadas con la cepa de referencia *Azospirillum brasilense* Sp7 (129), **4-** plantas sin inocular ni fertilizar (control negativo) y por último **5-** plantas suplementadas con una solución de urea (50 KgN/ha) (control positivo). La fertilización se realizó mediante riego semanal con la solución de urea en 4 dosis, logrando la concentración final de N a la cuarta semana. En todos los casos se utilizaron 12 réplicas por tratamiento dispuestas en un diseño aleatorio. Durante el primer mes las plantas se crecieron en el cuarto de plantas en condiciones controladas, 26°C con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad. Pasado ese periodo de tiempo los tratamientos se re-inocularon y el ensayo se trasladó al invernáculo. A los 4 meses post inoculación (pi), el ensayo se cosechó evaluándose los parámetros biométricos diámetro y altura del tallo. Posteriormente las plantas se seccionaron en raíz y tallo y se colocaron en un horno a 60°C hasta peso constante, momento en el cual se determinó el peso seco radicular y aéreo. El experimento conto con 2 repeticiones independientes. Ambas en la misma estación del año, verano, en los años 2017 y 2018.

1.2.1 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos fueron realizados con el programa Infostat. Para ello se aplicó un análisis de varianza (ANAVA) con un p-valor < 0,05 y de existir diferencias

significativas, las medias de los tratamientos se compararon utilizando el test de LSD Fisher ($p < 0.10$) (130).

1.3 Muestreo de plantas de sorgo dulce y extracción de ADN endofítico

Plantas de sorgo dulce crecidas en condiciones contrastantes de fertilización química (100 y 0 kg/ha), donde se utiliza una mezcla de fertilizante NPK y urea, fueron colectadas en Bella Unión (Artigas) (30°37'56.0"S 57°21'18.0"W).

Para el estudio del microbioma bacteriano presentes en las plantas de sorgo dulce mediante qPCR, cada planta colectada (tres plantas de cada nivel de fertilización), se dividió de forma independiente en raíces y tallos superiores e inferiores. El ADN total de microbioma se extrajo a partir de 1,5 g de cada fracción vegetal con el kit de aislamiento de ADN PowerSoil® (MO BIO Laboratories Inc., USA.) y se purificó con el sistema de limpieza de ADN Kit Wizard® (Promega, USA). Previo a la extracción del ADN bacteriano, las muestras de tallo se desinfectaron con EtOH al 70% y se despegó la epidermis con un bisturí estéril. En el caso de las raíces, el suelo rizosférico se eliminó por vortex durante 10 min en NaCl al 0,9 %, el material se desinfectó durante 10 min en EtOH al 70 %, se esterilizó superficialmente durante 30 min en hipoclorito de sodio al 4 % y luego se enjuagó con agua desionizada estéril. Finalmente, las muestras de raíces se sonicaron durante 15 min y se agitaron en vórtex durante 1 min. Posteriormente, se retiraron los extremos del material con un bisturí estéril y se desecharon. Al resto del tejido se le realizaron pruebas de esterilidad en placas TSA (tripticase soja agar). La integridad del ADN extraído se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con tampón TBE 1X, tiñéndose con GoodView (Beijing SBS; Genetech). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C antes de la amplificación por qPCR. El ADN obtenido fue utilizado como molde para cada reacción de PCR a una concentración de 16 ng/μl.

Por otro lado, para el análisis mediante secuenciación masiva por Ion Torrent, se emplearon las mismas muestras de plantas utilizadas en el experimento de qPCR. En este caso, se muestrearon y agruparon tallos de cuatro plantas de sorgo dulce de dos campos diferentes con niveles de fertilización de N contrastantes (0 y 100 kg/ha). La extracción de ADN bacteriano se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente (131), con las siguientes modificaciones: los tallos se pelaron con bisturí estéril y 50 g de los tejidos internos del tallo se homogeneizaron en 300 ml de agua Milli-Q. La extracción de ADN bacteriano de la fracción enriquecida se obtuvo mediante un método de aislamiento de ADN bacteriano CTAB (Joint

Genome Institute protocols/<http://1ofdmq2n8tc36m6i46scovo2e.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2014/02/JGI-Bacterial-DNA-isolation-CTAB-Protocol-2012.pdf>). La pureza del ADN extraído se verificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) según la relación 260/280nm y se cuantificó con un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). La integridad del ADN también se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % con tampón TAE 1X.

1.4 Cuantificación del microbioma bacteriano por PCR cuantitativa (qPCR)

Las abundancias de los genes *16S ARNr* y *nifH* en las muestras de tejido vegetal se cuantificaron mediante qPCR utilizando los cebadores 6S-27F/338R y POLF/POLR (Tabla 1.2), respectivamente (132, 133).

Tabla 1.2: Cebadores utilizados para la amplificación por qPCR

Nombre	Secuencia 5->3	Gen	Referencia
6S-27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	<i>16S ARNr</i>	(133)
338R	GCTGCCTCCCGTAGGAG		
POLR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA	<i>nifH</i>	(132)
POLF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC		

La reacción de qPCR se realizó en el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad), y todas las mediciones se realizaron utilizando SYBR Green. La mezcla de PCR fue de 12,5 µl de iQSYBR Green Supermix (Bio-Rad), 1 µM de cada cebador y de 4 a 25 ng de plantilla de ADN, dentro de un volumen total de 25 µl. El ciclo de qPCR para el gen que codifica el *16S ARNr* consistió en un paso de desnaturalización de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 58 °C y 30 s a 72 °C. El ciclo de qPCR para el gen *nifH* consistió en un paso de desnaturalización de 5 min a 95 °C y 40 ciclos de 10 s a 95 °C, de 10 s a 59 °C y de 30 s a 72 °C. La especificidad del producto se confirmó mediante análisis de la curva de disociación (58–95 °C, 0,5 °C por lectura, 5 s hold), y la visualización del producto mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (p/v). Se esperan bandas específicas del producto con un tamaño esperado de 180 pb para el gen *16S ARNr* y 360 pb para el gen *nifH*. Para ambos genes, se utilizaron tres réplicas por duplicado. Los datos se analizaron en el software BIORAD CFX Manager 3. 1.

Para la curva estándar, se emplearon triplicados para cada corrida utilizando un número conocido de cada gen del genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (134), de $6,62 \times 10^1$ a $6,62 \times 10^5$ copias del gen *nifH* y de $1,99 \times 10^3$ a $1,99 \times 10^6$ copias del gen que codifica el *16S*

ARNr. Para la curva estándar, las concentraciones de masa de ADN estándar se convirtieron en concentraciones de copia utilizando la siguiente ecuación (135):

$$ADN \text{ (copia)} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ copia. mol}^{-1} \times \text{cantidad de ADN (g)}}{\text{largo de ADN (pdb)} \times 660 \text{ (g. mol. pdb)}^{-1}}$$

donde el número de Avogadro que es $6,02 \times 10^{23}$ corresponde al número de copias del gen, siendo el peso molecular promedio de un pb de ADN de 660 g/mol. Tanto el largo del ADN del genoma, como el número de copias del gen (expresado como cantidad de ADN en la formula), eran datos conocidos (134). El número de copias de cada muestra problema se halló extrapolando a partir de la curva estándar, empleándose triplicados para cada corrida de la curva. Los resultados se expresaron en número de copias de gen.

1.4.1 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se realizó una prueba de ANOVA utilizando el programa InfoStat y en aquellas circunstancias en las que se confirmaron diferencias significativas se compararon las medias mediante la prueba de Tukey con una $P < 0,05$ (130).

1.5 Secuenciación masiva del gen bacteriano *16S ARNr* mediante Ion Torrent®

La amplificación por PCR de la región V6 de las secuencias del gen *16S ARNr* se llevó a cabo utilizando un grupo de seis cebadores degenerados (Tabla 1.3) (136).

Tabla 1.3: Cebadores utilizados en el análisis por secuenciación por IonTorrent

Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
967F-PP	CNACGCGAAGAACCTTANC	(136)
967F-UC1	CAACGCGA AAAACCTTACC	
967F-UC2	CAACGCGCAGAACCTTACC	
967F-UC3	ATACGCGARGAACCTTACC	
967F-AQ	CTAACCGANGAACCTYACC	
1046R	CGACAGCCATGCANCACCT	
1046R-PP	CGACAACCATGCANCACCT	
1046R-AQ1	CGACGGCCATGCANCACCT	
1046R-AQ2	CGACGACCATGCANCACCT	

La secuenciación de masiva de los amplicones se realizó utilizando la plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) de la Plataforma de Secuenciación del IIBCE (Uruguay). Las lecturas de secuenciación sin procesar se verificaron utilizando los siguientes criterios de

calidad: (i) se descartaron las lecturas policlonales con Ion Torrent Suite (5.03), (ii) las lecturas se recortaron a un largo de 90 pb, descartándose las más cortas, (iii) también se descartaron las lecturas con una tasa de error esperada igual o mayor a 1 utilizando Usearch y (iv) las lecturas que coincidían con el genoma de *Sorghum bicolor* (137) usando Bowtie 2 (138) también fueron descartadas. El análisis siguió el proceso descrito por Pylro et al. (139). Se desarrollo un *script* para automatizar el proceso; estos están disponibles en el sitio <https://github.com/mberacochea/sorghum-bicolor-M81E-16S>. Todas las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron con el número de acceso PRJNA352426 del NCBI.

Resultados

1.6 Respuesta de plantas de sorgo dulce a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo

El análisis de los resultados mostró que para el cultivar ADV2010, los tratamientos inoculados con las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 presentaron diferencias significativas respecto al control negativo en las variable peso seco, tanto de raíz como de parte aérea (Figura 1.2).

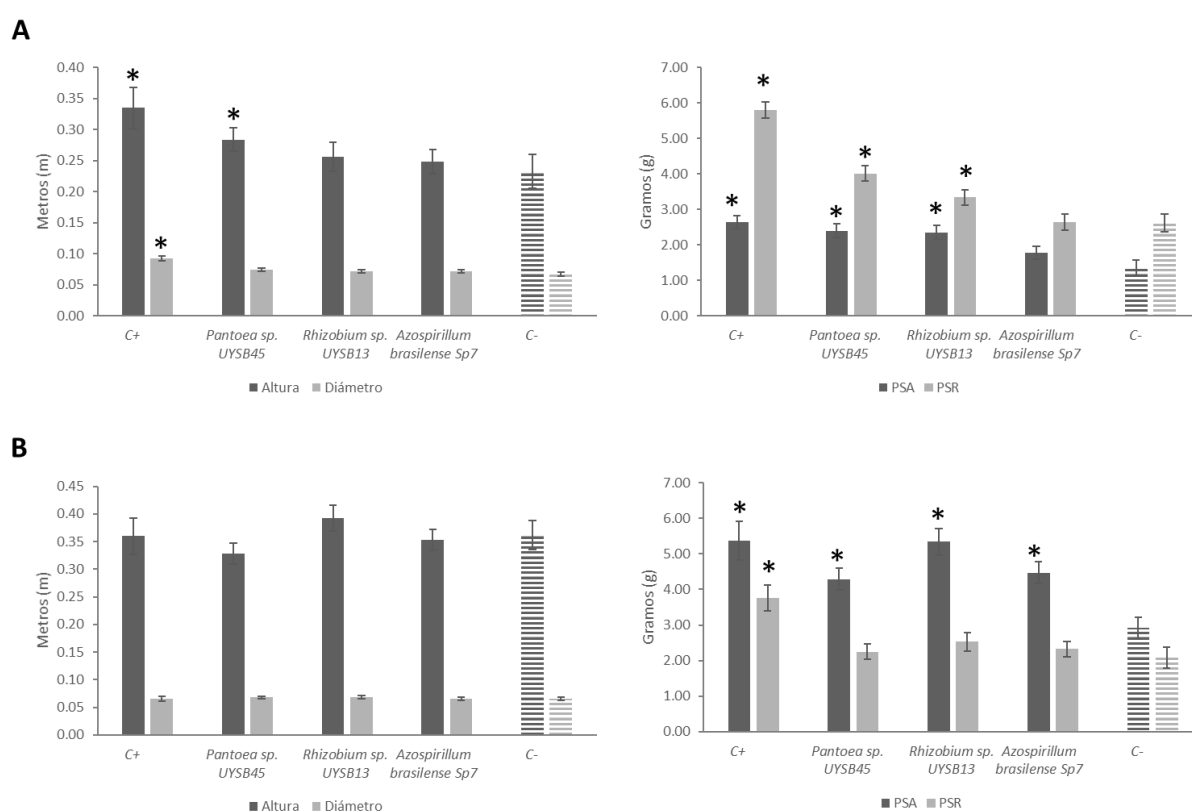


Figura 1.2: Efecto de la inoculación con las cepas *Pantoea* sp. UYSB45, *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Azospirillum brasilense* Sp7 en plantas de *Sorghum bicolor* var: (A) ADV2010 y (B) M81E en condiciones de invernáculo. Evaluados a los 4 meses p.i. C-: control negativo, plantas sin inocular y sin fertilización química; C+: control positivo, plantas sin inocular y suplementadas con solución de urea; PSA: peso seco aéreo; PSR: peso seco radicular. Los tratamientos con asteriscos representan medias significativamente distintas en comparación con el control negativo ($p < 0.10$).

Por otra parte, cuando se evaluó la respuesta a la inoculación en el cultivar M81E, se observaron los mismos resultados obtenidos en trabajos previos, en los cuales los

tratamientos inoculados con *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45, presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo en el peso seco aéreo (116).

Finalmente, en el tratamiento en el cual se inoculó la cepa referencia *A. brasilense* Sp7 no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados con respecto al control negativo en el cultivar, ADV2010, pero si en el peso seco aéreo en el cultivar M81E.

En ambos ensayos realizados en años consecutivos se observó la misma tendencia, hay un efecto PCV como respuesta de las plantas de sorgo dulce de ambos cultivares a la inoculación de las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45.

1.7 Cuantificación de los microbiomas endófitos y endófitos-diazotrófico

La abundancia de los microbiomas endófitos y endófitos-diazotrófico se evaluaron mediante qPCR utilizando los genes *16S ARNr* y *nifH*. Las curvas estándar para la amplificación del gen *16S ARNr* mostraron una correlación lineal (R^2) de 0,99 y una eficiencia de PCR del 90%. Mientras que para el gen *nifH* el R^2 fue 0,98 y la eficiencia de PCR del 110%. La abundancia del gen *16S ARNr* varió de $3,0 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^5$, mientras que para el gen *nifH* el número de copias varió de $1,9 \times 10^1$ a $1,2 \times 10^3$ (Figura 1.3). El número de copias del gen *16S ARNr* en las raíces de las plantas cultivadas en condiciones de fertilización con alto contenido de N (+N) fue significativamente mayor que en todas las demás condiciones analizadas (Figura 1.3). Por el contrario, el número de copias del gen *nifH* varió notablemente en las raíces y tallos (inferiores y superiores) de las plantas cultivadas en condiciones de fertilización con bajo contenido de N (-N), mientras que no se observaron diferencias dentro de las plantas cultivadas en condiciones de +N (Figura 1.3). De hecho, en condiciones de -N, la abundancia de los genes *nifH* fue significativamente mayor en las raíces que en los otros órganos analizados.

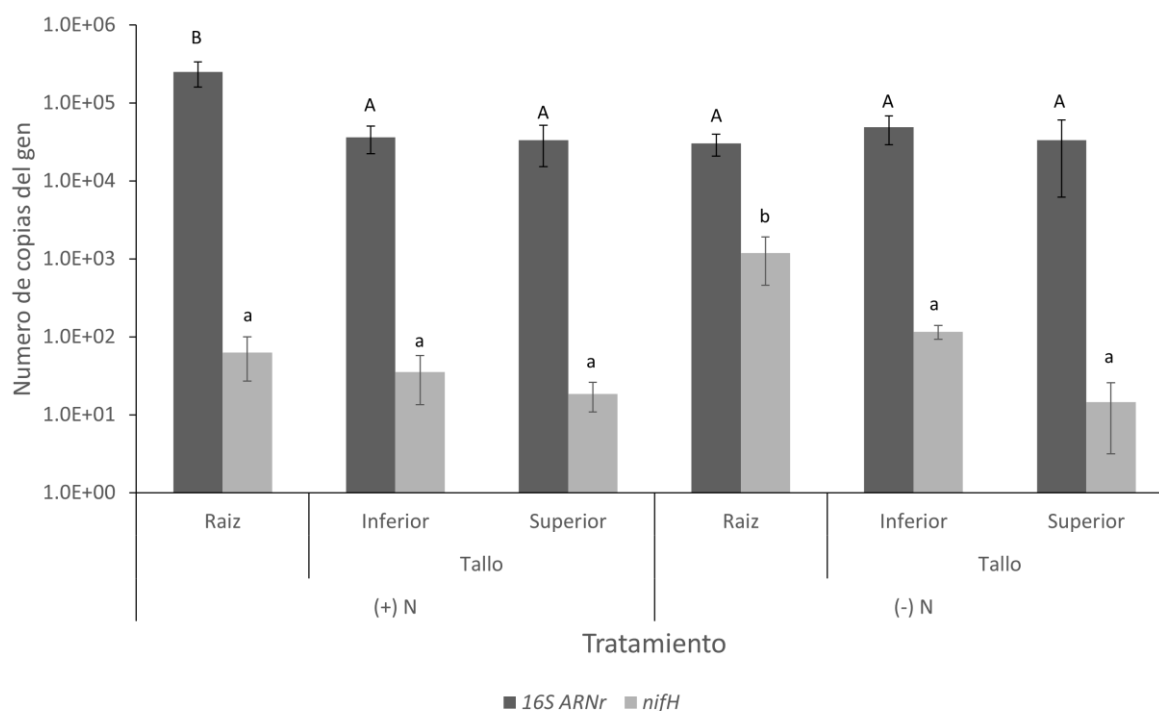


Figura 1.3: Cuantificación de copias de genes *16S ARNr* y *nifH* en muestras tomadas de diferentes órganos de plantas de sorgo dulce (cv. M81E) cultivadas en campo bajo fertilización alta (+) y baja (-) N (100 y 0 kgN/ha, respectivamente). Las medias dentro de dos tratamientos que tienen la misma letra no son significativamente diferentes por la prueba de Tukey con una $P < 0,05$.

1.8 Composición del microbioma bacteriano endofítico asociado a plantas de sorgo dulce en condiciones de campo

Después del control de calidad, el número de lecturas fueron 41736 y 44890 para las muestras de ADN de plantas cultivadas en condiciones +N y -N respectivamente. Se utilizaron curvas de rarefacción para evaluar la riqueza de OTUs. Estas mostraron que se alcanzó una asíntota para ambos tratamientos analizados, observándose un mayor número de OTUs en el tratamiento +N (Figura 1.4).

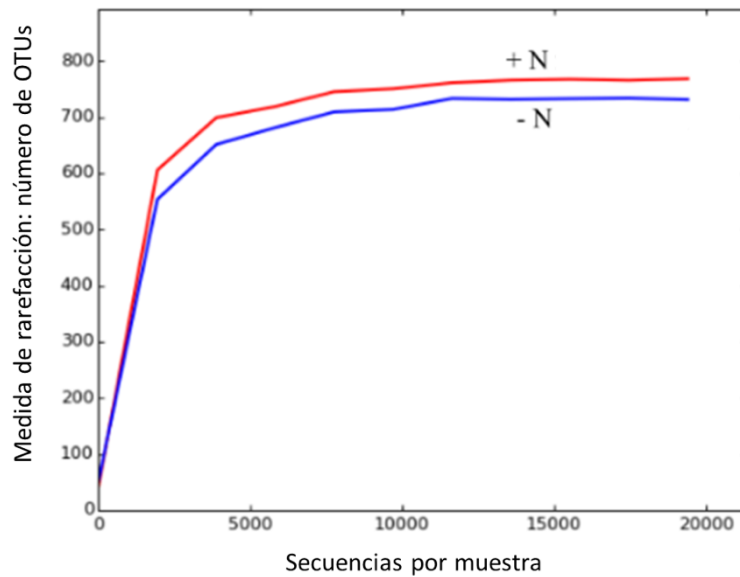


Figura 1.4: Curva de rarefacción de muestras de plantas de sorgo dulce tratadas en condiciones de alta y baja fertilización N (+N y -N respectivamente).

La abundancia relativa de los clados microbianos en dos niveles taxonómicos (filo y clase) se resume en la Figura 1.5. A nivel de filo, las OTU relacionadas con Proteobacteria y Firmicutes dominaron ambos tratamientos analizados, con abundancias relativas de 75/65% y 18/27% en cada tratamiento (+/-N), respectivamente. Además, las OTU relacionadas a Actinobacteria y Bacteroidetes representaron aproximadamente el 2% de las abundancias bacterianas relativas en ambos tratamientos.

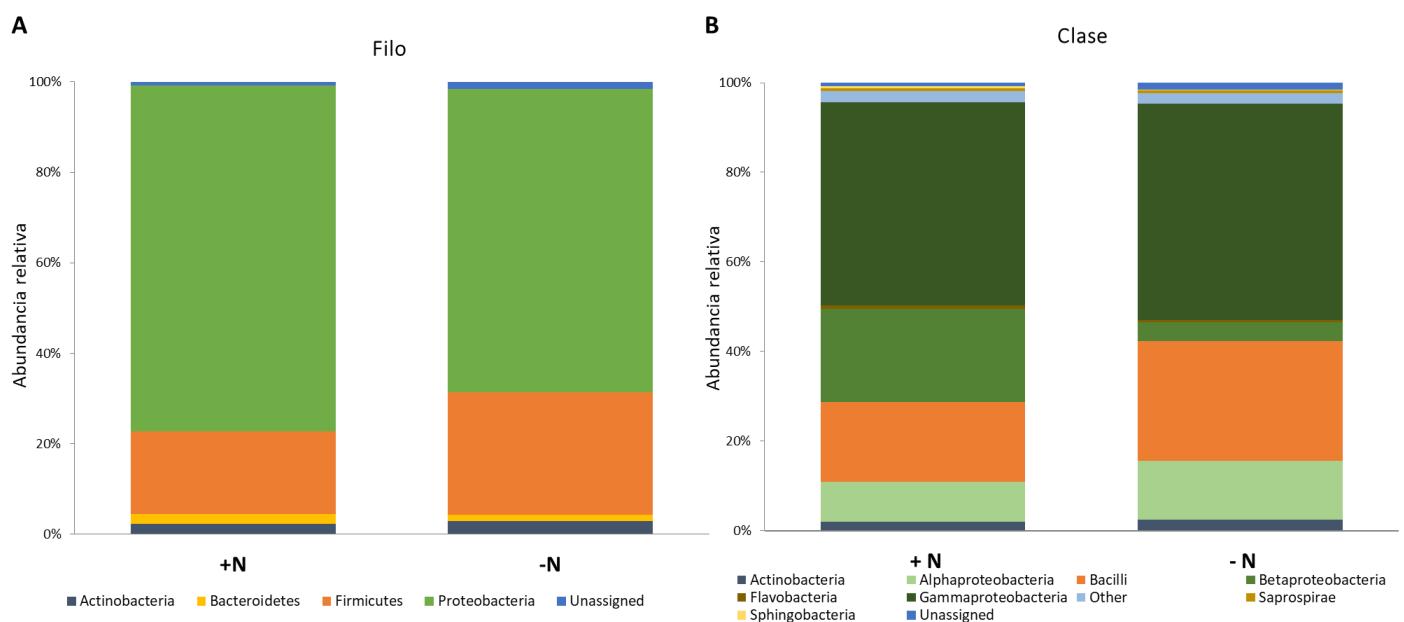


Figura 1.5: Composición taxonómica de las muestras de 16S ARNr asociadas con plantas de sorgo dulce (cv. M81E) cultivadas en el campo bajo diferentes niveles de fertilización con N (+/-N). Abundancia relativa (más del 0,5%) de las bacterias a nivel de (A) Filo y (B) Clase.

Un análisis a nivel de clase mostró que en el tratamiento +N, Gammaproteobacteria fue la clase más abundante (45%), seguida de Betaproteobacteria (21%), Bacilli (18%), Alphaproteobacteria (8,9%) y Actinobacteria (2%). La clase más abundante en el tratamiento -N también fue Gammaproteobacteria (48%), seguida de Bacilli (27%), Alphaproteobacteria (13%), Betaproteobacteria (4,2%) y Actinobacteria (2,4%) (Figura 1.5).

El análisis de las OTUs que exhibieron un *foldchange* de 10 en la abundancia entre los tratamientos, mostró que las OTUs afectadas por el tratamiento de fertilización con N eran miembros de las Beta y Gamma Proteobacteria, así como Firmicutes.

Dentro de la clase Betaproteobacteria, las OTUs asociadas al género *Herbaspirillum* aumentaron de 0,1 a 5,0% cuando se fertiliza con N. En el caso de Gammaproteobacteria, se observaron grandes cambios en las OTUs relacionadas con el género *Erwinia*, mostrando una disminución de 21,6 a 1,1%, mientras que *Pseudomonas* aumentó de 1,3 a 17,9% e del tratamiento de fertilización con N. Finalmente, dentro de Firmicutes, las OTUs relacionadas con el género *Bacillus* disminuyeron de 14,8 a 8,6% en respuesta a la fertilización con 100 kg/ha.

Discusión

1.9 Efecto de la inoculación bacteriana en plantas de sorgo dulce

Las cepas *P. dispersa* UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13 son PCV de plantas de sorgo dulce cultivar M81E en condiciones de invernáculo (116). Con la idea de corroborar sus efectos al inocularse en el cultivar M81E, así como evaluar su efecto en el cultivar híbrido ADV2010, se realizaron 2 ensayos en condiciones de invernáculo en época estival de años consecutivos. En ambos ensayos se incluyó como referencia un tratamiento con la cepa referencia *Azospirillum brasilense* Sp7 previamente descrita como PCV en plantas de sorgo dulce (129). Los resultados mostraron que en las condiciones ensayadas la cepa Sp7 mostró diferencias significativas con respecto al control negativo únicamente en el peso seco aéreo en el cultivar M81E. La mayor promoción por parte de las bacterias endófitas nativas (cepas UYSB45 y UYSB13) asociadas a plantas de sorgo dulce en relación a la cepa Sp7, también fue observado en trabajos con condiciones similares en dentro del grupo del laboratorio (116, 140). Estas diferencias en el efecto de PCV observadas entre las cepas nativas y la utilizada como referencia pueden deberse a una incompatibilidad entre los genotipos bacterianos de la planta evaluados, o porque la cepa Sp7 es poco competitiva dentro de la microbiota nativa del suelo y no logra colonizar de manera efectiva las raíces de las plantas (141).

Por otro lado, al evaluar la respuesta de la planta a la inoculación con las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *P. dispersa* UYSB45 se observó la misma tendencia PCV en ambos ensayos. Particularmente, se observó una respuesta diferencial en relación con el control negativo en la altura y pesos seco (aéreo y radicular) del cultivar ADV2010, mientras que en el cultivar M81E, del cual fueron aislados originalmente, la diferencia observada fue únicamente en peso seco aéreo. Diversos trabajos han reportado la incidencia del genotipo de la planta sobre la composición de la microbiota endofítica, así como esta interactúa con diferentes factores bióticos y abióticos. Tal es el ejemplo de plantas de arroz donde se observó que la variación en la expresión de genes tanto en la planta como en la cepa de *Azospirillum* inoculada variaba según la combinación cultivar/cepa utilizada. En dicho estudio se resaltó que los cambios transcripcionales dependientes de la combinación cepa/variedad fueron observados en genes relacionados con la señalización de auxina y etileno, resaltando la importancia de la interacción *Azospirillum*-arroz cultivar/cepa específica con la PCV (142).

Por otro lado, en el trabajo donde se analizaron los perfiles del microbioma de la rizosfera y hojas en 9 cultivares de arroz y diferentes niveles de fertilización con nitrógeno, sus resultados revelaron que el comunidades bacterianas asociadas a hojas se vieron significativamente afectadas por el genotipo de la planta. Por otro lado, las comunidades bacterianas de las raíces se vieron afectadas en gran medida por el nivel de fertilización (143). Pudiendo concluir, que el efecto del cultivar incide en la interacción con el microbioma endofítico.

Según los resultados obtenido en nuestro trabajo y lo reportado en trabajos previos donde se estudia la variación del microbioma endofítico con los distintos cultivares, podemos indicar que entre las cepas ensayadas cepas (UYSB45 y UYSB13) y los cultivares utilizados (ADV2010 y M81E) podría existir una especificidad en la interacción y como consecuencia un efecto PCV diferencial según el cultivar utilizado.

1.10 Estudio del efecto de la fertilización nitrogenada en el microbioma asociado a plantas de sorgo dulce en condiciones de campo

Con el fin mejorar la sustentabilidad de los cultivos, mediante la modulación de la microbiota endofítica asociada, es necesario comprender los efectos de las prácticas agronómicas aplicadas a los mismos. En este trabajo se utilizaron métodos independientes del cultivo para evaluar el impacto de la fertilización química nitrogenada sobre el microbioma endofítico y endofítico-diazotrófico asociado al cv. M81E comercial de sorgo dulce, cultivado en condiciones de campo. Estas metodologías son herramientas poderosas que han contribuido en gran medida a identificar la composición y diversidad microbiana en una amplia gama de ecosistemas, incluido el interior de los tejidos vegetales (144–147). Nuestros resultados demostraron que la fertilización química nitrogenada en el campo afectó significativamente la abundancia, pero no la diversidad, del microbioma bacteriano endofito asociado a cada órgano analizado (raíces y tallos)(148), al igual a lo previamente descrito en sorgo dulce (149). Mismos resultados fueron reportados también en varias gramíneas, como *Dactylis glomerata*, *Festuca rubra* y *Lolium perenne* (150, 151). Diferentes procesos selectivos actúan en conjunto durante el reclutamiento de bacterias que finalmente colonizan los tejidos internos de las plantas (152). En este sentido, la combinación de la fertilización química nitrogenada, su microbioma proveniente de la semilla, así como las características específicas de los órganos de la planta (ej., alto/bajo contenido de azúcar), se visualizan como los

principales factores que influyeron en la estructura del microbioma endofítico observado en este estudio. Adicionalmente, observamos que la abundancia bacteriana en los tallos de ambos tratamientos analizados fue estadísticamente igual y no fue influenciada por el tratamiento de fertilización nitrogenada. Teniendo en cuenta que los tejidos de la raíz son el principal punto de entrada para las bacterias del suelo, los resultados obtenidos se podrían explicar por un cambio en la composición de los exudados radiculares de la planta como consecuencia de un cambio en el estado fisiológico de la misma debido a la fertilización química aplicada. Este cambio en la composición de los exudados hace que los compuestos que actúan como señales para las bacterias cambien, favoreciendo selectivamente a aquellas que efectivamente infectan los tejidos internos de la planta (145, 153).

Por su parte, el análisis de secuenciación masiva basado en el gen *16S ARNr*, del microbioma bacteriano endofítica, mostró que la mayoría de las OTUs obtenidas en ambos tratamientos estaban relacionadas con Proteobacteria. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otro grupo, quienes observaron que Proteobacteria además de Firmicutes y Actinobacteria, eran los filos más dominantes en los dos microbiomas analizadas (raíces y tallos) de plantas de sorgo dulce (149).

Con respecto al efecto de la fertilización química sobre la composición del microbioma bacteriano, fue interesante observar que las Betaproteobacteria, así como los miembros de la clase Bacilli, tuvieron grandes cambios en el número de OTUs presentes después de la aplicación del fertilizante químico nitrogenado. Las OTUs que aumentaron en abundancia en presencia de fertilizante nitrogenado se asociaron con los géneros *Pseudomonas* y *Herbaspirillum*, mientras que las OTUs que disminuyeron se asociaron con los géneros *Bacillus* y *Erwinia*. La asociación de representantes de estos géneros con diferentes plantas (incluido el sorgo dulce) se ha descrito previamente (154). Nuestros resultados respaldan la hipótesis de que el estado fisiológico de la planta modula la composición de la microbiota bacteriana adyacente a las raíces, reclutando bacterias específicas, un fenómeno que puede desempeñar un papel clave en la promoción de la salud y el crecimiento de las plantas (145, 150, 152). Se necesitan más experimentos para determinar las funciones específicas de los géneros bacterianos identificados en el microbioma asociado a sorgo dulce.

Por otro lado, observamos que el nivel de fertilización química con N fue el principal factor que afectó la estructura del microbioma bacteriano endofítico-diazotrófico, pero no afectó significativamente su diversidad. Además, las abundancias del gen *nifH* en los tejidos internos

de ambos tratamientos analizados no fueron significativamente diferentes, excepto para las raíces de las plantas cultivadas sin fertilización nitrogenada. En este último caso, la abundancia del microbioma bacteriano diazotrófico-endofítico fue mayor y menos diversa que en las raíces de plantas cultivadas sin fertilización nitrogenada. Estos resultados también respaldan la hipótesis de que, bajo ciertas condiciones, se recluta un microbioma endofítico específica de un grupo de bacterias oportunistas presentes en el suelo y que las más competitivas pueden infectar y sobrevivir dentro del entorno del tejido vegetal (149, 152, 155). En este estudio, la ausencia de fertilización con N puede haber llevado a las plantas a reclutar bacterias diazotróficas, lo que puede contribuir a la promoción del crecimiento de las plantas a través del proceso de fijación biológica de Nitrógeno (FBN). Esto está respaldado por la observación de que se ha detectado FBN en las raíces de las plantas de sorgo dulce, sin embargo, cabe señalar que debido a que el presente estudio se basó en la extracción de ADN, no podemos suponer que los genes *nifH* estuvieran realmente activos.(156). Además, nuestros resultados son consistentes con trabajos previos en los que se estudió la abundancia del gen *nifH* en sorgo dulce, maíz y arroz tratados con diferentes niveles de fertilizante nitrogenado (157–159). Por otro lado, cabe destacar que nuestros resultados se alinean con previamente obtenidos donde se evaluó la interacción de la inoculación con endófitos diazótrofos a plantas de sorgo dulce, en combinación con distintas concentraciones de fertilización nitrogenada en distintos cultivares (140). En ese trabajo se observó que el efecto PCV varió según el cultivar y la fertilización utilizada (140).

Conclusiones

Las bacterias nativas PCV son un recurso natural y una alternativa al uso de la fertilización química en cultivos de importancia agronómica como lo es el sorgo dulce para nuestro país. Dada su capacidad PCV demostrada en el cultivar del cual fueron aislados (M81E), así como en el cultivar comercial plantado en mayor proporción (ADV2010), demuestran un gran potencial como biofertilizantes. Esto aportaría a la preservación, sustentabilidad así como a la disminución de los impactos adversos en el ambiente debido a las prácticas agronómicas basadas en agroquímicos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que la aplicación de fertilizante nitrogenado afecta la abundancia y composición del microbioma bacteriano endofítico asociados a las plantas de sorgo dulce. Este efecto fue pronunciado en las raíces de ambos microbiomas analizados (endofítico total y diazótrofo); postulándose que este efecto depende del estado fisiológico de las plantas. Los datos obtenidos en este estudio contribuyen a una mejor comprensión de los efectos de diferentes prácticas agronómicas sobre la microbiota asociada a este importante cultivo, lo que puede ayudar a mejorar su sustentabilidad.

CAPÍTULO II: Identificación y caracterización de probables mecanismos involucrados en la interacción entre las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13 y plantas de sorgo dulce

Objetivo:

Identificar y caracterizar en la cepas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13 potenciales mecanismos relacionados a la interacción con plantas de sorgo dulce, focalizándose en aquellos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal.

Estrategia

Trabajos previos demostraron que en condiciones *in vitro* las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13 presentan diferentes características relacionadas a la PCV y tienen efecto PCV en plantas de sorgo dulce en condiciones *in vitro* (116). En este capítulo se complementó la caracterización previa con la determinación *in vitro* de posibles mecanismos involucrados en la interacción planta-bacteria (IPB) y la PCV.

Asimismo, se secuenció y analizó el genoma de la cepa UYSB45 poniéndose énfasis en el estudio de genes potencialmente implicados en la IPB y la PCV de plantas. Por último, se construyeron y caracterizaron mutantes en genes de interés en la cepa UYSB45.

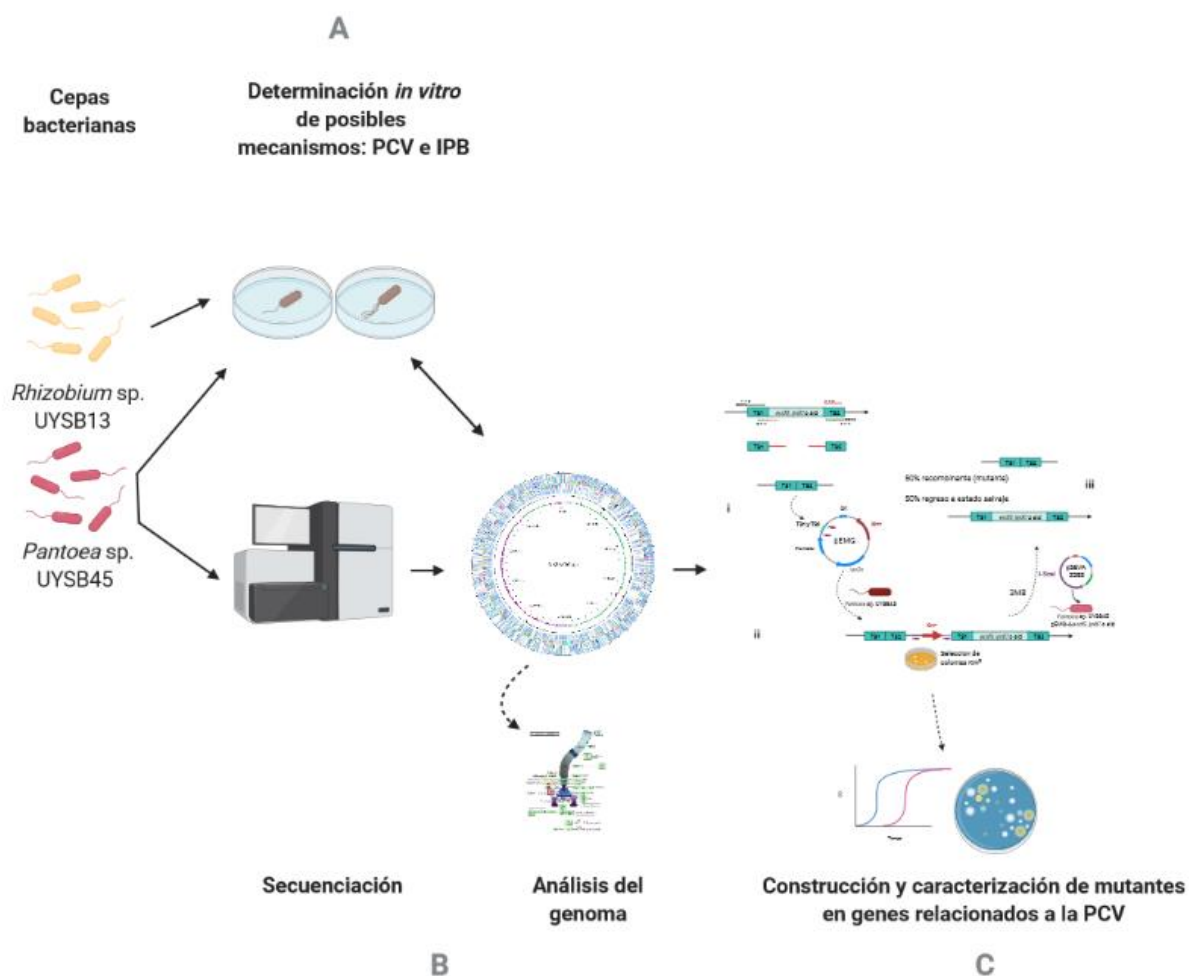


Figura 2.1: Esquema de la estrategia utilizada en el capítulo II. (A) se determinó *in vitro* posibles mecanismos involucrados en la PCV y en la IPB. (B) El genoma de la cepa UYSB45 se secuenció y analizó poniéndose énfasis en el estudio de genes potencialmente implicados con la PCV de plantas. (C) se construyeron y caracterizaron mutantes en genes de interés en la cepa UYSB45. Creado con BioRender.com.

Materiales y Métodos

2.1. Cepas bacterianas y plásmidos empleados

Las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 utilizadas en este trabajo forman parte de una colección de bacterias asociadas a plantas del cultivar de sorgo dulce cv. M81E (116). Las mismas fueron seleccionadas dadas sus características PCV identificadas *in vitro* así como su capacidad *in vivo* de promover el crecimiento de plantas de sorgo dulce. Entre las características *in vitro* identificadas se encuentra la producción de sideróforos, la actividad ACC-desaminasa así como la capacidad de producir la fitohormona ácido indolacético (AIA) (Tabla 1.1) (116).

Por otra parte los plásmidos empleados y sus cepas bacterianas hospederas empleadas en este capítulo se listan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Cepas y plásmidos utilizados para la generación de mutante en este capítulo

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5αλpir	λpir lysogenica de DH5α	(160)
DH5αλpir pSEVA328S	λpir lysogenica de DH5α. Cm ₂₅	
pRK600	Cepa <i>helper</i> . Cm ₂₅	(161)
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	Cepa a transformar. Str ₁₀₀ , Spc ₁₀₀ , Gm ₁₀₀ , Nm ₁₀₀ , Amp ₁₀₀ , Nf ₁₀₀	Este trabajo
Plásmidos		
pEMG	Plásmido suicida (transferible pero no replicable). Km ₅₀ , <i>lacZα</i> con sitios flanqueantes para <i>I-SceI</i> . Necesita la proteína pi para replicarse.	(160)
pSEVA328S	<i>I-SceI</i> inducible bajo presencia de 3-metil benzoato (3MB). Cm ₂₅	(162)

2.2 Determinación *in vitro* de la presencia de posibles mecanismos vinculados a la interacción planta-bacteria en las cepas bacterianas en estudio.

2.2.1 Evaluación de la presencia de enzimas potencialmente degradadoras de la pared celular vegetal y de la producción de polihidroxubutirato (PHB)

Se evaluó la presencia de la actividad lacasa así como la capacidad de producir y acumular PHB en las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13 según los protocolos previamente puestos a punto en el laboratorio (163).

En la evaluación de la actividad lacasa, las cepas se inocularon en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY, suplementado con Azul brillante de Remazol (ABR) 0,04 % (p/v) o con guaiacol 0,01 % (p/v). Las colonias se consideraron positivas cuando a los 5 días post inoculación cambiaron su color a azul o marrón-rojizo, dependiendo del sustrato utilizado: ABR o guaiacol respectivamente (163).

La producción y acumulación de PHB se evaluó en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con glucosa en exceso (30 g/l) y NH₄Cl 40 mM. Las placas inoculadas, fueron cubiertas con una solución de Rojo Nilo 0,01 % (p/v) en acetona, incubándose por 48 horas a 30 °C. Una vez evaporada la acetona, las placas se observaron bajo luz UV. Las colonias que presentaron fluorescencia fueron consideradas como positivas para la acumulación de lípidos y posible acumulación del polímero PHB (163).

En todos los ensayos se utilizó la cepa *H. seropedicae* SmR1 como control positivo. Para el ensayo de acumulación de PHB se utilizó como control negativo la bacteria *Escherichia coli* (164). Cada determinación se realizó por triplicado.

2.2.2 Determinación de la movilidad bacteriana

Se determinó la capacidad de realizar *swimming*, *swarming* y *twitching* por las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45.

Por un lado, se evaluó la capacidad de dichas cepas de realizar los movimientos *swimming* y *twitching*, para esto en primera instancia se crecieron ambas cepas en tubos conteniendo medio de cultivo líquido rico TY (165) durante toda la noche. Ese cultivo se inoculó punzando con escarbadiantes en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY con agar 0,3% (p/v) para evaluar el movimiento *swimming* y la capacidad de *twitching* se evaluó con la misma

metodología antes descrita pero utilizando placas conteniendo medio de cultivo TY con agar 1% (p/v).

Por otro lado, el movimiento tipo *swarming* fue evaluado en placas conteniendo medio de cultivo TY suplementado con glucosa 0,5 % (p/v) y agar 0,5 % (p/v) también utilizando escarbadientes para punzar el agar del medio de cultivo (166).

En los 3 casos se midió las actividades 24 horas post inoculación (h.p.i) y como control positivo se utilizó la cepa UYSO10 (163).

2.3 Secuenciación, ensamblado y anotación del genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Dadas las características PCV identificadas *in vitro* (Tabla 1.1) de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45, así como su capacidad PCV identificadas *in vivo* en ensayos de invernáculo (116), se decidió profundizar en el análisis en la cepa UYSB45, de los probables mecanismos de promoción del crecimiento vegetal e interacción con la planta. Para esto se escogió una estrategia genómica en la cual se secuenció y anotó el genoma de la cepa UYSB45.

2.3.1 Secuenciación, control de calidad y ensamblado

Con el fin de obtener el ADN genómico, la cepa UYSB45 se creció en tubos conteniendo medio de cultivo líquido rico TSB, hasta alcanzar una densidad óptica a 620nm de 1,0 ($D.O._{620} = 1,0$). Los tubos fueron centrifugados a 10000 g durante 5 min, y los pellets re-suspendidos en un 1ml de NaCl 0.9 % (p/v). Esta suspensión, fue la utilizada para la extracción de ADN genómico bacteriano utilizando el kit Quick-DNA™-Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El control de la calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0% (p/v) utilizando buffer Tris-Acético-EDTA (TAE), visualizándose al exponer el gel a la luz U.V. El agente intercalante utilizado fue el GoodView (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.) en una relación de 1µl/50ml (colorante:agarosa). La cuantificación de ADN se obtuvo mediante la medición en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™1000.

La secuenciación del genoma de *Pantoea* sp. UYSB45 se realizó a través del servicio de secuenciación de Macrogen Inc. Corea, utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000 (Illumina, Inc). La calidad de las lecturas fue evaluada con el programa FastQC (167) y las lecturas de baja calidad o longitud incorrecta fueron eliminadas con el programa Trimmomatic 0.36 (168).

Luego, se realizó el ensamblado *de novo* con el programa SPAdes v3.11.1 (169) y la calidad del mismo fue evaluada con el programa QUAST 4.5 (170). Los *contigs* resultantes del ensamblado se ordenaron y orientaron (*scaffolding*) utilizando los programas Mauve (171) y Medusa (172) independientemente. En todos los programas y herramientas se utilizaron los parámetros por defecto para su ejecución.

2.3.2 Anotación del genoma

Una vez obtenido el genoma ensamblado, se anotó utilizando el servicio web RAST (Rapid Annotations Using Subsystems Technology) (173). Este servicio, provee anotaciones de genes individuales y de subsistemas a partir de los datos de secuenciación. Un subsistema es un conjunto de roles funcionales que fueron agrupados por un anotador experto y es utilizado por el servicio de anotación RAST, el cual en base a esta información construye una red metabólica (173). Se utilizó el subsistema SEED para categorizar la información, determinando el número de secuencias codificantes que pertenecen a los distintos subsistemas funcionales presentes en el RAST. También se utilizó el servicio web KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) para complementar la anotación del genoma (174). Utilizando el programa BLASTn (NCBI, National Center for Biotechnology Information), se buscó por homología de secuencia los genes claves que codifican para otras actividades de interés que no fueron anotadas por el servicio RAST o KAAS.

Para el análisis de la resistencia a los antibióticos *in silico*, se utilizó el servicio web CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (175). Esta es una base de datos curada que proporciona secuencias de ADN y proteínas de referencia, modelos de detección y herramientas bioinformáticas sobre la base molecular de la resistencia a los antimicrobianos bacterianos (AMR). En nuestro caso se utilizó el RGI (Resistance Gene Identifier), este identificador se utiliza para predecir resistomas a partir de datos de proteínas o nucleótidos basados en modelos de homología y SNPs (single nucleotide polymorphisms). El RGI admite dos tipos de modelos de detección (homólogo de proteína y variante de proteína) y analiza secuencias bajo tres paradigmas: *Perfect*, *Strict*, y *Loose*. El algoritmo *Strict* detecta variantes previamente desconocidas de genes conocidos de AMR, utilizando modelos de detección que garantice que dicha variante detectada sea probablemente un gen de AMR funcional.

2.3.3 Clasificación taxonómica

Para la identificación taxonómica, se utilizó la herramienta ANI (Average Nucleotide Identity) que consiste en el alineamiento de las secuencias genómicas de las cepas a comparar y la contabilización del porcentaje de bases que coinciden (176, 177). Dicha herramienta ha sido propuesta como alternativa a la hibridación ADN-ADN, ya que los costos de secuenciación se han reducido en comparación, disponiéndose de una gran cantidad de datos para el estudio taxonómico. También se utilizó el índice TETRA que está basado en la frecuencia de tetra-nucleótidos presentes en una secuencia genómica (178). Este índice se obtiene para una secuencia genómica dada y es comparado contra el índice obtenido para otro genoma. Para el cálculo del índice ANI y la comparación del índice TETRA se utilizó el servicio web JSpeciesWS (179). Se seleccionaron secuencias con una TETRA-Score mayor a 0.95 en este estudio (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Lista de los códigos de acceso de los genomas utilizados para los estudios de clasificación taxonómica

Organismo	Z-Score	Numero de acceso
<i>Pantoea dispersa</i> CCUG 25232T	0.99977	GCA_008692915.1
<i>Pantoea dispersa</i> SA5	0.9997	GCA_001476765.1
<i>Pantoea dispersa</i> EGD-AAK13	0.99969	GCA_000465555.2
<i>Plautia stali</i> symbiont	0.99398	GCA_000180175.2
<i>Pantoea</i> sp. RIT-PI-b	0.96731	GCA_001187905.1
<i>Pantoea</i> sp. GM01	0.96656	GCA_000282675.1
<i>Pantoea endophytica</i> 596 (T)	0.96646	GCA_002858935.1
<i>Pantoea</i> sp. YR343	0.95975	GCA_000282695.1
<i>Pantoea wallisii</i> LMG 26277 (T)	0.95292	GCA_002095485.1

También se realizó la reconstrucción filogenética del género *Pantoea* con el programa PhyloPhlAn (180). El programa PhyloPhlAn fue ejecutado en modalidad *de novo* la cual reconstruye la filogenia en base a un acervo de 400 proteínas dentro de los 102 genomas referencia para este género (Anexo II, Tabla A1). Para la anotación y edición del árbol filogenético, se utilizó la herramienta en línea iTOL (*Interactive Tree Of Life*) (181) que entre otras cosas permite la utilización de etiquetas asociadas. Para lograr una clasificación respecto a la fuente de aislamiento, se realizó una tabla con metadatos para distinguir aquellas cepas que han sido depositadas en la base de datos NCBI con las siguientes palabras en el bioproyecto asociado a la secuenciación del genoma o en los trabajos publicados: asociado a

planta **(AP)**, Endófito **(E)**, Patógeno **(P)**, Clínico **(C)**, Suelo **(S)**, Simbionte de animal **(SA)** y Acuático **(A)**(Anexo II, Tabla A1).

Por último se determinó la estructura del genoma de la cepa UYSB45, lo que permite determinar el número de replicones así como la distribución de genes en dicho genoma. Los contigs ensamblados fueron procesados con el programa Medusa 1.6 (172) empleando los parámetros por defecto, obteniendo un conjunto de scaffolds a partir de la combinación de estos. Los genes fueron clasificados en sus correspondientes categorías COG (Clusters of Orthologous Groups) (182) utilizando el programa RPS-BLAST v.2.7.1 con las matrices de puntuación específicas de posición obtenidas de las categorías COG. Para confeccionar un mapa circular del replicón de la cepa UYSB45 se utilizó la aplicación web GView Server (<https://server.gview.ca>).

2.3.4 Búsqueda de genes probablemente involucrados en la promoción del crecimiento vegetal

Una vez que se contó con el genoma anotado, se realizó la búsqueda de genes relacionados con los mecanismos PCV y PMI descritos en la literatura (14), los cuales fueron correlacionados con los resultados de los ensayos *in vitro* previamente obtenidos (116).

En este sentido se buscaron en el genoma genes, operones y regulones codificantes para la producción de sideróforos y fitohormonas, la FBN así como los involucrados en la motilidad, quimiotaxis, la formación de pillus y los sistemas de secreción.

Para esto fue necesario también la búsqueda manual con el programa BLASTn de algunos de los genes relacionados a las características antes mencionadas ya que los mismos no fueron anotados por servicio web RAST. El análisis se complementó con la anotación mediante el servicio KAAS (KEGG Automatic Annotation Server). Este servicio proporciona anotaciones funcionales de genes mediante comparaciones BLAST (búsqueda de nucleótidos) o GHOST (búsqueda de AA) contra la base de datos curada Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). El resultado contiene asignaciones de KO (KEGG Orthology) y vías metabólicas KEGG generadas automáticamente.

2.4 Construcción de mutantes.

2.4.1 Cepas bacterianas y plásmidos empleados

En la tabla 2.1 se listan las cepas y los plásmidos utilizados en este capítulo. Las cepa UYSB45, las diferentes mutantes obtenidas, así como la cepa *E. coli* DH5 α pir fueron cultivadas en medio de cultivo LB (183)(Anexo I) en presencia de los antibióticos correspondientes toda la noche, a 30°C y 37 °C respectivamente.

La cepa *Pantoea* sp. UYSB45 tiene efectos PCV al ser inoculada en el cultivar M81E y ADV2010 de sorgo dulce en condiciones de invernáculo. Presenta actividad ACC desaminasa así como la capacidad de producir la fitohormona AIA y sideróforos (116). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en una primera instancia se construyeron mutantes en los genes codificantes para las enzimas ACC desaminasa (UYSB45.1834), indol-piruvato descarboxilasa (UYSB45.2258) y el componente F de la enterobactina sintetasa (UYSB45.3128), nombradas *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta acdS$, $\Delta ipdC$ y $\Delta entF$ respectivamente.

Para ello, se utilizó el sistema reportado por Martínez-García y colaboradores basado en la actividad de la meganucleasa I-SceI (184), el cual fue implementado con éxito en nuestro laboratorio (163, 185). Brevemente, el método consiste en eliminar íntegramente el marco de lectura abierto correspondiente al gen de interés, mediante recombinación homóloga, digestión con la nucleasa y reparación del ADN, sin dejar secuencias foráneas o marcas en el ADN (Figura 2.2).

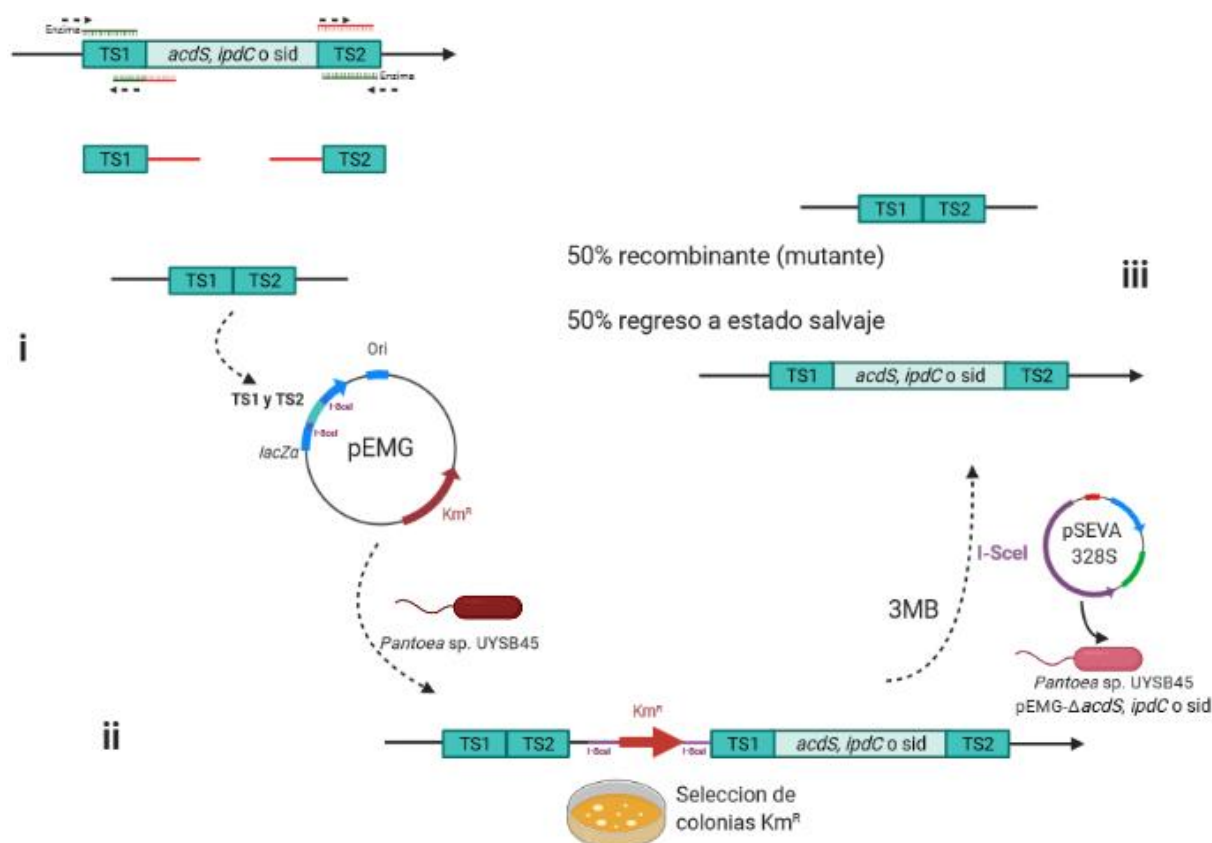


Figura 2.2: Esquema resumido de la metodología utilizada para la obtención de las cepas mutantes en los distintos genes. El procedimiento consta de los siguientes pasos: i-clonar la región de interés en el plásmido suicida (pEMG), ii- cointegrar en el genoma de la cepa a mutar y iii- transformar la construcción anterior con el plásmido pSEVA328S e inducir la nucleasa I-SceI presente en pSEVA328S con 3MB (3-metilbenzoato). Creado con BioRender.com.

Para esto las bacterias fueron crecidas en medio de cultivo líquido LB e incubadas a 37°C la cepa *E. coli*, mientras que la cepa UYSB45 a 30°C. En todos los casos, la reacción de PCR de colonia se realizó usando una colonia única, como ADN molde, obtenida de una placa fresca y transferida directamente al tubo de reacción de PCR (160).

2.4.2 Diseño de cebadores para la construcción de las mutantes.

El primer paso en la estrategia realizada consiste en la clonación del gen a eliminar incluyendo 500 pb adyacentes a ambos lados del gen que se va a mutar para luego insertarlo en el plásmido suicida pEMG. Para el diseño de los cebadores específicos se utilizó el programa A plasmid Editor (ApE, <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) empelando como molde el genoma de la cepa UYSB45 (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Cebadores diseñado y utilizados para la generación de las mutantes en los genes *acdS*, *ipdC* y *entF*

Objetivo	Nombre Cebador	Secuencia aminoacídica (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Tamaño del gen (pb)	Enzimas de restricción	Referencia
<i>acdS</i>	acdSTS1for	cGAATTCcgtatggcgttagtgttccg	539	987	EcoRI	Este trabajo
	acdSTS1rev(C)	aaccttttttgctgctgtctgcagcctccattcggg				
	acdSTS2for	gacagcagcaaaaaaagggtt	467			
	acdSTS2rev	cgGGATCCttgatcaccacgtcgatacg			BamHI	
<i>ipdC</i>	ipdCTS1for	cGAATTCaggctttgatcgaggcttgaa	584	1662	EcoRI	
	ipdCTS1rev(C)	ccaactgtacagaggcaactgtccgaccgctcctgtgaggg				
	ipdCTS2for	gacagttgcctctgtacagttgg	561			
	ipdCTS2rev	cgGGATCCccggcaccgtagatggc			BamHI	
<i>entF</i>	sidTS1for	cGAATTCccactgcagcagctgacc	592	3897	EcoRI	
	sidTS1rev(C)	gagggtgagggcaaaaccgcagagaatttactgtcgctccgg				
	sidTS2for	cggttttgccctcacctc	423			
	sidTS2rev	cgTCTAGAgtgtggatcgccatggtact			XbaI	
pSEVA 328S	pS3	gaacgctcggttgccgc	1300			(162)
	pS4	ccagcctcgagagcagg				
pEMG	M13f	gttttccagtcacgac	123			(160)
	M13r	caggaaacagctatgac				

(C) Hace referencia a la secuencia complementaria del cebador *forward*

2.4.3 Construcción de los plásmidos pEMG- $\Delta acdS$, pEMG- $\Delta ipdC$ y pEMG- $\Delta entF$.

El vector pEMG está diseñado para insertar segmentos de ADN dentro del genoma de la cepa blanco, y también es utilizado para generar deleciones dirigidas en regiones cromosomales específicas (Figura 2.2). Este vector utiliza un origen de replicación ori6K por lo que solo puede replicarse en cepas que tengan el gen *pir* del fago lambda (Figura 2.3). Por otro lado, el vector tiene un origen de transferencia (OriT). En consecuencia, este vector es transferible pero no es replicable en *Pantoea*. Sin embargo, el vector puede integrarse en el genoma de la cepa al que fue transferido mediante recombinación homóloga si se clona en él una región de ADN homóloga. Este evento de recombinación simple se puede seleccionar utilizando antibióticos adecuados. A su vez, el plásmido porta secuencias de reconocimiento para la nucleasa I-SceI. Esta endonucleasa en particular proviene de *Saccharomyces cerevisiae*, solo puede escindir en un sitio específico de 18 pb que no se encuentra en ninguno de los genomas bacterianos secuenciados hasta el momento (160).

Una vez diseñados los cebadores, el siguiente paso fue la construcción de los plásmidos pEMG- $\Delta acdS$, pEMG- $\Delta ipdC$ y pEMG- $\Delta entF$. Para esto, se realizó el empalme de los genes por extensión de superposición o *gen SOEing* (por sus siglas en inglés: Gene Splicing by Overlap Extension) (186). Este método está basado en la reacción de PCR para recombinar secuencias de ADN sin depender de sitios de restricción y generar fragmentos de ADN mutados *in vitro*. Para generar los plásmidos recombinantes, en cada caso se amplificaron por separado 500 pares de bases (pb) corriente arriba y corriente abajo de cada una de las secuencias de interés (TS1 y TS2, Figura 2.2). Luego, ambos segmentos de ADN obtenidos fueron unidos en un único segmento de ADN mediante SOEing PCR.

En todos los casos las condiciones de PCR fueron las mismas tal como se describe a continuación. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: 12,5 μ l de Dream Taq Green Master Mix de Thermo Scientific, 1 μ M de cada cebador, como ADN molde se picó una colonia y H₂O c.s.p. 25 μ l. Como control positivo se utilizó la cepa parental *Pantoea* sp. UYSB45 y como control negativo se utilizó la mezcla sin el agregado de ADN.

Se utilizó la misma temperatura de hibridación para todos los cebadores, ya que fue la óptima en todos los casos. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo

de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 59°C y 30 seg a 72°C. Por último, un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C

El tamaño correcto de los amplicones fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) siguiendo el protocolo utilizado en la sección 2.3.1. En todos los casos se espera un producto de 1000 pb. Las bandas del tamaño deseado se purificaron con el kit Monarch® PCR & DNA Cleanup (NEB), digeridas con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso (tabla 2.3) y por último ligados en el vector pEMG. De esta manera la secuencia TS1-TS2 queda flanqueada por secuencias de reconocimiento de la enzima nucleasa I-SceI (Figura 2.2 y 2.3).

Previo a la construcción del co-integrado y mediante electrotransformación se transformó la cepa bacteriana *Pantoea* sp. UYSB45 con el plásmido pSEVA328S que expresa la nucleasa I-SceI (Tabla 1.2, Figura 2.3).

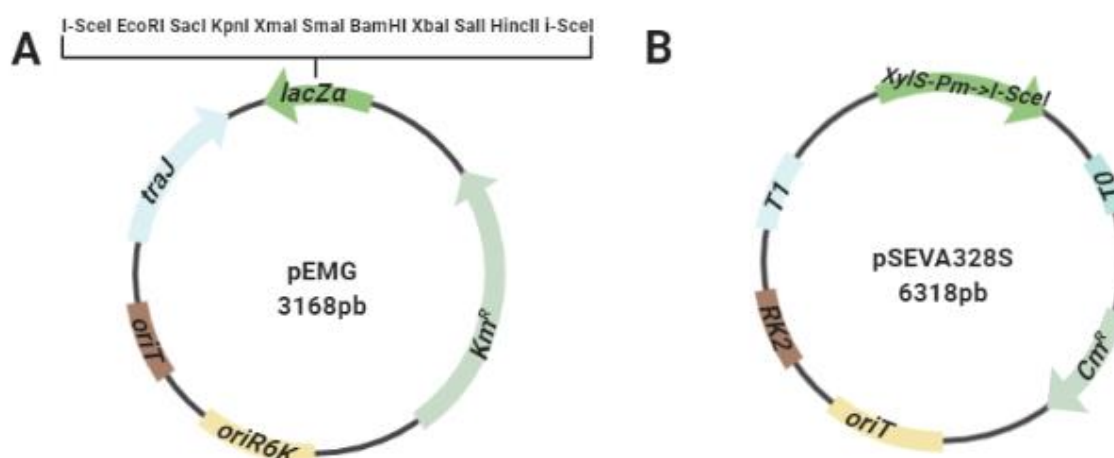


Figura 2.3: Organización de los vectores utilizados en la edición del genoma. (A) pEMG. Este plásmido está diseñado para el intercambio de segmentos de ADN del genoma blanco mediante secuencias homólogas correspondientes insertadas en el sitio múltiple de clonado (SMC) del vector flanqueado por sitios I-SceI diseñados dentro del segmento lacZα; funciones para la movilización conjugativa (traJ, oriT); un origen de replicación R6K dependiente de la proteína π proporcionada in trans por cepas λ pir lisogénicas y un marcador de selección KmR. (B) pSEVA328S. Esta construcción de amplio rango de hospederos expresa la nucleasa I-SceI tras la activación del promotor Pm por XylS en presencia de 3-metilbenzoato (3MB); un terminador transcripcional (T0) está ubicado corriente abajo del gen I-SceI; el origen de replicación promiscuo oriRK2; el oriT para la movilización con una cepa helper y un marcador de selección CmR. Adaptado de (160). Creado con BioRender.com.

2.4.4 Construcción del cointegrado *Pantoea* sp. UYSB45 pEMG- Δ acdS/ipdC/entF

Aquellos clones candidatos fueron confirmados a través de la secuenciación del fragmento entero TS1-TS2 en los plásmidos correspondientes. Los que presentaron la secuencia

esperada se transformaron en *E. coli* DH5 α pir para su conservación y multiplicación ya que el plásmido pEMG no es replicable en *Pantoea* sp. UYSB45.

Luego, los plásmidos pEMG- Δ *acdS*/*ipdC*/*entF* presentes en la cepa *E. coli* DH5 α pir fueron transformados mediante conjugación triparental junto a la cepa *E. coli* pRK600 (183) en la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 pSEVA328S para su integración al genoma de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45.

2.4.4.1 Verificación de la cointegración al genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Con el fin de verificar que se haya realizado la cointegración al genoma por recombinación homóloga simple, se evaluó la capacidad de crecimiento de las colonias obtenidas en la sección 2.4.4 en placas conteniendo medio de cultivo LB con antibiótico Km 50 μ g/ μ l. Aquellas colonias capaces de crecer en dichas condiciones, se verificó la cointegración mediante reacción de PCR empleando los cebadores TS1f y TS2r específicos según el gen a mutar que corresponda (*acdS*, *ipdC* o *entF*) (Tabla 2.3). Las condiciones de la mezcla de reacción, el ciclado, así como las condiciones empleadas para la visualización del amplicón, se realizaron siguiendo el protocolo utilizado en la Sección 2.4.3.

Los tamaños de los amplicones esperados de los productos de PCR para las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *acdS*, *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *ipdC* y *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *entF*, así como de la verificación de la presencia del plásmido pSEVA en la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 pSEVA328S se listan en la tabla 2.3.

2.4.5 Inducción del pSEVA328S y selección de cepas de *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *acdS*, *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *ipdC* y *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *entF*

Una vez obtenidas las cepas con el plásmido integrado en el genoma, es necesario la inducción de la enzima nucleasa con el inductor 3MB para generar la delección de dicho gen o la reversión al estado salvaje (Figura 2.2).

El plásmido pSEVA328S expresa la nucleasa IScel inducible con 3MB, la cual reconoce y corta la secuencia blanco que se encuentran en la construcción pEMG- Δ *acdS*/*ipdC*/*entF*. Para lograr una óptima función de esta enzima, se evaluó la inducción con una única concentración de 15mM del inductor 3MB y utilizando inóculos con 2 procedencias distintas. Por un lado, se evaluó el inóculo proveniente de una placa de cultivo y por otro de un cultivo líquido.

En ambos casos, cultivos crecidos de forma independiente de las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta acdS$, *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta ipdC$ y *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$ en medio líquido o proveniente de placa de cultivo fueron repicados a medio de cultivo fresco hasta alcanzar una D.O.₆₂₀ de 0,3-0,4, momento en el cual se les agregó el inductor 3MB en una concentración de 15mM, incubándose con agitación toda la noche a 30°C. Luego, se realizaron diluciones seriadas de este último cultivo (10^{-4} a 10^{-6}) en placas conteniendo medio de cultivo LB con el fin de obtener entre 100 y 1000 ufc. En cada caso, las colonias obtenidas fueron picadas a nuevas placas conteniendo medios de cultivo suplementados con los antibióticos correspondientes LBamp₁₀₀ y LBamp₁₀₀Km₅₀, seleccionándose aquellas colonias que perdieron la capacidad de resistencia al antibiótico Km₅₀.

En el caso de las cepas con las construcciones pEMG- $\Delta acdS$ y pEMG- $\Delta ipdC$, la inducción se hizo también con el agregado de triptófano y tiamina (TA) al medio de cultivo en forma independiente, así como combinando ambas en concentraciones finales de 100 µg/ml y 55 ng/ml respectivamente. El aminoácido Trp y la TA están estrechamente relacionados a las vías de la producción de auxinas (187, 188).

2.4.5.1 Verificación de las construcciones *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta acdS$, *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta ipdC$ y *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$

La exitosa eliminación del gen diana, fue confirmada mediante una reacción de PCR utilizando las colonias obtenidas en la sección anterior como molde de ADN. Se utilizaron los cebadores TS1f y TS2r correspondientes según el gen a mutar (*acdS*, *ipdC* o *entF*) (tabla 2.3).

Las condiciones de la mezcla de reacción y condiciones de ciclado de PCR, así como la visualización del amplicón fueron las mismas que los descriptos en la Sección 2.4.3. Los productos esperados para cada gen se muestran en la tabla 2.4.

2.4.6 Eliminación del plásmido pSEVA328S

Para eliminar el plásmido pSEVA328S de las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta acdS/ipdC/entF$ pSEVA328S, se realizaron 3 repiques sucesivos en medio de cultivo líquido LBamp₁₀₀, dejando crecer cada repique en agitación durante 24 h a 30 °C. Al cabo de este tiempo, se seleccionaron colonias sensibles a Cm₅₀ y a través de PCR se verificó la pérdida del plásmido como fue descripto en la sección 2.4.4.1

2.4.7 Caracterización de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 Δ entF

Para confirmar que la mutación haya logrado el cambio en el fenotipo buscado, en este caso la producción de sideróforos, se realizaron ensayos *in vitro*.

En primera instancia se realizaron curvas de crecimiento de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 Δ entF en medio de cultivo rico y medio de cultivo definido. Posteriormente se evaluó el crecimiento en medio CAS y se realizó el Ensayo de Arnow para la detección de sideróforos del tipo catecol.

2.4.7.1 Evaluación del crecimiento de las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 Δ entF y *Pantoea* sp. UYSB45

El crecimiento de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 Δ entF, se evaluó en medio de cultivo TSB, medio de cultivo definido LGI y en medio de cultivo LGI sin el agregado de hierro (LGI-Fe). El crecimiento se hizo en placas de microtitulación de 96 pocillos en el espectrofotómetro de placa Varioskan Flash (Thermo Scientific). Para esto, se inocularon 1×10^6 células de cada una de las cepas en 200 μ l de los distintos medios a ser ensayados, incubándose la placa con agitación a 180 rpm durante 30s cada 19,5 min a 30°C. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la D.O.₆₂₀ cada 2 h durante 50 h. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado.

2.4.7.2 Detección de sideróforos *in vitro*

Se evaluó la capacidad de producir sideróforos por las cepas, *Pantoea* sp. UYSB45, *Pantoea* sp. UYSB45:pEMG Δ entF y *Pantoea* sp. UYSB45 Δ entF, mediante el ensayo de Cromo Azurol S. (CAS)(189). Para esto, las cepas a evaluar se incubaron a 30°C durante 5 días en placas de Petri conteniendo medio de cultivo CAS. Aquellos aislamientos que presentaron un halo amarillo alrededor de la colonia fueron considerados productores de sideróforos.

Asimismo se realizó la evaluación de la producción de sideróforos del tipo catecoles mediante el ensayo de Arnow. El mismo se basa en el principio de que el catecol (grupo que une el Fe^{+3} usando grupos hidroxilo adyacentes), al ser combinado con ácido nítrico (HNO_3) cambia a color amarillo. Posteriormente el color amarillo es transformado a naranja-rojo por el agregado en exceso de NaOH (190). El ensayo fue realizado según el protocolo descrito en Dimkpa, 2007 y los medios de cultivos utilizados fueron LGI, Vincent y M9. En todos los casos se midió la absorbancia a 510nm (191).

Ambos ensayos fueron realizados por triplicado, se utilizó la cepa de referencia *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 como control positivo (115) y en el ensayo de Arnow también se utilizó la cepa de referencia *Sinorhizobium meliloti* 1021 (192). Estos ensayos se realizaron de forma cualitativa, por presencia de halo amarillo o cambio de color según correspondiese.

Resultados

2.5 Caracterización *in vitro* de enzimas vinculadas a PMI

2.5.1 Determinación de la movilidad bacteriana

Los resultados de los ensayos de movilidad mostraron que la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 presento las capacidades de *swimming*, *twitching* y *swarming* en las condiciones evaluadas a las 24 h.p.i. (Figura 2.4). Como se observa en las imágenes, la cepa se desplazó cubriendo la placa de Petri (movimientos *swimming* y *swarming*). En el caso del movimiento por *twitching* se observaron círculos de motilidad bacteriana característicos de este movimiento. Por otro lado, en la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 no se observaron dichos movimientos en las condiciones ensayadas.

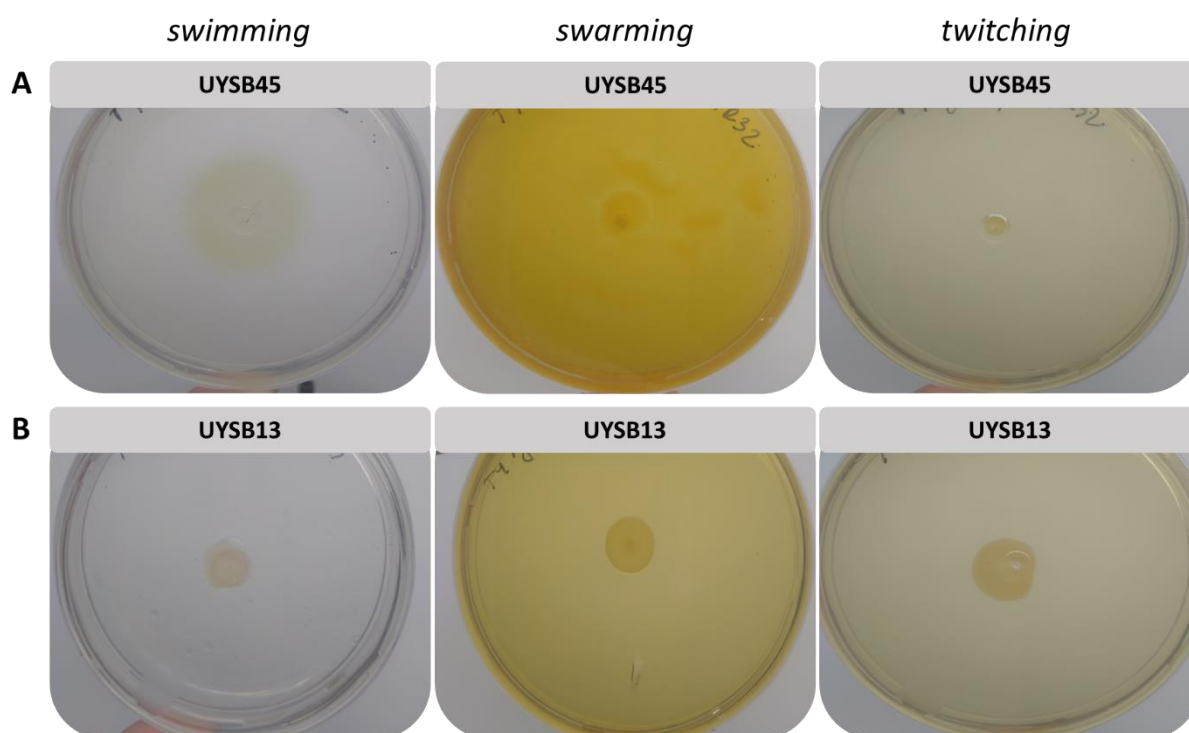


Figura 2.4: Placas Petri con medios de cultivo donde se evaluaron las capacidades de movimiento de *swimming*, *twitching* y *swarming* en TY-agar 0,3%, TY-agar 0,5% + glucosa 0,5% y TY-agar 1% respectivamente en las cepas A: *Pantoea* sp. UYSB45 y B: *Rhizobium* sp. UYSB13.

2.5.2 Determinación de la presencia de posibles funciones involucradas en la interacción planta bacteria

Ambas cepas evaluadas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13 mostraron actividad lacasa en el medio de cultivo suplementado con ABR, pero no en el caso que se suplementó

con guaiacol. Las colonias se consideraron positivas ya que cambiaron su color a azul (Figura 2.5A).

Por otro lado, cuando se realizó el ensayo para determinar la capacidad de producción y acumulación de PHB, se comprobó que únicamente la cepa de *Pantoea* sp. UYSB45 fue capaz de hacerlo en las condiciones ensayadas. Las colonias que presentaron fluorescencia fueron consideradas como positivas para la acumulación de lípidos y posible acumulación del polímero PHB (Figura 2.5B).

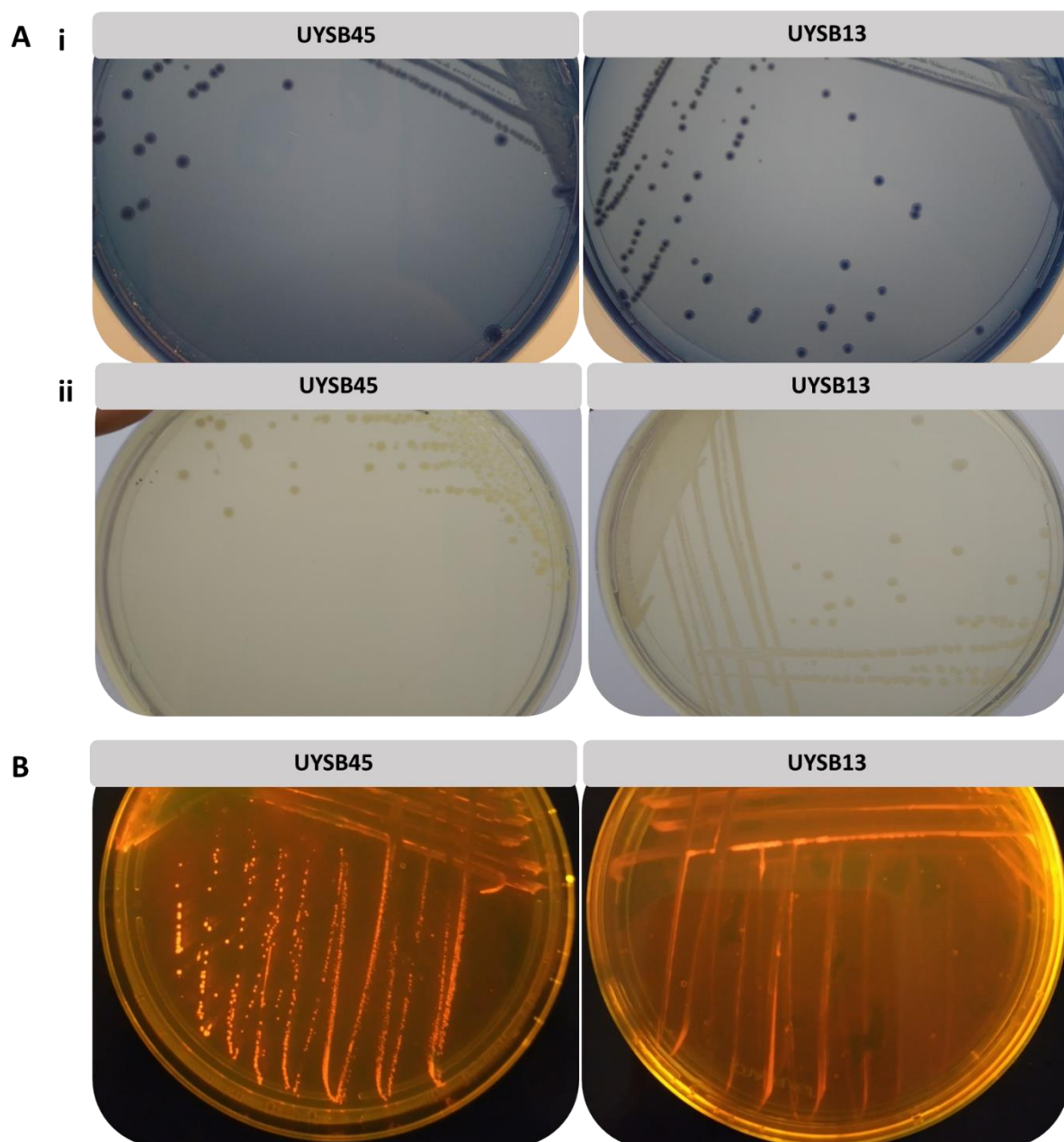


Figura 2.5: Vista de los ensayo realizados para la evaluación de la actividad lacasa en placas de petri con medio de cultivo TY suplementadas con (A)i: ABR o ii: guaiacol y (B) la capacidad de producción y acumulación de PHB en placas conteniendo medio LGI+ glucosa 30%+NH₄Cl 40 mM. en las cepas *Pantoea* sp. UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13.

2.6 Análisis del genoma de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45

2.6.1 Control de calidad, ensamblado y anotación del genoma

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de la cepa UYSB45 resultaron en 11.818.024 lecturas que contenían 1.193.620.424 pb, con un promedio de largo de 101 pb. Una vez realizado el control de calidad, las secuencias se ensamblaron dando como resultado 25 contigs con un contenido GC de 57,4%, un valor de N50 de 503.199 pb, donde el contig de mayor longitud fue de 1.568.014 pb. El tamaño aproximado del genoma es de 4.989.558 pb, contando con 4790 secuencias codificantes para proteínas y dos copias del gen *16S ARNr*. De los genes predichos el 35% (1672) comprenden 394 subsistemas del sistema SEED (Anexo II, Tabla A2). En la Figura 2.6 se muestran las abundancias de los genes predichos en cada categoría de los subsistemas de SEED respecto al total de las secuencias anotadas según la plataforma RAST.

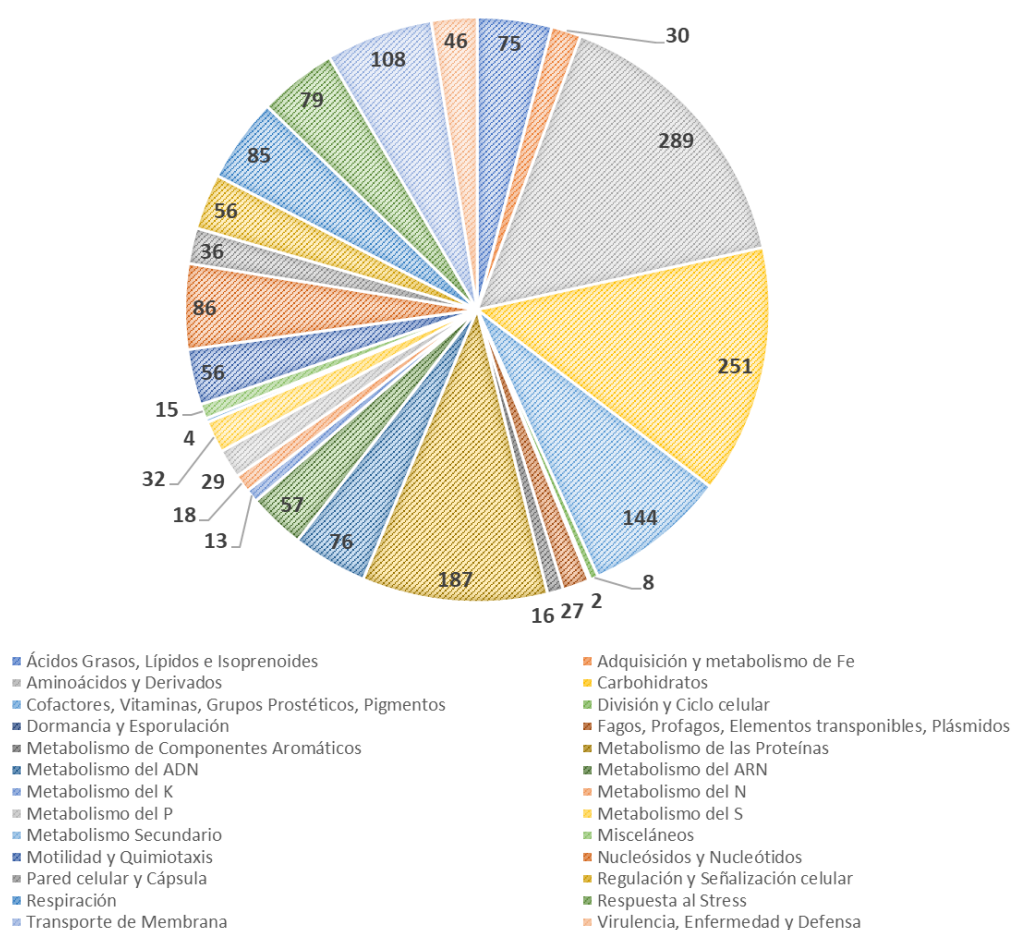


Figura 2.6: Distribución de secuencias codificantes dentro de cada categoría de los subsistemas de SEED. El gráfico representa la abundancia de cada subsistema y el número de CDSs asignado a cada uno, según la plataforma RAST.

2.6.2 Clasificación taxonómica

A partir de los genomas disponibles en el servicio JspeciesWS con un TETRA-Score mayor a 0.95 y del análisis de TCS (Tetra Correlation Search) (Tabla 2.1), se calcularon los valores de ANIb, ANIm y el índice TETRA para la cepa UYSB45 mediante dicho servicio. Por lo general un valor de 96% de ANI y 0.99 de TETRA son considerados una medida robusta de similitud genómica entre cepas (178, 193). Las cepas que superan los valores umbrales para los valores de ANIb, ANIm y TETRA se encuentran resaltados en negrita en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Resultados de ANIb, ANIm y TETRA obtenidos con el servicio JSpeciesWS

Organismo	ANIb (%)	ANIm (%)	TETRA
<i>Pantoea dispersa</i> SA5	98	98	0,9997
<i>Pantoea dispersa</i> EGD-AAK13	98	98	0,9997
<i>Pantoea dispersa</i> CCUG 5232T	98	98	0,9998
<i>Plautia stali</i> symbiont	96	97	0,9940
<i>Pantoea wallisii</i> LMG 26277 [T]	84	86	0,9529
<i>Pantoea endophytica</i> 596 [T]	83	85	0,9665
<i>Pantoea</i> sp. YR343	83	85	0,9598
<i>Pantoea</i> sp. RIT-PI-b	82	85	0,9673
<i>Pantoea</i> sp. GM01	82	85	0,9666

Los tres primeros aislamientos de la tabla 2.4 pertenecen a la especie *Pantoea dispersa* y superan los valores umbral, por lo que podemos inferir que la cepa UYSB45 pertenece a la especie *Pantoea dispersa*. En cuarto lugar se encuentra un simbiote de intestino de una especie de *Triatoma infestans* (vinchuca) y en quinto y sexto lugar 2 cepas tipos.

Al analizar la construcción filogenética obtenida, se confirma que la cepa en estudio se agrupa con las cepas pertenecientes a la especie *Pantoea dispersa*, conformando un clado con cepas de *Pantoea dispersa* utilizadas en los análisis con ANI y TETRA (Figura 2.7).

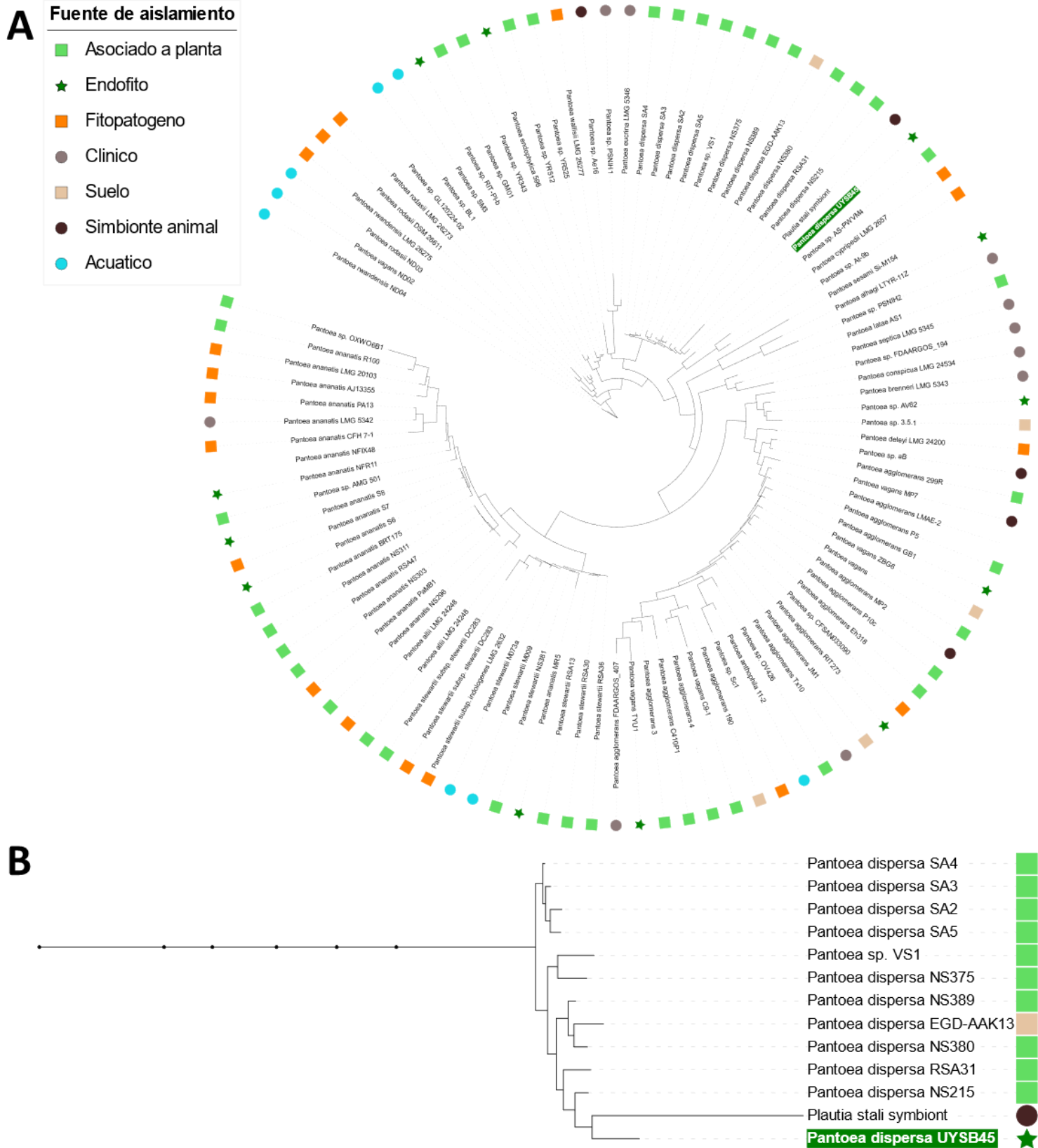


Figura 2.7: Construcción de filogenia utilizando (A) 102 genomas del género *Pantoea* (B) sección del nodo de *Pantoea dispersa* UYSB45. Se utilizó PhyloPhlAI para la construcción y la herramienta iTOL para anotación y manipulación del árbol filogenético.

Mediante el programa SPAdes se pudo determinar que la estructura del genoma está compuesta por un cromosoma circular.

Por otro lado, mediante los programas Mauve y Medusa, se obtuvo el *scaffold* para la cepa UYSB45, confeccionándose un mapa genómico para la misma (Figura 2.8).

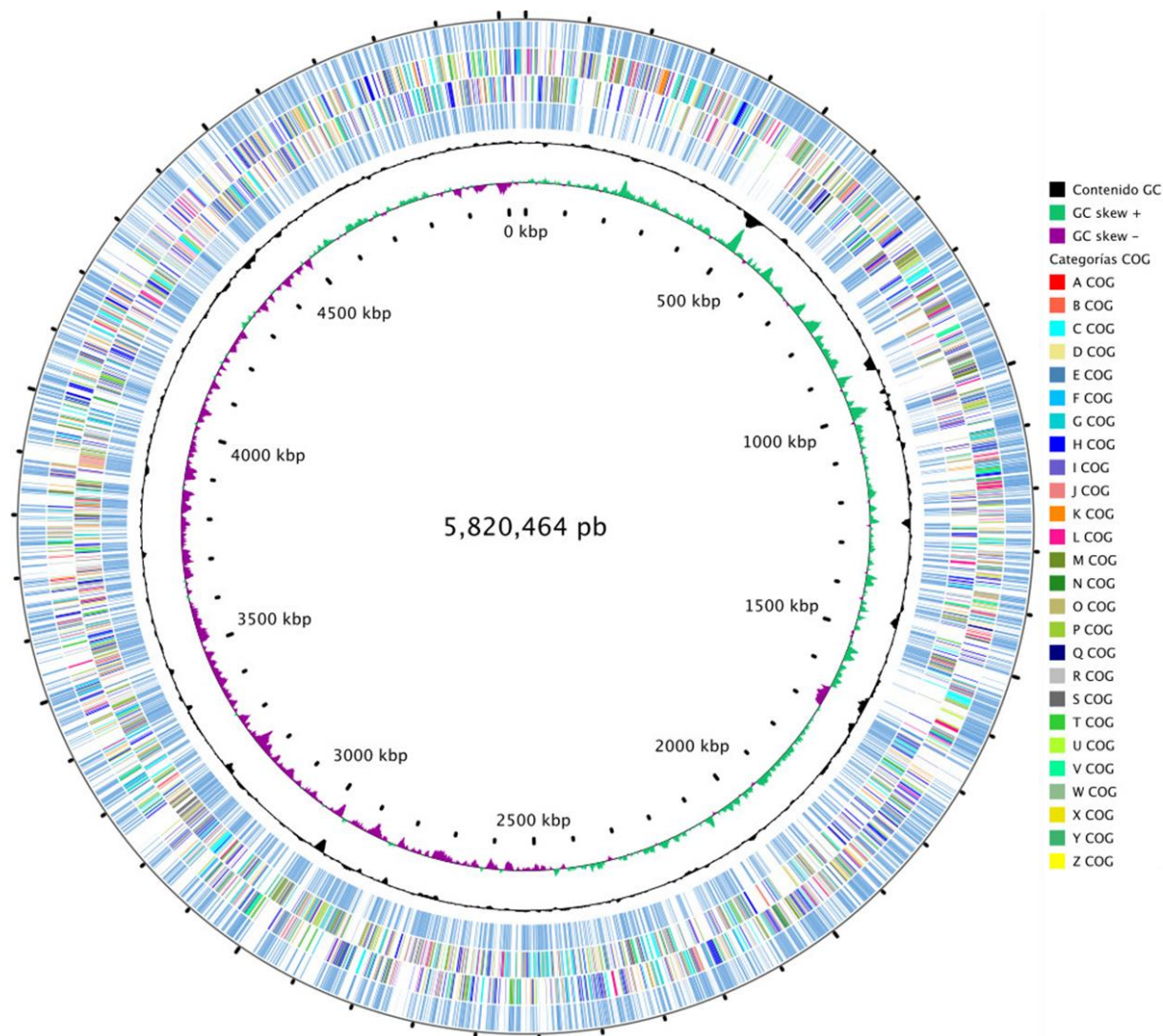


Figura 2.8: Mapa circular del cromosoma de *Pantoea dispersa* UYSB45. Desde adentro hacia afuera: contenido GC%, GC skew, rRNA tRNA CDS en la hebra anti-sentido coloreados de acuerdo con su categoría COG, CDS en la hebra anti-sentido, CDS en la hebra sentido, CDS en la hebra sentido coloreados de acuerdo con su categoría COG

2.6.3 Búsqueda de genes involucrados en la interacción planta-bacteria

En esta sección se detallan algunas de las principales características identificadas en el genoma de la cepa *Pantoea dispersa* UYSB45, relacionadas con la interacción planta-bacteria y la PCV.

Los resultados que se muestran en esta sección se obtuvieron utilizando los siguientes servicios web: RAST, KAAS y CARD.

2.6.3.1 Sistemas de secreción

Una función esencial de las células procariotas es el transporte de proteínas desde el citoplasma al medio ambiente, otras bacterias o células eucariotas, este proceso es conocido como secreción de proteínas. Existen varias clases diferentes de sistemas de secreción bacteriana y sus diseños pueden diferir en función del número de membranas que cruzan sus sustratos. Algunas proteínas secretadas en bacterias Gram negativas atraviesan estas membranas en dos pasos separados, donde primero se entregan al periplasma a través de los sistemas de secreción Sec o Tat y luego se transfieren a través de la membrana externa por un segundo sistema de transporte. Los sistemas de secreción (SS) en bacterias Gram negativas están numerados de Tipo I (SST1) a Tipo VI, y cada sistema transporta un subconjunto específico de proteínas. Estas vías están altamente conservadas en todas las especies bacterianas Gram negativas (51).

Los resultados de los análisis de las anotaciones obtenidas con el servicio web RAST mostraron que la cepa UYSB45 presenta los genes codificantes para los sistemas de secreción tipo Sec, Tat, 1, 4, 6, y 7 (Anexo II, Tabla A3). Por otro lado, al realizar el mismo análisis utilizando el servicio web KAAS con los parámetros por defecto, no se encontraron genes codificantes para el SST4. Sin embargo al disminuir el valor mínimo de *bit score* del BASTp en el servicio web KAAS de 60 (parámetro por defecto) a 30, se obtiene una secuencia con una similitud de 99% a nivel aminoacídico con el gen *VirD4* que forma parte de una ATPasa del sistema de SST4 (Figura 2.9).

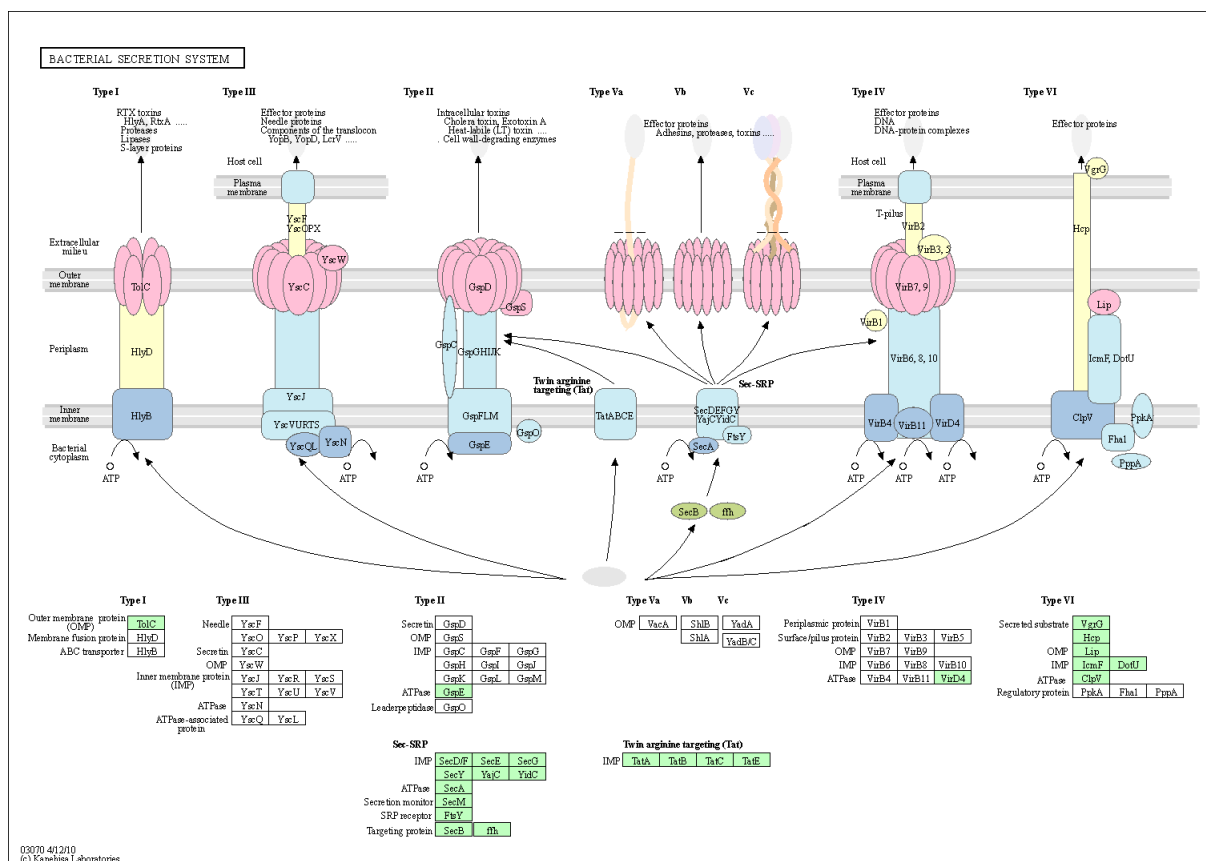
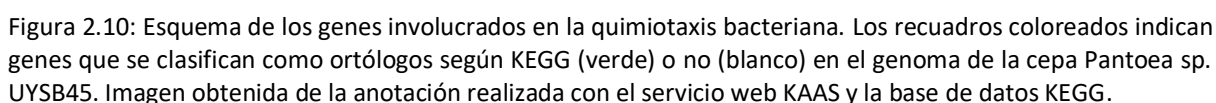


Figura 2.9: Esquema de los sistemas de secreción presentes en bacterias y los genes codificantes. Los recuadros coloreados indican genes que se clasifican como ortólogos según KEGG (verde) o no (blanco) en el genoma de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45. Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y la base de datos KEGG

Con la metodología utilizada, se podría afirmar que la cepa UYSB45 presenta los sistemas de secreción completos del tipo Sec y Tat e incompletos del tipo 1, 2, 4 y 6.

2.6.3.2 Quimiotaxis, formación de biopelículas y motilidad bacteriana

El sistema de quimiotaxis (Che) funciona a través de las proteínas de quimiotaxis que aceptan un metilo (MCP), las cuales pueden inducir la autofosforilación de la histidina quinasa (CheA) que a su vez fosforila a el regulador de respuesta (CheY). Las otras proteínas involucradas (CheW, CheR, CheB y CheZ) actúan como adaptadores entre los MCP y la CheA, o moduladores del estado de metilación de los MCP y el estado de fosforilación de CheY (194). En la Figura 2.10, se muestran los probables genes codificantes para los quimiorreceptores identificados en el genoma de la cepa UYSB45 encontrados con el servicio web KAAS. Los resultados de los análisis muestran la presencia de los siguientes genes: *MCP*, *CheABRVWYZ*, *FlhGMN*, *MotAB* (Anexo II, Tablas A4, A5 y A6)



Mediante el análisis del genoma de la cepa UYSB45 se identificó la presencia de genes codificantes para componentes relacionados a la formación de biopelículas. En este caso, el análisis realizado en el servicio web KAAS se basó en una comparación con los genes descritos en *E. coli*. Los resultados mostraron la presencia de diferentes genes posiblemente involucrados en los distintos pasos que llevan a la formación de la biopelícula (Anexo II, Tablas A4 y A7 y Figura 2.11)

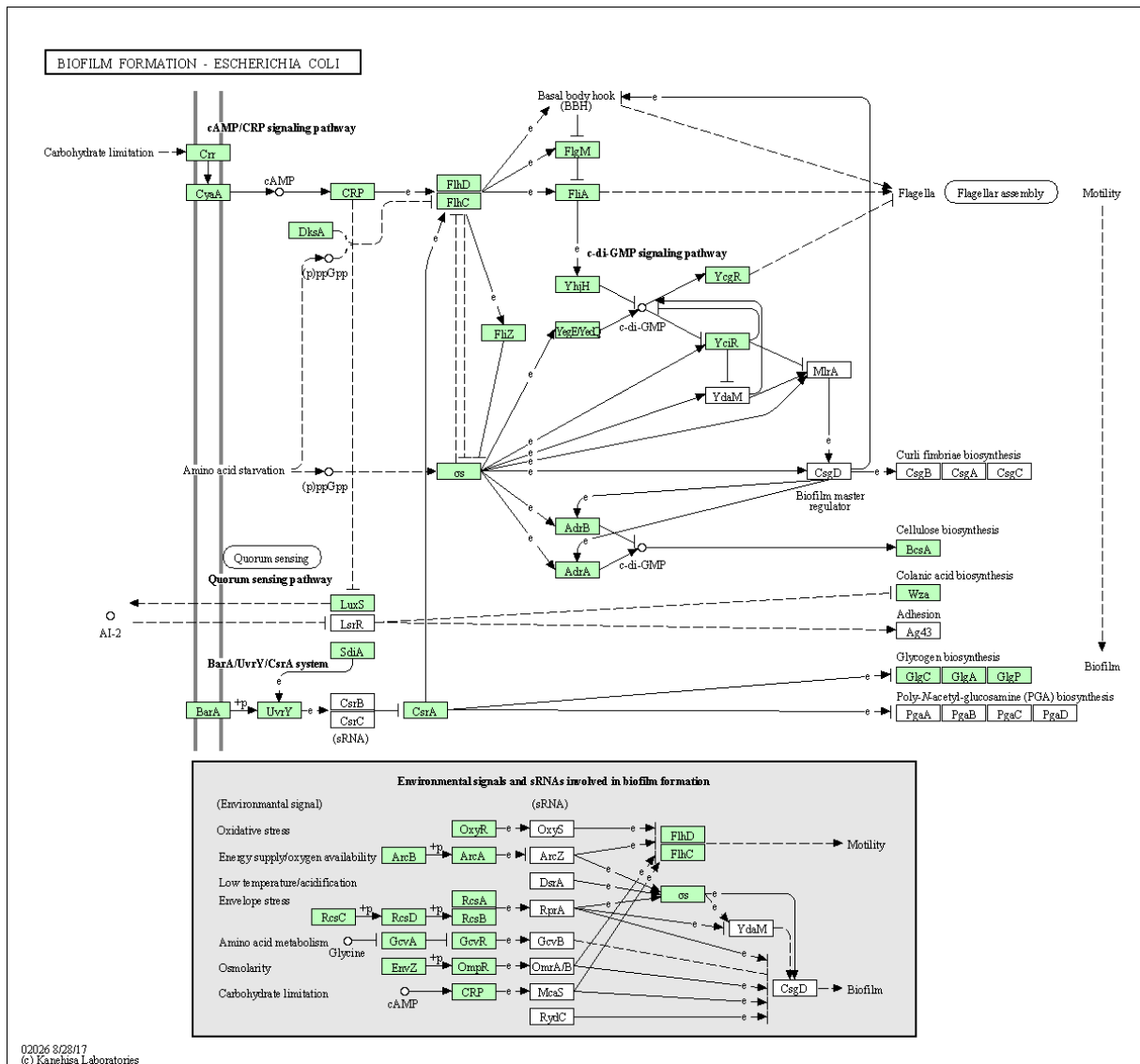


Figura 2.11: Esquema de los genes involucrados en la formación de biopelículas. Los recuadros coloreados indican genes que se clasifican como ortólogos según KEGG (verde) o no (blanco) en el genoma de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45. Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y la base de datos KEGG

FLAGELLAR ASSEMBLY

The diagram illustrates the structure of a flagellum and the sequence of gene products involved in its assembly. The flagellum consists of the following components:

- Filament cap:** FliD
- Filament:** FliC
- Hook-Filament junction:** FlgL, FlgK
- Hook:** FlgE (with a dashed arrow from FlhK to FlgD)
- Proximal rod:** FlgG, FlgH, FlgI
- Basal body:** FlhE, FlgB, FlgC
- MS ring:** FlhF
- C ring:** FlhG, FlhM, FlhN
- Motor / Switch:** FlhA, FlhB
- Cytoplasmic chaperone:** FlhN, FlhJ, FlhS, FlhT, FlgA
- Type III secretion system:** FlhO, FlhQ, FlhP, FlhR

The assembly pathway is shown at the bottom:

- Early gene products:** FlhC and FlhD are transcribed from DNA and translated into early gene products.
- Late gene products:** FlgM and FlhA are transcribed from DNA and translated into late gene products.

02040 1/31/17
(c) Kanehisa Laboratories

2.6.3.3 Sistema de dos componentes

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes permiten a las bacterias detectar, responder y adaptarse a los cambios en su entorno o su estado intracelular. Cada sistema de dos componentes consta de un sensor de proteína His-quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR). El RR activado puede efectuar cambios en la fisiología celular, a menudo regulando la expresión génica, permitiendo que las células detecten y respondan a estímulos induciendo cambios en la transcripción (196).

El análisis del genoma permitió identificar las secuencias codificantes para 22 sistemas de dos componentes (SDC) entre los que se encuentran: PhoRBA (asimilación de P), PhoQP (falta de Mg²⁺), EnvZ-OmpRCF (cambio osmótico ascendente, K⁺), RstBA (estrés), CpxA (proteínas mal plegadas), BaeSR-MdtABCD (eflujo multidroga), BasSR-AmB (modificación de LPS), QseCB-FlhDCFlhCA (quorum sensing), KdpDE-KdpABC (limitación de K⁺), TctEDABC (represión de catabolitos), NarQP-FrdA (Metabolismo N), RcsFCDAB (síntesis de polisacáridos capsulares), BarAUvrY-SdiACsrA (regulador del almacenamiento de C), FimZ-AmpC (resistencia a betalactámicos), GlnLGADB (asimilación de N/metabolismo del glutamato) y MCPCheWARYVB (quimiotaxis bacteriana)

(ANEXO II Tablas A8 A9 y A10, Figura I) (Figura 2.13).

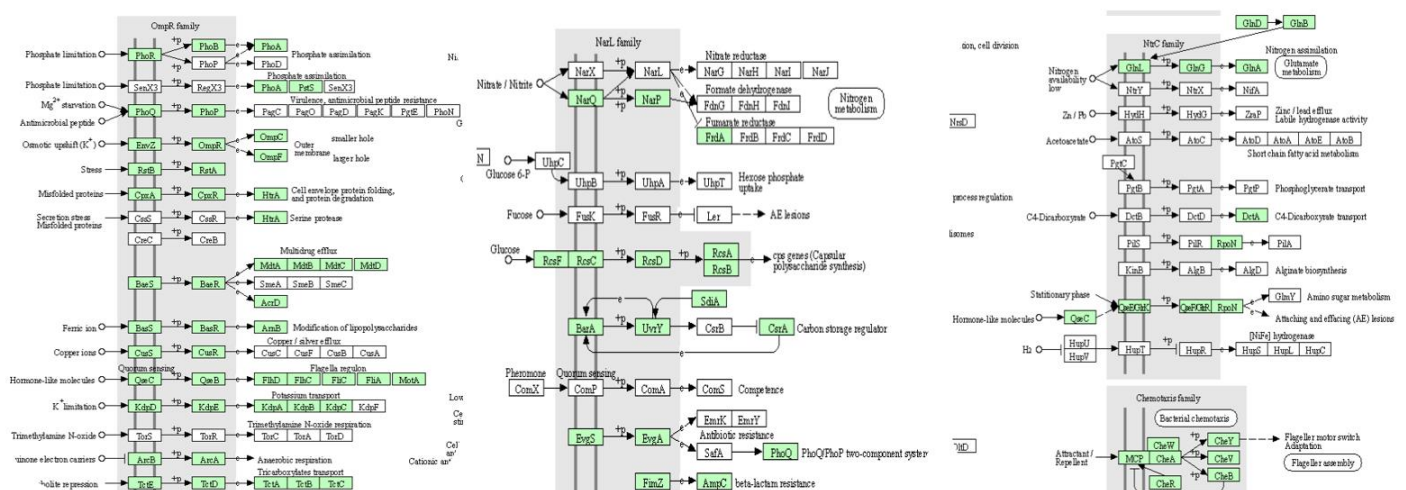


Figura 2.13: Algunos de los genes codificante para SDC relacionados a la interacción planta-bacteria identificados en el genoma de la cepa UYSB45. Los recuadros coloreados indican genes que se clasifican como ortólogos según KEGG (verde) o no (blanco) en el genoma de la cepa UYSB45. Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y la base de datos KEGG

2.7.3.4 Genes relacionados a la protección contra el estrés

Las bacterias poseen una batería de enzimas necesarias para lidiar con los cambios en las condiciones ambientales, como los que implica el pasaje de la rizósfera a la endósfera. Por lo que se realizó la búsqueda de posibles genes que codifiquen enzimas relacionadas al estrés. Utilizando el servicio RAST, se identificaron en el genoma de la cepa UYSB45 genes que probablemente codifican para las enzimas superóxido dimutasa, catalasas y peroxidasa (ANEXO II Tabla A11). La identificación de estos genes es consistente con la actividad lacasa por la cepa UYSB45 detectada en los ensayos *in vitro* (Sección 3.2.1).

2.6.3.5 Genes relacionados con la PCV

Dado que la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 es PCV de plantas de sorgo dulce, se analizó en el genoma la presencia de genes posiblemente relacionados a las características PCV tales como la producción y regulación de fitohormonas así como la producción de sideróforos (116).

Producción y regulación de fitohormonas

Previamente a través de ensayos bioquímicos de producción de auxinas, se detectó en condiciones *in vitro* la producción de la hormona AIA por la cepa UYSB45. Teniendo en cuenta este resultado, se realizó la búsqueda de genes probablemente relacionados a la vía sintética de dicha hormona.

Dentro de los subsistemas presentes en el RAST, no se encontró ningún gen anotado para la biosíntesis de AIA. Sin embargo, utilizando el programa BLAST con un e-value de 0.001 y tomando el gen *ipdC* de la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 como referencia, se identificó el gen UYSB45.2258 como un posible gen *ipdC* en el genoma de la cepa UYSB45.

Al realizarse el análisis con el servicio web KAAS el gen UYSB45.2258 fue también identificado como posible *ipdC* (EC:4.1.1.74) (Figura 2.14). Utilizando dicho servicio, también se encontraron posibles genes involucrados en las distintas vías de biosíntesis del AIA incluyendo *aldH* (EC:1.2.1.3, UYSB45.195), *iaaH* (EC:3.5.1., UYSB45.2562), *iaaM* (EC:1.13.12.3, UYSB45.2505), el gen que codifica para una nitrilasa (EC:3.5.5.1, UYSB45.246) y también para una aminotransferasa (EC:1.4.3.2, UYSB45.35) (ANEXO II Tabla A12, Figura 2.14). En el caso de los genes codificantes para la aminotransferasa y *iaaM*, se realizó la búsqueda en el genoma de la cepa UYSB45 de la misma manera que se realizó con el gen *ipdC*. En este caso

Adquisición y metabolismo de Fe

También se encontraron codificados en el genoma, los genes posiblemente involucrados en el internalización de sideróforos, transporte y adquisición de Hemina, el regulador Fur, así como del transporte del ion ferroso inducido por bajo pH (ANEXO II, tabla A13).

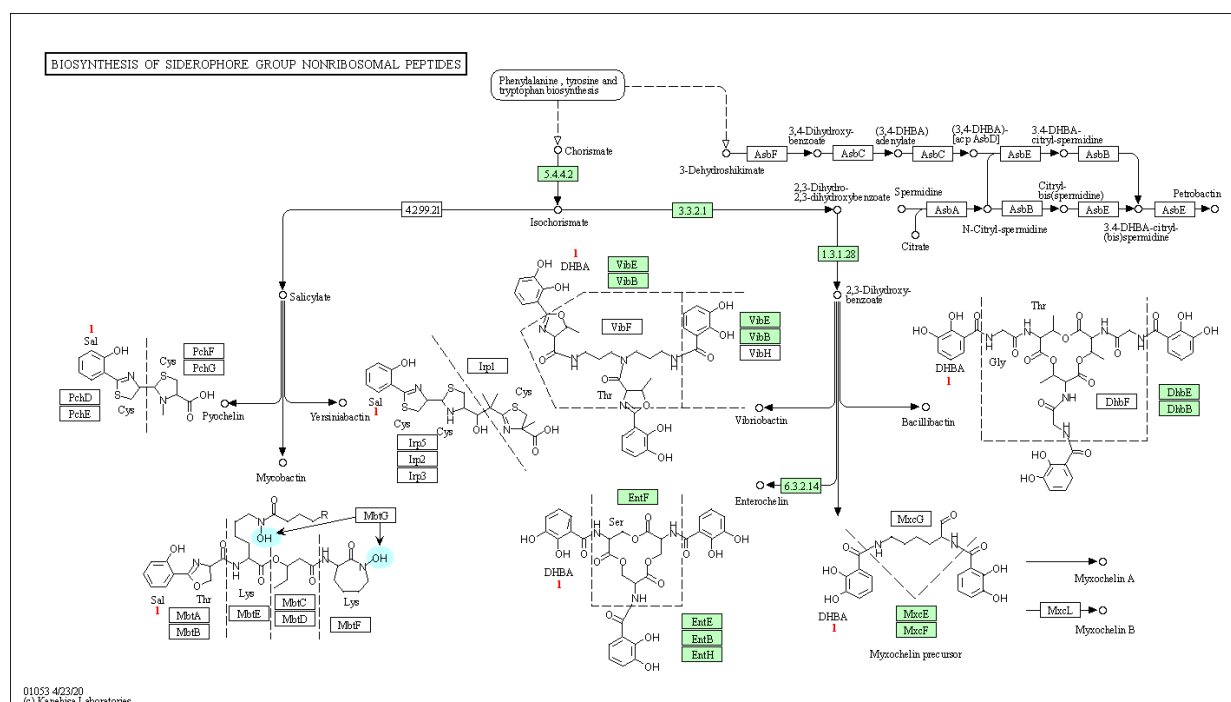


Figura 2.15: Genes involucrados en la biosíntesis de sideróforos. Los recuadros coloreados genes que se clasifican como ortólogos según KEGG (verde) o no (blanco) en el genoma de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45. Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y la base de datos KEGG

2.6.3.6 Resistencia a antibióticos

Previamente se determinó que la cepa UYSB45, presentando resistencia a múltiples de los antibióticos (Capítulo III, tabla 3.1) (116). Para la búsqueda de posibles genes relacionados a la resistencia antimicrobiana (AMR), se utilizó la base de datos del servicio web CARD. La base de datos CARD proporciona secuencias de referencia curadas y SNPs (por sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphisms*), organizados a través de la Ontología de resistencia a antibióticos (ARO) (175). Los resultados obtenidos con la base de datos CARD son los mostrados en la tabla 2.5 y en todos los casos empleando el criterio *Strict*.

Tabla 2.5: Genes relacionados con la resistencia a antibióticos presentes en el genoma de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 bajo el criterio del servicio web CARD *Strict*.

Clase de droga	ARO	% Identidad	% Cobertura
Tetraciclina	adeF	60,48	99,24
	adeF	42,35	99,06
Eritromicina, Cloxacilina, Oxacilina, Norfloxacin	CRP	99,52	100
Ácido nalidíxico	emrB	89	99,8
Eritromicina, Estreptomina, Tetraciclina , <i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnE		71,79	96,67
Cefepima, Ceftriaxona, Rifampicina, Colistina A, Colistina B	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF	75,73	100
Penicilina, cefalosporina	<i>Escherichia coli</i> ampH beta-lactamasa	73,02	101,04
Pulvomycin	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	92,11	96,33
Cefalosporina, Cefamicina, Penicilina	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics	53,26	96,56

Marcadas en negrita: resistencias reportadas en ensayos *in vitro*. **ARO:** Ontología de resistencia a antibióticos.

Al comparar los resultados obtenidos *in silico* con los obtenidos *in vitro*, se observa que los mismos son concordantes. Los genes reportados como codificantes para las resistencias a antibióticos fueron: gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomina, espectinomicina, ampicilina, polymixina B, tetraciclina y ácidonalidíxico. Asimismo, se identificaron genes posiblemente relacionados a resistencias antimicrobianas novedosas como la eritromicina, cloxacilina entre otras mostradas en la tabla.

En su conjunto los resultados sugieren que la cepa UYSB45 presenta una resistencia antimicrobiana versátil.

2.7 Construcción de mutantes en los genes *acdS*, *ipdC* y *entF* en la cepa *Pantoea* sp. UYSB45

Como se mencionó, la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 tiene efectos PCV al ser inoculada en el cultivar M81E y ADV2010 de sorgo dulce en condiciones de invernáculo. Asimismo el análisis genómico mostró la presencia de genes codificantes para diversos mecanismos PCV, posiblemente relacionados a él fenotipo descripto. Dado esto, se utilizó la metodología detallada en la sección 2.4 para la construcción de mutantes en los genes codificantes para las enzimas ACC desaminasa (UYSB45.1834), indol-piruvato descarboxilasa (UYSB45.2258) y el componente F de la enterobactina sintetasa un sideróforo bacteriano (UYSB45.3128), nombradas *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta acdS$, $\Delta ipdC$ y $\Delta entF$ respectivamente.

La metodología utilizada en este trabajo emplea el mecanismo de recombinación y reparación del ADN para eliminar el fragmento de ADN deseado de manera limpia. El procedimiento consta de los siguientes pasos: i-clonar la región de interés en el plásmido suicida (pEMG), ii-cointegrar en el genoma de la cepa a mutar la construcción obtenida en el plásmido y iii-transformar la construcción anterior con el plásmido pSEVA328S e inducir la nucleasa *I-SceI* presente en pSEVA328S. Existe un 50% de probabilidad de la obtención de la cepa recombinante (mutante) y un 50% de regreso al estado salvaje (160) (Figura 2.2).

2.7.1 Construcción de los vectores pEMG $\Delta acdS/ipdC/entF$

Para la obtención de mutantes en los genes seleccionados se escogió el método previamente explicado, con el cual se introducen mutaciones dirigidas sin dejar marcas en el genoma (160). El primer paso fue obtener un fragmento que contuviera regiones de homología corriente arriba y corriente abajo al gen que queremos eliminar. Para esto, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 500 pb de las regiones adyacentes corriente arriba (TS1) y corriente abajo (TS2) de los genes *acdS*, *ipdC* y *entF*. Ambos fragmentos se unieron mediante una segunda PCR, obteniéndose un único amplicón denominado TS1-TS2. A continuación, los fragmentos TS1-TS2 se clonaron en el plásmido pEMG generándose los plásmidos pEMG $\Delta acdS$, pEMG $\Delta ipdC$ y pEMG $\Delta entF$ (figura 2.2 i).

Los plásmidos recuperados fueron digeridos con las mismas enzimas usadas para su clonado, mostrando que contenían insertos con el tamaño esperado (tabla 2.3) (datos no mostrados). Luego se comprobó la identidad de los fragmentos y su correcta inserción en los plásmidos

mediante el análisis de secuencia de los insertos presentes en los plásmidos pEMG Δ *acdS*, pEMG Δ *ipdC* y pEMG Δ *entF* (datos no mostrados).

2.7.2 Cointegración de los vectores pEMG Δ *acdS*, pEMG Δ *ipdC* y pEMG Δ *entF* en *Pantoea* sp. UYSB45

El segundo paso fue la incorporación de los plásmidos en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45. Los vectores pEMG Δ *acdS*, pEMG Δ *ipdC* y pEMG Δ *entF* fueron transferidos mediante conjugación triparental a la cepa bacteriana. Las transconjugantes fueron seleccionadas en medio LB suplementado con Km. Debido a que los plásmidos transferidos no son replicables en *Pantoea* sp. UYSB45, la forma de obtener colonias resistentes a Km es que los plásmidos se integren al genoma de la cepa. La forma más sencilla de que esto ocurra es mediante recombinación homóloga entre las zonas de homología TS1-TS2 incluidas en cada caso (Figura 2.2). La cointegración de los plásmidos se corroboró mediante PCR y visualización por gel de agarosa (figura 2.16, cuadrante I). En la Figura 2.16 se muestran los geles de los productos de PCR de colonias Km^R realizados con el fin de confirmar las construcciones de las distintas etapas y los tamaños de los amplicones de dichos productos de PCR como se explicó en las secciones 2.4.4, 2.4.4.1 y 2.4.5 (tabla 2.6). En el carril 1 de dicha figura se observa el producto de PCR a partir de una colonia de la cepa UYSB45 pEMG Δ *acdS* (cointegrado) Km^R con los cebadores específicos para las regiones TS1-TS2 adyacentes al gen *acdS* (figura 2.2 ii). En el mismo se observa la banda correspondiente a 1000 pb (región TS1-TS2) y otra banda de 2000 pb que corresponde a la amplificación de la región comprendida entre TS1*acdS*TS2 (ver tabla 2.6 para los tamaños esperados).

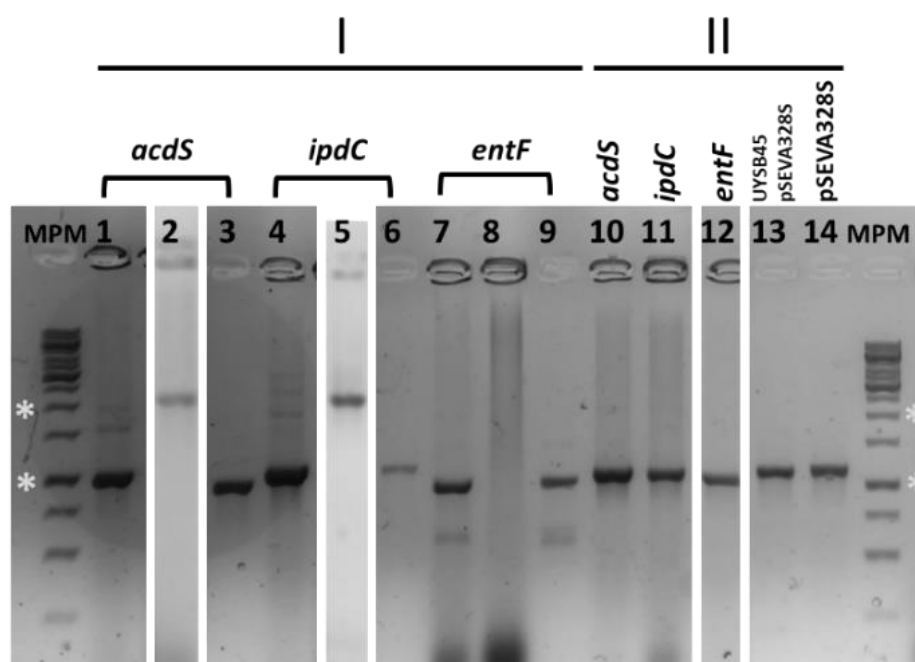


Figura 2.16: Gel de agarosa mostrando la verificación por PCR de las distintas etapas en la construcción de las cepas mutantes en los 3 genes. I: Producto de la amplificación de los cointegrados, corroboración de la construcción TS1*gen*TS2 integrado en el genoma de la cepa a mutar. 1: fragmento TS1-TS2 para el gen *acdS* en colonia Km^R, 2: la cepa salvaje con la amplificación del gen *acdS*, 3: plásmido pEMG-Δ*acdS*, 4: fragmento TS1-TS2 para el gen *ipdC* en colonia Km^R, 5: la cepa salvaje con la amplificación del gen *ipdC*, 6: plásmido pEMG-Δ*ipdC*, 7: fragmento TS1-TS2 para el gen *entF* en colonia Km^R, 8: la cepa salvaje con la amplificación del gen *entF*, 9: plásmido plásmido pEMG-Δ*entF*. II: Confirmación que las cepas utilizadas en el cuadrante I contienen producto de PCR con cebadores específicos para el reconocimiento del plásmido pSEVA328S. 10: colonia utilizada en carril 1, 11: colonia utilizada en carril 4, 12: colonia utilizada en carril 7, 13: cepa salvaje conteniendo pSEVA328S 14: plásmido pSEVA328S. MPM: Generuler 1 Kb de Thermo Fisher Scientific. Los * marcan las bandas correspondientes a 1000 y 2000 pb.

Con este resultado se confirmó que el vector pEMG-*acdS* se incorporó al genoma bacteriano.

Lo mismo ocurrió con los genes restantes que se buscan mutar (carriles 4 y 7 en figura 2.16).

Tabla 2.6: Tamaños esperados de los productos de amplificación de las reacciones de PCR realizadas para confirmar las distintas construcciones.

Gen	Tamaño del amplicón esperado (pb)		
	<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	pEMGΔ	<i>Pantoea</i> sp. UYSB45Δ
<i>acdS</i>	987	1993	1006
<i>ipdC</i>	1662	2087	1145
<i>entF</i>	3897	4912	1019

En el cuadrante II de la figura 2.16 se verificó que aquellos clones confirmados con las construcciones correctas integradas en el genoma de la cepa parental efectivamente contengan el plásmido que codifica para la enzima nucleasa *I-SceI* pSEVA328S (previamente electrotransformada). Mediante la identificación del amplicón del tamaño esperado de 1300 pb con cebadores específicos para el reconocimiento de dicho plásmido (cebadores pS3 y pS4, tabla 2.3), se confirmó la presencia de este en todas las colonias seleccionadas.

2.7.3 Resolución del cointegrado

La resolución de los co-integrados, que es evidenciada mediante la pérdida de la resistencia a Km, puede llevar a la obtención de las mutaciones deseadas. Esto se logra mediante la acción de la nucleasa I-SceI, la cual genera un corte en el ADN que estimula el proceso de resolución. La cepa co-integrada *Pantoea* sp. UYSB45 fue previamente electrotransformada con el plásmido pSEVA238S, que expresa la endonucleasa I-SceI y para optimizar esta acción distintas condiciones de expresión del inductor fueron evaluadas.

En la Figura 2.17A, se muestran las placas obtenidas en las distintas aproximaciones de inducción ensayadas. Se obtuvieron colonias Km-sensibles para los 3 genes en todas las condiciones ensayadas.

Por su parte, en la figura 2.17B, se observan los productos de PCR obtenidos de la amplificación con los cebadores TS1f y TS2r para cada gen (tabla 2.3). De esta manera se busca detectar si la construcción de la mutante fue exitosa. En el caso de los genes *acdS* y *ipdC* mediante la verificación por PCR, se visualizaron bandas únicas pero del tamaño correspondiente al gen blanco completo (TS1-*acdS*-TS2, 1993pb o TS1-*ipdC*-TS2, 2087 pb respectivamente). Por lo que en estos genes se infirió que la recombinación llevó a la recuperación de la configuración salvaje.

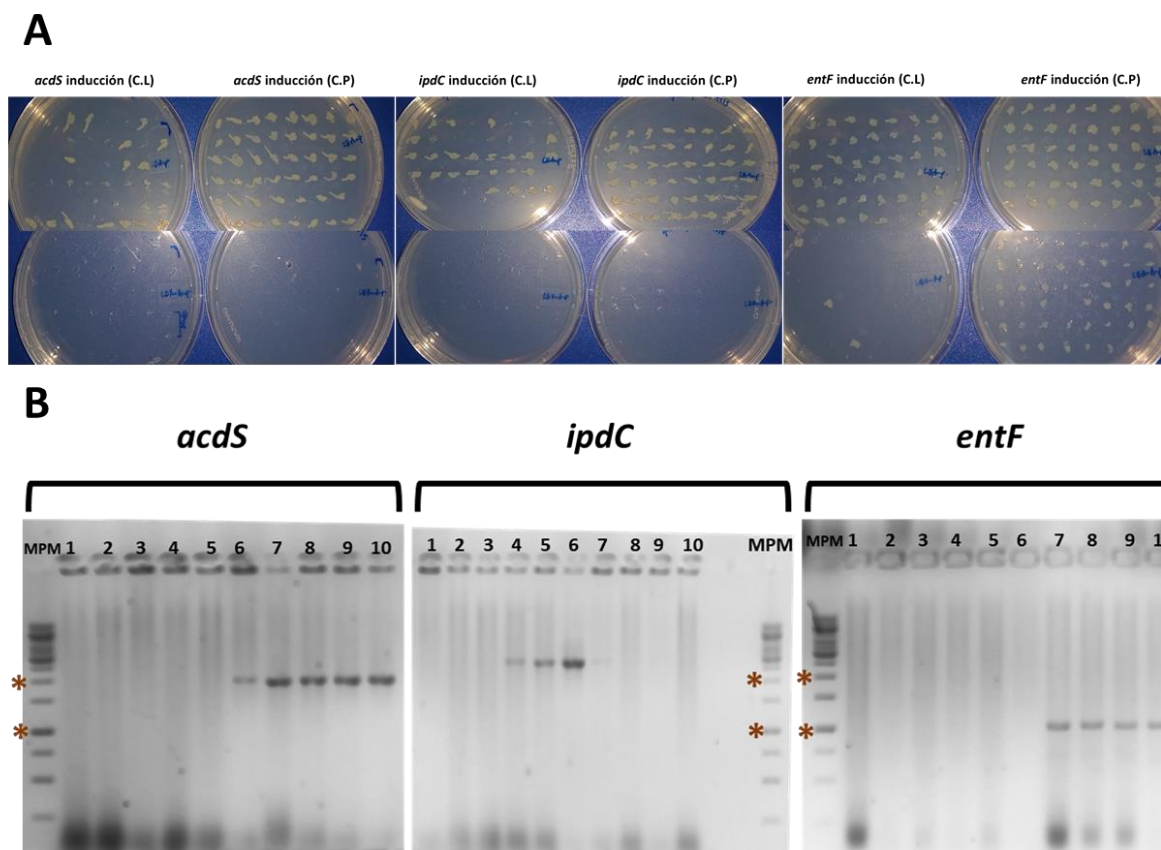


Figura 2.17: A: Placas de inducción con ambas aproximaciones, de las cuales se eligió las colonias con las cual seguir trabajando. En las placas de la izquierda, la inducción fue realizada a partir de colonias crecidas en cultivo líquido (CL) y en las de la derecha, la inducción se realizó a partir de una colonia crecida en placa de cultivo (CP). En la sección 2.4.5 se detallan las condiciones y medios utilizados. B: Gel de agarosa mostrando la verificación por producto de PCR de la inducción en las colonias elegidas de placas en la Figura A. Los carriles en cada gen a mutar corresponden a colonias únicas elegidas al azar. MPM: Generuler 1 Kb de Thermo Fisher Scientific. Los * marcan las bandas correspondientes a 1000 y 2000 pb.

Por otro lado, en el caso del gen *entF*, se observaron bandas únicas del tamaño de 1000 pb. El amplicón observado confirma la ausencia del gen *entF* y por lo tanto la exitosa construcción de la cepa mutante *Pantoea* sp. UYSB45 Δ *entF*. De esta manera, se obtiene una cepa mutante en el gen *entF* que codifica para una de las vías de producción de sideróforos conocidas y completas presentes en el genoma.

2.8 Caracterización *in vitro* de la cepa mutante *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$

En primer instancia, se evaluó el crecimiento de la cepa *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$ en los medios de cultivo rico TSB y definido LGI y LGI-Fe, con el fin de evaluar si la mutación realizada afectó la capacidad de crecimiento de la cepa mutada (Figura 2.18).

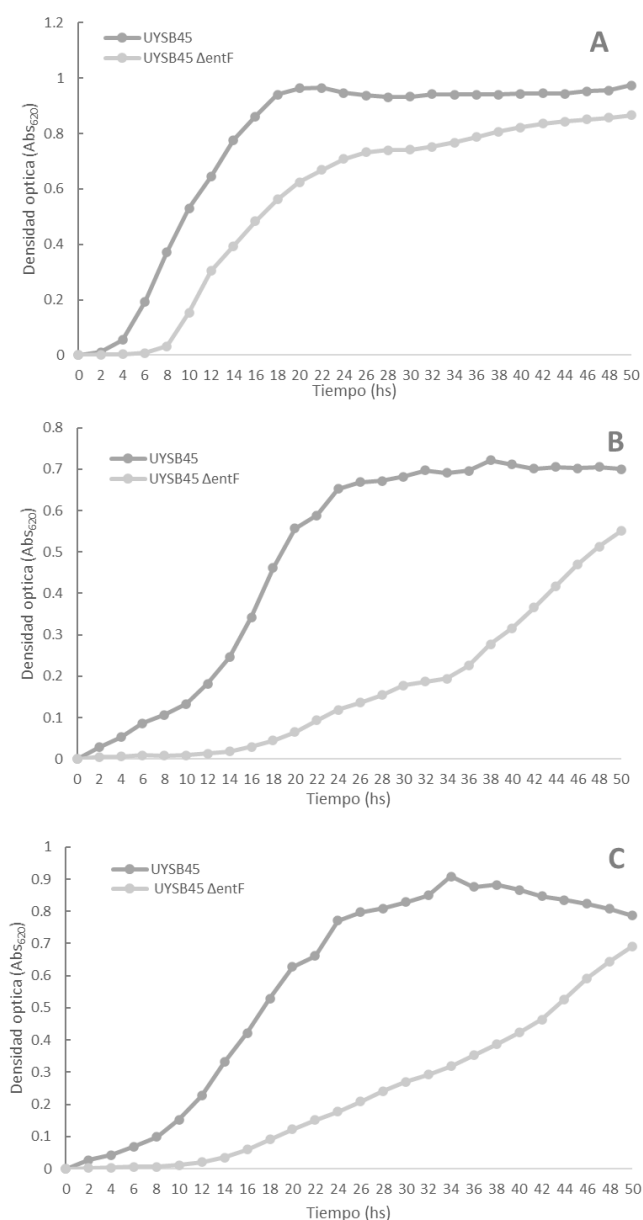


Figura 2.18: Curvas de crecimiento en medios de cultivos: (A) TSB (B) LGI (C) LGI-Fe de *Pantoea* sp. UYSB45 y *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$.

Los resultados mostraron un crecimiento más lento en la cepa mutante *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$ en comparación con la parental en los tres medios evaluados. El tiempo de generación (*g*) para la cepa UYSB45 salvaje en medio TSB es de 59 minutos, mientras que para la cepa mutante en el gen *entF* es de 131 minutos (tabla 2.7). Esta diferencia en el *g* se mantiene

cuando se evalúa el medio LGI, siendo en la mutante el doble de tiempo necesario para llegar a la misma DO en comparación con la cepa UYSB45. Por otro lado, cuando se realizan los cálculos en el medio de cultivo LGI-Fe, el *g* en ambas cepas evaluadas fue el mismo y de aproximadamente 3 horas en ambos casos (tabla 2.7).

Tabla 2.7: Tiempo de generación para las condiciones y cepas ensayadas expresado en horas

Cepas	Medios de cultivo (h)		
	TSB	LGI	LGI-Fe
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	0.98	2.52	3.00
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45 Δ entF	2.18	5.00	2.88

Asimismo, los ensayos de producción de sideróforos en placas con medio de cultivo CAS, para la detección de producción de sideróforos, mostraron la producción de un halo en la cepa mutante al igual que en el parental. Cuando se realizó el ensayo de Arnow en los 3 medios de cultivos evaluados, no se obtuvo producción de catecoles en las construcciones evaluadas (Tabla 2.8).

Tabla 2.8: Ensayo para la detección de producción de sideróforos

Cepa	Detección de sideróforos	
	Medio de cultivo CAS	Ensayo de Arnow
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	+	-
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45 pEMG Δ entF	-	-
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45 Δ entF	+	-

Discusión

2.9 Genómica de la cepa *Pantoea dispersa* UYSB45

2.9.1 Estructura del genoma y relaciones filogenéticas

A partir de los valores de ANIb, ANIm y el índice TETRA obtenidos en la sección 2.6.2, pudimos clasificar a la cepa UYSB45 como perteneciente a la especie *Pantoea dispersa*. A su vez y con la finalidad de profundizar en las relaciones filogenéticas de esta cepa, se construyó un árbol filogenético con los genomas de referencia de las cepas *P. dispersa* depositadas en el NCBI. Para dicho análisis se emplearon 102 genomas referencia de este género (Anexo II, Tabla A1) aisladas a partir de diferentes nichos ecológicos. Las cepas con el valor umbral de 0.95 para el índice TETRA (tabla 2.5) también fueron incluidos en el árbol filogenético y se agruparon compartiendo el clado de *P. dispersa* (Figura 2.7). El clado de la cepa *P. dispersa* UYSB45 (Figura 2.7) está formado por, *Pantoea* sp. VS1 obtenida de la superficie de *Magnolia grandiflora*, *Pantoea dispersa* EGD-AAK13 que es un aislamiento clínico y *Plautia stali symbiont* aislamiento de un simbiote de vinchuca (201). Por otro lado, las restantes cepas del clado fueron obtenidas de semillas de arroz (202) (Anexo II, Tabla A1).

Los resultados mostraron que la cepa UYSB45 se agrupa en un mismo clado con todas las cepas fueron aisladas de ambientes asociados a distintas especies vegetales, siendo la cepa *P. dispersa* UYSB45 la única reportada como endófita (esta tesis). Cabe destacar que 11 cepas pertenecientes al género *Pantoea* han sido reportadas como endófitas: *P. agglomerans* RIT273, *P. agglomerans* GB1, *P. ananatis* MR5, *P. ananatis* S6, *P. ananatis* S8, *P. alhagi* LTYR-11Z, *Pantoea* sp. AV62, *P. vagans* TYU1, *P. ananatis* NFR11, *P. endophytica* 596 y *Pantoea* sp. RIT-PI-b de diversas plantas como *Salix purpurea*, *Salix atrocinerea*, *Poplar* spp., *Cenchrus biflorus*, *Toxicodendron radicans*, *Alhagi sparsifolia* Shap., *Panicum virgatum*, *Taxus cuspidata*, y *Zea mays* (203–205) (Tabla A1, Anexo II). *P. endophytica* 596 y *Pantoea* sp. RIT-PI-b poseen valores de TETRA y ANI por encima del umbral utilizado en este trabajo con respecto a UYSB45, sin embargo pertenecen a otra especie. Esto puede estar explicado, por el hecho que la taxonomía del género *Pantoea* está en constante revisión (206).

Los resultados del ensamblado del genoma de la cepa UYSB45 sugieren que presenta un único cromosoma. Esto es interesante porque la cepa *Pantoea dispersa* EGD-AAK13, la cual es representativa de esta especie, tiene un único cromosoma con un tamaño de 4.764.584 pb

que codifican para 4319 proteínas y un GC% de 57.8 (NCBI, GCA_000465555.2). Estos últimos valores son muy similares a los encontrados en nuestra cepa en estudio UYSB45. Por otro lado, la cepa tipo *Pantoea dispersa* ATCC 14589, aislada de suelo, también presenta un único cromosoma según la información depositada en el NCBI (207).

2.9.2 Características relacionadas con la interacción planta-bacteria presentes en la cepa UYSB45

En primera instancia, se realizaron ensayos *in vitro* evaluándose la presencia de enzimas vinculadas a la interacción con la planta (tabla 2.9)(116).

Tabla 2.9: Características posiblemente relacionadas con la interacción y la PCV presentes en la cepa UYSB45 detectadas *in vitro*

Caracterización		Aislamiento
		<i>Pantoea sp.</i> UYSB45
Bioestimulación ^a	AIA	+
	ACC	-
Biofertilización ^b	<i>nifH</i>	-
	CP	-
	Ca ₃ PO ₄	+
	SID	+
	CE	-
Infección ^c	HC	-
	PROT	-
	L (ABR)	+
	L (G)	-
	BIO	-
Movilidad ^d	swi	+
	swa	+
	twi	+
Reserva ^e	PHB	+

^aAIA: producción de ácido indol-3-acético; ACC: actividad aminocyclopropane-1-carboxylato desaminasa. ^b*nifH*: presencia del gen *nifH*, codificante para una de las unidades de la nitrogenasas, detectado por PCR; CP: crecimiento en película; Ca₃PO₄: solubilización de fosfato de calcio inorgánico; SID: producción de sideróforos. ^cCE: actividad exo-celulosa; HC: actividad hemicelulosa; PROT: actividad proteasa; L (ABR): actividad lacasa con Azul brillante de Remazol como sustrato; L (G): actividad lacasa con guaicol como sustrato; BIOFILM: producción de biopelículas. ^dswi: capacidad de realizar *swimming*, y; swa: capacidad de realizar *swarming*; twi: capacidad de realizar *twitching*. ^ePHB: producción y acumulación de polihidroxubutirato.

Las características PCV identificadas en nuestro trabajo entre ellas: producción de ácido indol-3-acético, solubilización de fosfato de calcio inorgánico, producción de sideróforos, actividad lacasa y la producción y acumulación de polihidroxubutirato son ampliamente reportadas en cepas asociadas a cultivos de interés agronómico (208).

Este análisis *in vitro* fue posteriormente complementado con el análisis *in silico* de la anotación del genoma de la cepa UYSB45. Para esto se buscaron genes relacionados con otras características potencialmente relacionadas en la interacción con la planta.

A continuación, se enumeran los genes identificados según la etapa de la interacción planta-bacteria en la cual estarían involucrados.

i-Colonización del rizoplasma

En primer lugar se buscaron los genes relacionados a la quimiotaxis y movilidad bacteriana teniendo en cuenta que de la capacidad de detección y respuesta a las señales que producen las plantas, dependerá el éxito de la colonización bacteriana. Las proteínas transmembranas (MCPs, *Methyl-accepting chemotaxis protein*), juegan un rol clave ya que pueden actuar como atrayentes o repelentes (Figura B). Algunos de los genes codificantes para este tipo de proteínas, han sido propuestos como claves al momento de la colonización en las cepas *H. seropedicae* SmR1 y *A. brasilense* Sp7, ya que mutantes en los mismos eran incapaces de adherirse o colonizar las raíces respectivamente (28, 209). En el genoma de *P. dispersa* UYSB45 se identificaron 25 genes anotados como relacionados a MCPs-Quimiotaxis (tabla A5 y A6 lo que indicaría la capacidad de esta cepa de sensor diferentes estímulos y ser atraída a las raíces de las plantas de sorgo dulce.

Por otro lado, se identificó la presencia del gen *rfbD*, posiblemente relacionado con el clúster codificante para los receptores de ramnosa (tabla A6, Figura B). Este monosacárido, codificado por los genes *rfbABCD*, es frecuentemente detectado como parte de los LPS y el antígeno O. Dicho clúster ha sido reportado como estimulado por los flavonoides exudados por la planta y relacionados con las etapas tempranas de la colonización de plantas de *Zea mays* (maíz) por la cepa *H. seropedicae* SmR1 (35). Mutantes en la cepa SmR1 en los genes *rfbB* o *rfbC* presentaron un menor nivel de adhesión radicular en comparación con la salvaje, resaltando su rol en la interacción con las raíces de plantas de maíz (35). No se pudieron identificar los restantes genes del clúster mencionado en la anotación del genoma de la cepa UYSB45, pudiendo no ser detectados por la plataforma RAST (tabla A6).

Trabajos previos han demostrado que en las cepas *Azoarcus olearius* BH72 y *A. brasilense* Sp7 la presencia del flagelo, así como el pili, son estructuras necesarias tanto para el movimiento como para la adhesión a la superficie de la raíz (30, 210). En el genoma de *P. dispersa* UYSB45 se identificaron todos los genes codificantes necesarios para el ensamblado del flagelo (Figura

B). Asimismo, la presencia de flagelo también fue confirmado mediante ensayos *in vitro* en la cepa UYSB45, ya que la misma es capaz de realizar los movimientos del tipo *swimming* y *swarming* (tabla 2.9). Por su parte, el regulador del sistema de dos componentes QseB, identificado en la cepa UYSB45 (tabla A9, Figura B), ha sido descrito como relacionado al regulón del flagelo. En la cepa endófitra *A. olearius* BH72 este regulador, junto con la proteína motora flagelar FliN, fue inhibido luego de 4 hs. de exposición a exudados radiculares, atribuyendo que el flagelo bacteriano desencadena la respuesta de defensa de la planta (53).

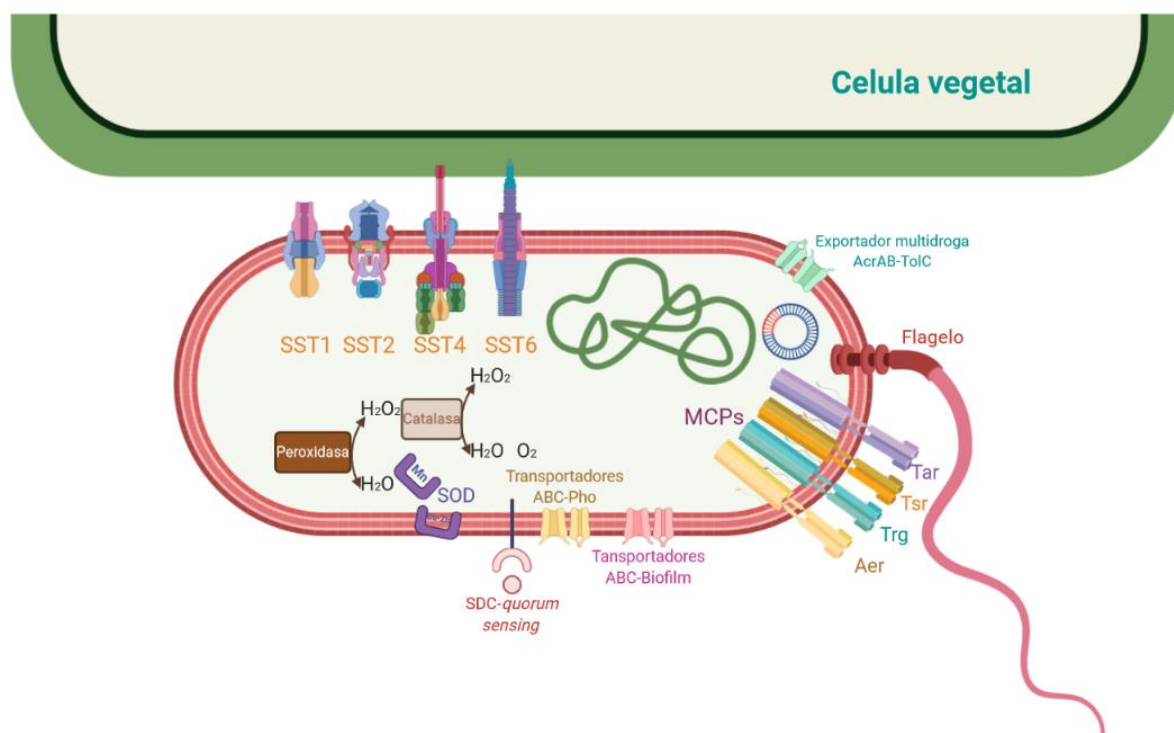


Figura B: Representación esquemática de los genes relacionados a la interacción planta-bacteria identificados en el genoma de la cepa *P. dispersa* UYSB45. SST1-6 (tabla A3), Flagelo (tabla A4), MCPs-Quimiotaxis (tabla A5 y A6), Biopelícula (tabla A7), SDC: Pho (tabla A8), QS (tabla A9), Protección contra el estrés SOD (tabla A11). Creado con BioRender.com.

La adhesión bacteriana a la superficie radicular puede ser exitosa en parte por la formación de biopelículas (14). Genes relacionados al proceso de formación de biopelícula se identificaron en la cepa UYSB45 (Tabla A7, Figuras 2.10 y B). Entre estos genes se encontraron los genes codificantes para la biosíntesis de celulosa (*bcsBEGQS*), descritos como esenciales para la formación de biopelícula y posterior colonización de la raíz por las cepas en *R. leguminosarum* biovar *viciae* 3841, *S. enterica* y *H. rubrisubalbicans* M1 (211–213). Curiosamente, cuando se realizaron los ensayos de formación de biopelícula en superficie abiótica, no se observó formación de biopelícula (116).

También se identificó en el genoma de la cepa UYSB45 el gen UYSB45.1046, que probablemente codifica para el factor sigma28. Este factor de transcripción está reportado como relacionado a la regulación de la expresión de los genes relacionados con la flagelina, quimiotaxis y los genes de movilidad (14) (Tabla 2.9, Figura 2.11). En el caso del endófito *B. mycooides* EC18, dicho factor aumentó su expresión en presencia de exudados radiculares de plantas de *Solanum tuberosum*, lo que remarca su rol en la interacción planta- bacteria (32). Muchas especies bacterianas son capaces de producir y almacenar polihidroxubutirato (PHB), un polímero perteneciente a la clase de los poliésteres, involucrados en la supervivencia en condiciones de estrés o en entornos competitivos (14). La producción y almacenamiento de este compuesto en la cepa UYSB45 fue detectada *in vitro* (Tabla 2.9). La presencia de esta característica en la cepa UYSB45 podría estar relacionada a que la rizósfera puede verse como un entorno de estrés para la bacteria y el almacenamiento de carbono en forma de PHB puede proporcionar una ventaja competitiva para la colonización (99). Es interesante destacar que no se identificaron los genes *phaABC1* reportados como responsables de esta función por RAST ni por búsqueda en NCBI (99). Esto puede deberse por un lado a que dichos genes estén en una región no secuenciada del genoma; por otro que la cepa UYSB45 posea otro conjunto de genes para la producción de PHB.

ii-Infección bacteriana

El ingreso a los tejidos internos de la planta puede ser tanto de forma activa como pasiva (27). En el proceso activo han sido reportados como involucradas las enzimas celulasas, xilanasas, celobiohidrolasas, endoglucanasa y proteínas de unión a celulosa (214). Particularmente en la cepa *A. olearius* BH72 mutantes en los genes codificantes para la enzima endoglucanasa presentaron disminuida la capacidad de colonización de las raíces de plantas de arroz, así como su propagación sistémica en la planta (43). El genoma de la cepa UYSB45 codifica para una región con alta identidad nucleotídica a una endoglucanasa (beta-1,4-glucanasa) (Tabla A7, UYSB45.4673). Se podría especular que la presencia de este gen indicaría su posible rol en la colonización de las raíces de las plantas de sorgo dulce. Cuando se realizó el ensayo *in vitro* a gran escala buscando actividad endoglucanasa, en las condiciones ensayadas la cepa UYSB45 no mostro dicha actividad (tabla 2.9) (116). Se debería ajustar las condiciones del ensayo para poder detectar la actividad de la enzima en condiciones *in vitro*.

Una vez dentro de la célula vegetal, la bacteria debe ser capaz de resistir al estrés de este ambiente (27). En el genoma de la cepa UYSB45 se identificó el gen *rpoS*, el cual codifica para un posible factor sigma regulador de la respuesta al estrés ambiental (14). A su vez se identificaron otros genes posiblemente involucrados con la respuesta al estrés (14) (Tabla 2.10, Figuras 2.11 y B).

Tabla 2.10: Genes relacionados a la protección contra estrés presentes en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Número del gen	Rol	Subsistema
UYSB45.460	RNA polymerase sigma factor RpoS	Stationary phase repair cluster, Transcription initiation, bacterial sigma factors
UYSB45.1600	Regulator of RpoS	- none -
UYSB45.1046	Negative regulator of flagellin synthesis FlgM (anti-sigma28)	- none -
UYSB45.3134	Transcription elongation factor GreA	Transcription factors bacterial

En particular, un factor de transcripción importante en la interacción planta-bacteria es GreA, relacionado a la adaptación al estrés hiperosmótico y salino (33). En ese sentido se identificó en el genoma de UYSB45 el gen UYSB45.3134 que codifica probablemente a un factor de transcripción del tipo GreA (Tabla 2.10).

Algunas de las enzimas comúnmente relacionadas a la respuesta a estrés son la superóxido dismutasa: SOD (SodA y SodC para las SOD de Mn y Cu/Zn, respectivamente, catalasa y peroxidas (215). Estas tres enzimas también fueron identificadas en el genoma de la cepa UYSB45 (Tabla A11, Figura B). Genes codificantes para este tipo de enzimas fueron identificadas en el genoma de la cepa UYSB45 (Tabla A11, Figura B). Debido a que el superóxido generalmente no atraviesa las membranas biológicas, la enzima SodA intracelular elimina en gran medida las fuentes intracelulares o metabólicas de superóxido, mientras que SodC periplásmico/extracelular combate directamente el superóxido del hospedero (27). Interesantemente, la cepa UYSB45 cuenta con los genes codificantes para SodA y SodC que actúan en 2 compartimentos bacterianos distintos.

Sistemas de secreción bacterianos

El análisis del genoma de la cepa UYSB45 mostró la presencia de secuencias codificantes para los sistemas de secreción (SS) del tipo SST1, SST2, SST4 y SST6 (tabla A3).

La función del SST6 ha sido discutida mucho en la bibliografía, con relación a las ventajas o limitación que genera en la colonización bacteriana cuestionando su papel más allá de la virulencia (216). Particularmente, mutantes en el SST6 en la bacteria endófito *A. olearius* BH72, fueron más exitosas al colonizar plantas de arroz en comparación con la cepa salvaje (53). Este comportamiento podría atribuirse a que algunos de los efectores que son translocados por el SST6 pueden provocar una respuesta de defensa del hospedero, la cual limitaría la colonización endofítica. Por otro lado, mutagénesis aleatoria en todo el genoma de la cepa *Pseudomonas taiwanensis*, permitió la identificación del sideróforo pioverdina como el factor responsable de la inhibición del crecimiento de la cepa fitopatógena *X. oryzae* pv. *oryzae*, siendo el SST6, el sistema necesario para la secreción completa de este sideróforo (216). Por otro lado, en el caso de la cepa *Salmonella enterica*, se demostró que una mutación en dicho sistema llevaba a la disminución de la adhesión a las raíces de plantas de alfalfa, pero sin afectar la formación de biopelícula (31).

En cuanto a los SST2 y SST4 se ha reportado que, la cepa endófito *Burkholderia phytofirmans* PsJN presenta una regulación positiva de los genes codificante para estos sistemas en células bacterianas colonizando plantas de *Solanum tuberosum* L. (papa) (93).

Teniendo en cuenta que el genoma de la cepa UYSB45 codifican para los SS bacterianos antes mencionados, se podría especular que los mismos estén involucrados en la colonización exitosa de las raíces de las plantas de los cultivares utilizados.

iii-Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Al momento del análisis de los genes anotados como relacionados con la capacidad promotora del crecimiento vegetal, se puso énfasis en aquellos genes relacionados a las distintas etapas de la regulación hormonal de la planta (biosíntesis de AIA y ACC desaminasa), así como también en aquellos relacionados con la producción de sideróforos (Figura D).

a-Producción y modulación de fitohormonas

La vía del indol 3 piruvato (IPA), involucrada en la biosíntesis de ácido indol-acético (AIA), ha sido propuesta como la principal en plantas y es la más comúnmente encontrada en bacterias (Figura C) (217). El genoma de *P. dispersa* UYSB45 presenta los posibles genes codificantes para las enzimas de dicha vía, una aminotransferasa, una descarboxilasa, una aldehído deshidrogenasa y una nitrilasa (tabla A12 y Figura C y D). Los resultados obtenidos en este

trabajo concuerdan con estudios previos donde las vías encontradas son la encontradas mayoritariamente en Proteobacteria (218). Esta afirmación fue corroborada mediante la detección de genes codificantes para la aminotransferasa (primera etapa en la vía IPA) o el gen *ipdC* (segunda etapa en la vía IPA) (Figura C y D) en el trabajo donde se estudió la distribución de vías de síntesis de AIA dependientes de triptófano en bacterias mediante análisis genómico a gran escala (218). Al igual que lo detectado en nuestros resultados, en dicho trabajo se encontró que la mayoría de las Proteobacteria contenían aminotransferasas pero carecían de las enzimas necesarias en los pasos posteriores de la vía IPA (217, 218).

Por otro lado, la vía del indol 3 acetamida (IAM), también involucrada en la producción de AIA, está muy bien caracterizada tanto en bacterias patógenas como en simbioses de plantas (218). El paso de conversión de triptófano (Trp) a AIA se da en 2 etapas, la primera es llevada a cabo por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (*iaaM*) y la segunda por la enzima IAM hidrolasa (*iaaH*). En ese sentido el análisis de los datos mostró que el genoma de la cepa UYSB45 posee también las posibles secuencias codificantes para ambas enzimas (*iaaH* y *iaaM*) (Figura C y D).

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados podríamos especular que ambas vías (IPA y IAM) las cuales están completas, en el genoma de la cepa *P. dispersa* UYSB45, serían las principales vías involucradas en la síntesis de AIA. Esto concuerda con resultados obtenidos en otros trabajos, donde mediante un abordaje metagenómicos en rizobacterias asociadas a la raíz de *Setaria italica* (mijo), se determinó que las vías IAM y TPM están ampliamente distribuidas en este grupo bacteriano y son las vías principalmente utilizadas para la producción de AIA (Figura C) (218). En trabajos previos, la cepa UYSB45 mostró producción de AIA *in vitro* en las condiciones ensayadas, siendo una evidencia más de su posible mecanismos de PCV (116).

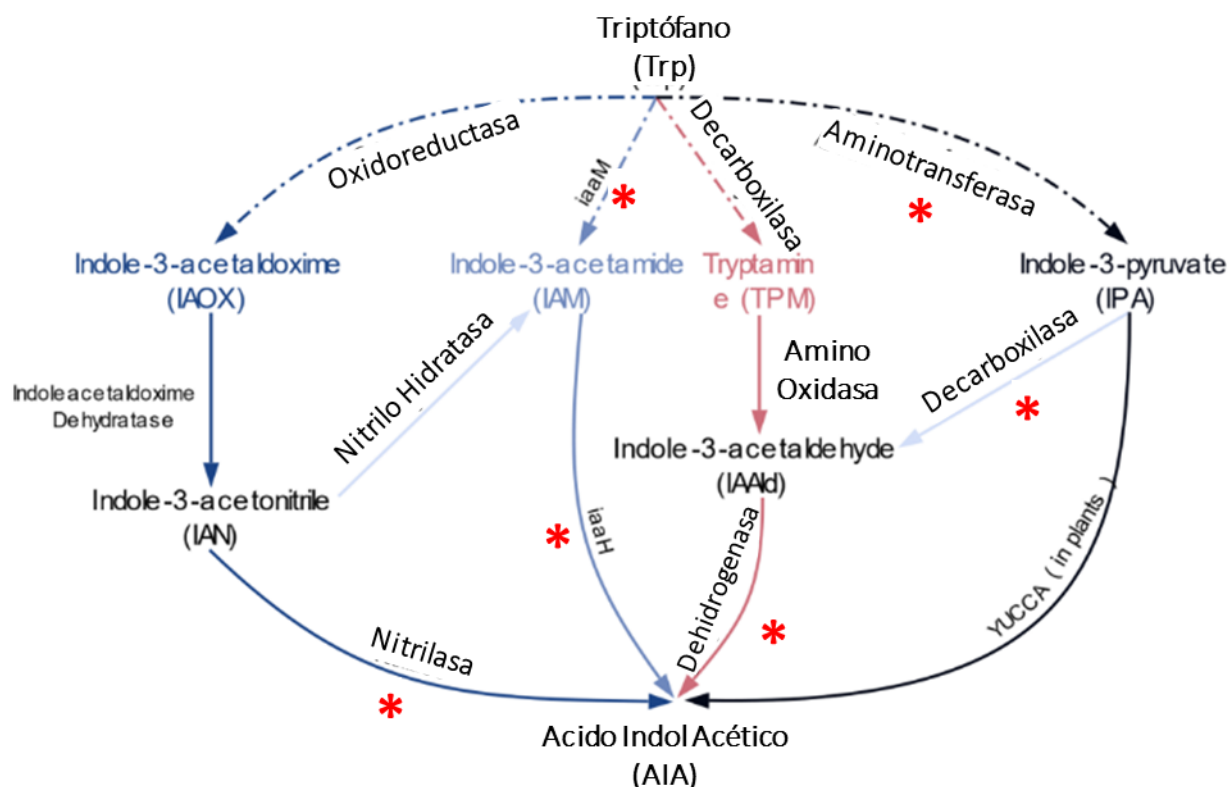


Figura C: Principales vías de síntesis de AIA bacteriano dependientes de Trp. Se representan diferentes caminos con diferentes colores. Por un lado se representa el primer paso de la síntesis de AIA: la catalización de Trp (líneas discontinuas), la segunda parte representa la síntesis de AIA a partir de Trp y la tercera parte representa la síntesis de AIA a partir de intermediarios (IPA, IAM, TPM, IAN). Los * marcan los genes que se encontraron en la cepa UYSB45 (tabla A12, Anexo II). Adaptado de (218).

Por otro lado, también se identificó en el genoma de la cepa UYSB45, un posible gen codificante para una nitrilasa, enzima necesaria para la conversión de Trp a AIA por la vía de IAN y IAOX (Figura C). Sin embargo, no se identificaron los ortólogos de los genes bacterianos necesarios para las primeras 2 etapas de esta vía, una oxidorreductasa y una indolacetamida dehidratasa respectivamente. Esto puede deberse a que las secuencias son demasiado divergentes o que la estrategia para producir el primer intermediario (IAOX) en bacterias es bastante diferente al de plantas (218).

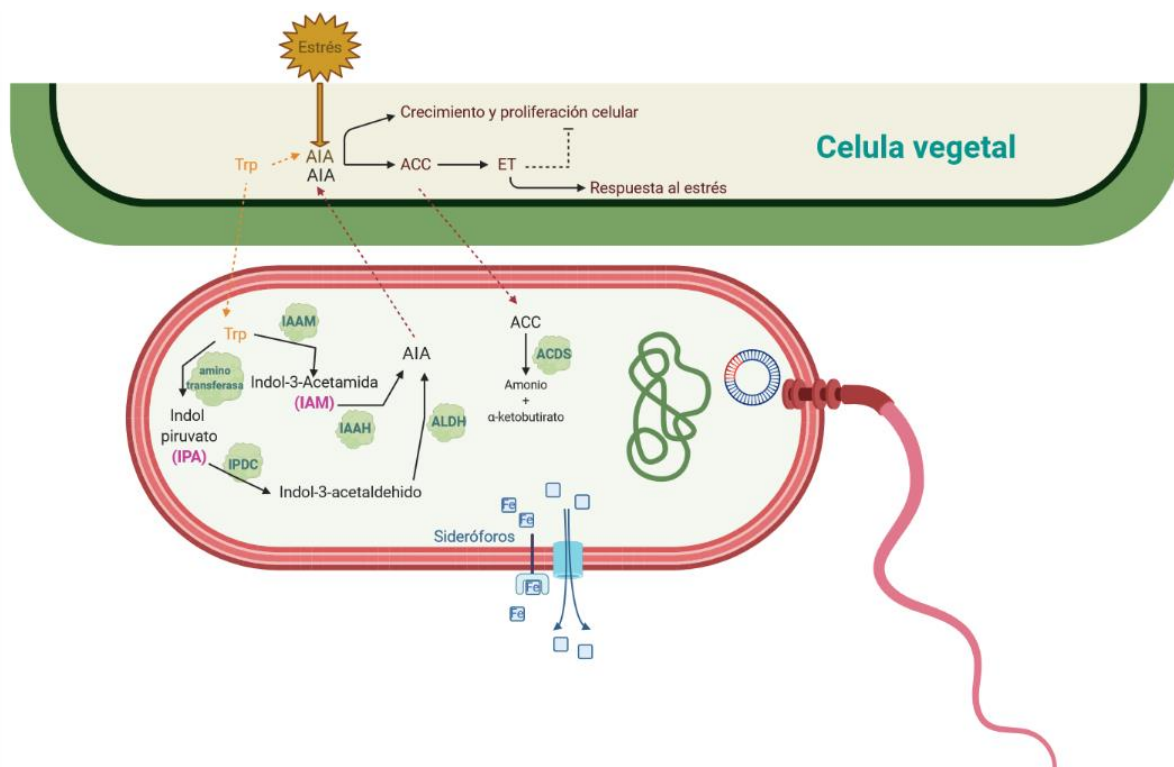


Figura D: Representación esquemática de algunos de los genes relacionados a la capacidad PCV identificados en el genoma de la cepa *P. dispersa* UYSB45. Producción y regulación de fitohormonas (tabla A12), producción de sideróforos (tabla A13). Creado con BioRender.com.

Además de su participación en la promoción del crecimiento vegetal, el AIA también juega un papel importante en la fisiología microbiana actuando como molécula de señalización (219). La sobreproducción de AIA en *Sinorhizobium meliloti* RD64 le confiere resistencia a diversos agentes estresantes, como los rayos UV y alta salinidad (219). Según lo discutido, la producción de AIA en esta cepa previamente reportada, así como el análisis genómico de UYSB45 sugiere que la producción de esta hormona podría estar cumpliendo una función de modulación de hormonas vegetales así como de señalización bacteriana.

Otro de los rasgos bacterianos clave para promover el crecimiento de las plantas es la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Esta enzima es responsable de la escisión del precursor de etileno (compuesto) en amoníaco y α -cetobutirato (200). Por lo tanto, los microorganismos productores de ACC desaminasas disminuyen los niveles de etileno en plantas. Esta hormona, en altas concentraciones inhibe el crecimiento vegetal y en última instancia la senescencia vegetal (200). Análisis *in vitro* de la cepa UYSB45 demostraron la presencia de actividad ACC desaminasa (116). Cabe destacar que generalmente las ACC desaminasa bacterianas y fúngicas pertenecen a un gran grupo de desaminasas dependientes de fosfato de piridoxal (incluida la D-cisteína desulfhidrasa

bacteriana), que están relacionadas con la subunidad beta de triptófano sintasa y que comparten un origen común (220). En ese sentido se identificó en el genoma de la cepa UYSB45, un gen que codifica para la enzima D-cisteína desulfhidrasa (UYSB45.1834). Es por esto por lo que asumimos que el gen UYSB45.1834 aún anotado como una enzima D-cisteína desulfhidrasa, inferimos que se trata de la enzima ACC desaminasa.

Teniendo en cuenta en su conjunto los resultados obtenidos y la bibliografía consultada se presenta un probable modelo de modulación hormonal por la cepa *P. dispersa* UYSB45 (Figura D). En este modelo en una primera instancia, la bacteria colonizaría las raíces (tanto interna como externamente). Posteriormente, la producción y secreción de la hormona AIA, por la cepa UYSB45 contribuiría a la estimulación del crecimiento vegetal de las raíces. Por otro lado, la cepa UYSB45 podría también inducir la expresión del gen que codifica la enzima vegetal ACC sintasa, que convierte el precursor (SAM, S-adenosil metionina) en ACC en plantas (200). Una de las hipótesis plantea que esta molécula puede ser exudada por las raíces de las plantas y posteriormente ser absorbida por las bacterias presentes en la rizosfera y convertido por la acción de la enzima ACC desaminasa, en amoníaco y α -cetobutirato. De esta manera, la cepa UYSB45 al modular los niveles de ACC en los tejidos vegetales, reduciría el etileno producido por la planta evitando la senescencia vegetal (200).

b-Adquisición y metabolismo de Fe

Como la mayoría de los organismos, las bacterias necesitan hierro como cofactor de las enzimas necesarias para catalizar las reacciones redox, involucradas en procesos celulares fundamentales como la respiración, la síntesis de ADN y la protección contra especies reactivas de oxígeno (72). Con el fin de disponer del hierro necesario para su crecimiento y metabolismo, las bacterias sintetizan y secretan moléculas de unión a hierro de bajo peso molecular conocidas como sideróforos (200). Muchos de los sideróforos son péptidos sintetizados por miembros de la familia de las enzimas péptido sintetasa no ribosómica (NRPS), que también dirigen la síntesis de la mayoría de los antibióticos peptídicos microbianos (221). Por otro lado, varios sideróforos bacterianos no son polipéptidos, incluidos muchos de los de tipo hidroxamato, y se sintetizan en base a mecanismos independientes de NRPS, entre ellos la aerobactina (222). Por su parte los sideróforos del tipo catecol (ej enterobactina), que unen el Fe de forma más fuerte que los hidroxamatos o carboxilatos, son comunes en los sideróforos bacterianos (72). La vía propuesta para la

producción de estos últimos en la cepa UYSB45 está esquematizada en la Figura 2.14, (Capítulo II). En el genoma de la cepa UYSB45, se identificaron varios genes posiblemente relacionados a la producción y adquisición de sideróforos, incluyendo los del tipo vibriobactina y aerobactina, pero ambas incompletas. Estas vías también han sido propuestas en otras bacterias endófitas como *A. olearius* BH72 y *H. seropedicae* SmR1 (223, 224).

En cuanto al sideróforo del tipo catecol y teniendo en cuenta la presencia de la vía completa para la síntesis de enterobactina en el genoma de la cepa UYSB45, además de la evidencia *in vitro* de producción de sideróforos, se realizó una mutante en el gen *entF*. Este gen codifica para el componente F de enterobactina sintetasa, involucrado en la biosíntesis de este sideróforo.

Para la construcción de la mutante se realizó una interrupción en el marco de lectura de dicho gen mediante recombinación homóloga (Figura 2.2). Los resultados mostraron la escisión exitosa del gen *entF* y por lo tanto la exitosa construcción de la cepa mutante *Pantoea* sp. UYSB45 $\Delta entF$ (Figura 2.16B).

Sin embargo, la caracterización fenotípica *in vitro* de dicha mutante no fue concluyente ya que no se logró confirmar la pérdida de la función (ausencia de producción de sideróforos) con los métodos empleados. Esto podría estar explicado por no ser la única vía de producción de sideróforos presente en el genoma de la cepa UYSB45.

Conclusiones

Análisis fisiológicos y genómicos mostraron que la cepa *P. dispersa* UYSB45, presenta diferentes mecanismos PCV los cuales podrían estar relacionados a la PCV observada al ser inoculada a plantas de sorgo dulce. Entre ellos se encuentra la capacidad de producir AIA, expresar la enzima ACC desaminasa y producir sideróforos. Se obtuvieron únicamente cepas UYSB45 mutantes en la vía metabólica que codifica para la síntesis de sideróforos del tipo catecoles. Sin embargo la caracterización de dicha mutante no fue concluyente.

En su conjunto las características identificadas *in vitro* e *in vivo* en la cepa UYSB45 la posicionan como una candidata prometedora para futuras aplicaciones biotecnológicas.

CAPÍTULO III: Infección y colonización de plantas de sorgo dulce por la cepa *Pantoea dispersa* UYSB45.

Objetivo:

Describir el proceso de colonización superficial, infección y colonización de los tejidos internos radiculares de plantas de sorgo dulce (cultivar M81E) por la cepa PCV *P. dispersa* UYSB45.

Estrategia

En este capítulo se plantea describir un modelo de infección y colonización para la cepa *P. dispersa* UYSB45 en interacción con plantas de sorgo dulce utilizando técnicas de microscopía confocal de fluorescencia (MCF), así como diferentes técnicas de biología molecular (Figura 3.1). Para esto, en primera instancia la cepa UYSB45 fue transformada con diversos plásmidos conteniendo genes codificantes para proteínas fluorescentes. Aquellas cepas transformadas exitosamente se inocularon en plantas de sorgo dulce (cultivar M81E) en condiciones *gnotobióticas*. Posteriormente se tomaron muestras y se analizaron secciones de raíces a diferentes tiempo post-inoculación utilizando MCF. Por último y de manera complementaria, se diseñaron cebadores específicos para la cepa UYSB45, se pusieron a punto las condiciones de qPCR y se realizó el recuento bacteriano específico en los tejidos internos de las plantas inoculadas.

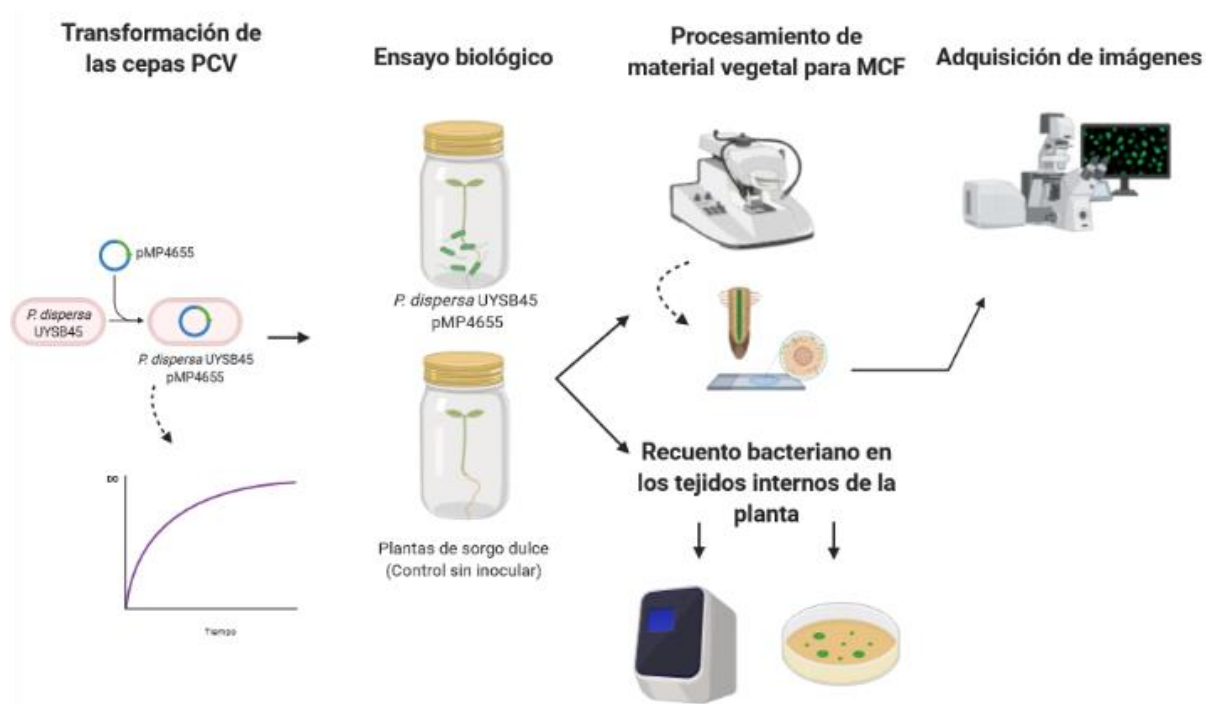


Figura 3.1: Esquema de la estrategia utilizada en el capítulo III. Cepas transformadas con el plásmido pMP4655 fueron inoculadas a plantas de sorgo dulce var. M81E para su estudio por microscopía. Las muestras vegetales fueron utilizadas tanto para la visualización por MCF como para el recuento bacteriano. Creado con BioRender.com.

El objetivo de este capítulo fue la descripción del proceso de colonización superficial, así como de infección y colonización de los tejidos internos radiculares por las cepas PCV *Rhizobium* sp. UYSB13 y *P. dispersa* UYSB45, en plantas de sorgo dulce (cultivar M81E). Sin embargo, la metodología utilizada para cumplir con este objetivo no permitió el avance de igual manera con ambas cepas, dado que la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 no cumplió con los estándares necesarios para seguir en los pasos siguientes.

Para lograr una lectura amena así como para facilitar la presentación de la metodología y resultados, se anexó al final del capítulo los resultados obtenidos para la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 (Sección II).

Materiales y Métodos

3.1 Marcado molecular de cepas

Mediante técnicas moleculares de conjugación biparental y electrotransformación se transformó la cepa UYSB45 con diferentes plásmidos que contienen los genes codificantes para proteínas fluorescentes (Tabla 3.2). Para esto se contó con información de trabajos previos, sobre las resistencias naturales a antibióticos que presenta la cepa a estudiar, las cuales se emplearán como marcadores para la selección de los plásmidos a utilizar (Tabla 3.1) (116).

Tabla 3.1: Concentraciones máximas de antibióticos ensayadas (µg/ml)

Cepa	Str ₁₀₀	Spc ₁₀₀	Km ₁₀₀	Tc ₁₀₀	Gm ₁₀₀	Nm ₂₅	Amp ₁₀₀	Poly ₁₀₀	Nal ₁₀₀
<i>P. dispersa</i> UYSB45	+	+	-	-	+	+	+	-	-

Gentamicina (Gm), Kanamicina (Km), Neomicina (Nm), Estreptomicina (Str), Espectinomicina (Spc), Ampicilina (Amp), Polymixina B (Poly), Tetraciclina (Tc) y Ácidonalidíxico (Nal)

3.1.1 Preparación de células competentes

En primera instancia se prepararon células competentes de las cepas *Escherichia coli* S17.1 λpir y *P. dispersa* UYSB45. Para esto, dichas cepas fueron crecidas en medio líquido LB a 37°C, y 30°C respectivamente, durante 24 horas. Una dilución 1/100 de cada uno de los cultivos bacterianos mencionados fue inoculado independientemente en un nuevo matraz conteniendo 200 ml de medio líquido LB. Dichos matraces se crecieron a la temperatura correspondiente hasta obtener una D.O.₆₂₀ de 0,2 en el caso de la cepa *E. coli* S17.1 λpir y una D.O.₆₂₀ de 0,6 para la cepa *P. dispersa* UYSB45. Posteriormente la cepa *E. coli* S17.1 λpir fue centrifugada a 4°C y 3.000 g por 10 min. El pellet celular obtenido fue resuspendido en 20 ml de una solución de CaCl₂ 0,1M y centrifugado en las mismas condiciones, repitiendo este último paso dos veces. Finalmente el pellet se resuspendió en 0,5 ml de una solución de CaCl₂ 0,1M suplementado con glicerol 15% y mantenido a 4°C durante la noche.

Por otro lado, la cepa *P. dispersa* UYSB45 se lavó con 40 ml de H₂O destilada estéril, centrifugándose a 4°C y 3.000 g por 10 min y resuspendiéndose en 40 ml de glicerol 15%. Por último, la suspensión se centrifugó a 4°C y 3.000 g por 25 min.

Ambos sobrenadantes fueron descartados y las células suspendidas en el glicerol residual (225). Durante la preparación de las células competentes todas las muestras se mantuvieron a 4°C.

A partir de cada suspensión final se tomaron alícuotas de 100 µl (*E. coli* S17.1 λpir) o 35 µl (*P. dispersa* UYSB45) las cuales fueron guardadas a -80 °C.

Para la obtención de la cepa *P. dispersa* UYSB45 transformadas con los plásmidos conteniendo los genes codificantes para las proteínas fluorescentes (Tabla 3.2), se realizaron dos aproximaciones: conjugación biparental y electrotransformación. Las utilizadas en esta tesis fueron: eGFP, eCFP, eYFP y DsRed (226).

Tabla 3.2: Plásmidos y cepas utilizados en este trabajo

Plásmidos	Resistencia a antibiótico	Reportero ⁺	Promotor	Referencia
pMP4655	Tc	eGFP	Constitutivo	(226)
pMP4641	Tc	eCFP	Constitutivo	
pMP4658	Tc	eYFP	Constitutivo	
pMP4662	Tc	RFP	Constitutivo	
pSEVA238M	Km	msfGFP	Inducible (3MB) *	(162)
pSEVA247Y	Km	YFP	Constitutivo	
Cepas				
<i>Escherichia coli</i> S17.1 λpir				(160)
<i>P. dispersa</i> UYSB45				(116)

*3-metil benzoato (3MB) *enhanced GFP (eGFP), enhanced cyan fluorescent protein (eCFP), enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) y la red fluorescent protein (DsRed) (226).

3.1.2 Transformación de la cepa UYSB45 mediante conjugación biparental con la cepa *E. coli* S17.1 λpir

Se utilizó como cepa donadora, la cepa *Escherichia coli* S17.1 λpir que cuenta con la maquinaria molecular necesaria para la conjugación así como los distintos plásmidos a incorporar. Las cepas fueron crecidas en medio líquido LB a 37°C (*E. coli* S17.1 λpir conteniendo el plásmido de interés) y 30°C (*P. dispersa* UYSB45) hasta alcanzar una D.O.₆₂₀ de 0,3. Luego, 1 ml de cada cultivo fue centrifugado de forma independiente a 5000g por 10 minutos para luego ser lavado 2 veces con 1 ml de medio de cultivo LB. El pellet fue resuspendido en 1 ml del mismo medio de cultivo.

Con la finalidad de lograr la relación óptima para la conjugación, se realizaron distintas combinaciones entre las cepas, la cual fueron plaqueadas en placas conteniendo medio de cultivo LB. Las conjugaciones fueron incubadas durante 24 horas a 30°C, repicadas a una nueva placa con medio de cultivo LB conteniendo los antibióticos correspondientes para la selección del plásmido (Km₅₀ y Nf₁₀₀), y en el caso correspondiente con el inductor (3MB). Dichas placas fueron incubadas nuevamente a 30°C seleccionándose aquellas colonias transconjugantes que fluorescen en exposición a la luz ultravioleta (U.V.).

3.1.3 Electrotransformación de células competentes

En una primera instancia, 35 µl de células competentes de la cepa *P. dispersa* UYSB45 junto a 15 µl de glicerol 15% y ADN plasmídico (Tabla 3.2) se incubaron en hielo durante 30 min. Luego, dichas células competentes incubadas con los distintos plásmidos fueron colocadas en una cuba de 1 mm y sometidas al programa de choque eléctrico para *Agrobacterium*: 350 V de descarga eléctrica y 330 µF de capacitancia en MicroPulser (BIO-RAD) (225). Las células fueron recuperadas en 1 ml de medio de cultivo LB e incubadas a 30 °C por 2 horas. Por último, una alícuota de cada cultivo bacteriano se inoculó en placas conteniendo medio de cultivo LB suplementado con los antibióticos correspondientes para la selección del plásmido e inductor (en caso de que corresponda), incubándose a 30°C durante 24 horas. Se seleccionaron como colonias que adquirieron el plásmido, aquellas en las que se observó fluorescencia al exponerlas a luz U.V.

3.1.4 Verificación de la transformación

Para verificar el proceso de transformación y la correcta incorporación de los plásmidos en las cepas en estudio, se realizaron una serie de corroboraciones.

En primera instancia se realizó la extracción de ADN plasmídico de la cepa *P. dispersa* UYSB45 con el PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™), según las indicaciones del fabricante. La presencia del plásmido se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) siguiendo el protocolo utilizado en la Sección 2.3.1. Posteriormente, el plásmido fue extraído de la cepa *P. dispersa* UYSB45 y transformado en la cepa *E. coli* S17.1 λpir, verificándose la transformación por la obtención de colonias fluorescentes y Km^R cuando son expuestas a luz U.V.

3.1.5 Evaluación del crecimiento de la cepa UYSB45 marcada en distintos medios de cultivo.

Con el fin de evaluar si las construcciones obtenidas afectaron la capacidad de crecimiento de las cepa transformadas, se evaluó su crecimiento en medios de cultivo rico TSB y definido LGI. El ensayo se hizo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Para esto se inocularon 1x10⁶ células de las cepas *P. dispersa* UYSB45 y *P. dispersa* UYSB45 4655 (transformante conteniendo el plásmido pMP4655), en pocillos conteniendo 200 µl de los distintos medios a ensayar (LGI y TSB) como se explicó en la Sección 2.4.7.1.

3.2 Estudio del proceso de colonización e infección de las raíces de plantas de sorgo dulce var. M81E, por las cepas transformantes *P. dispersa* UYSB45 4655 y *P. dispersa* UYSB45 4662

Una vez obtenidas las cepas transformadas (Sección 3.1), se puso a punto las condiciones para el ensayo *gnotobiótico* en el cual se inocularon plantas de sorgo dulce a partir de las cuales se analizaron cortes de raíces por MCF y se cuantificó por qPCR y recuento en placa la cepa inoculada en los tejidos de la planta (Figura 3.2).

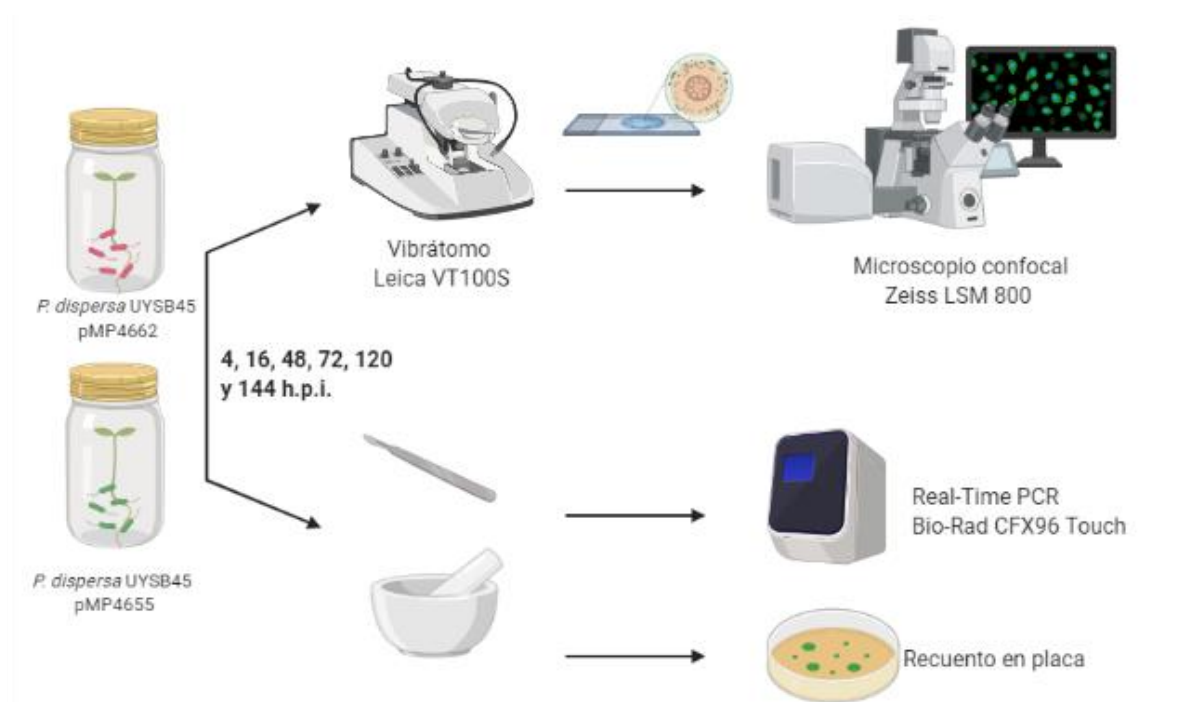


Figura 3.2: Esquema de la estrategia utilizada en esta sección. Las cepas transformadas fueron utilizadas para la inoculación y el estudio por microscopía, así como para recuento bacteriano. Creado con BioRender.com.

3.2.1 Inoculación de plantas de sorgo dulce cultivar M81E, con las cepas transformantes en estudio

En primera instancia se realizó la esterilización de la superficie de las semillas mediante un enjuague de 5 min con EtOH 70% (v/v), seguido de un lavado con agua desionizada estéril y una incubación de 15 min con hipoclorito de sodio 4% (v/v). Posteriormente las semillas se enjuagaron 4 veces con agua desionizada estéril para posteriormente germinarse en placas de agar-agua 0,8% (p/v), a 30°C durante 48 h. El control de esterilidad se realizó mediante el rolado de 20 semillas en placas con medio de cultivo TSA, incubándose también por 48hs. Se considero una desinfección exitosa cuando no se observaron colonias bacterianas en la placa

control. Luego dos semillas germinadas fueron transferidos a frascos conteniendo 15 ml de medio Jensen líquido (227) utilizando como soporte bolitas de polipropileno. Cada semilla germinada fue inoculada con una suspensión de 1×10^7 células/ml de la cepa transformada a ensayar.

Los ensayos se realizaron en condiciones de luz y temperaturas controladas: fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 25°C. Las plantas se cosecharon a los tiempos 4, 16, 48, 72, 120 y 144 horas post inoculación (h.p.i.), separando la raíz de la parte aérea. Una de las plántulas se utilizó para los estudios de microscopia y la otra para los recuentos bacterianos. Se utilizaron 6 réplicas por tratamiento, empleándose como control negativo plantas de sorgo dulce sin inocular.

3.2.2 Estudio de la localización de la cepa *P. dispersa* UYSB45 transformada en los tejidos internos de las plantas de sorgo dulce por Microscopia Confocal de Fluorescencia (MCF)

Para la detección de las cepas *P. dispersa* UYSB45 4655 (GFP) y *P. dispersa* UYSB45 4662 (RFP) dentro de los tejidos internos de las plantas de sorgo dulce, en primera instancia el material vegetal de 6 réplicas biológicas distintas fue cosechado a los distintos tiempos previamente mencionados, para luego ser lavado y seccionado con bisturí en porciones de 0,5-1 cm. El estudio de localización se realizó únicamente en la raíz, ya que no se logró ajustar la metodología para la zona aérea debido a la gran cantidad de autofluorescencia del material vegetal. Los trozos de raíces se colocaron en moldes de silicona de 0,5x1,0x0,5 cm, en orientación transversal y longitudinal y se embebieron en agarosa 4%. Los bloques resultantes se cortaron en láminas de 30 a 80 μm de grosor en un vibrátomo (Leica VT100S, Alemania) a velocidad 3 y frecuencia de vibración de 6. Las láminas obtenidas en el vibrátomo fueron colocadas en un portaobjeto y cubiertas con un cubreobjeto para su visualización por MCF. Por cada muestra se obtuvieron 10 láminas en ambos sentidos, transversal y longitudinal. El control negativo, fueron raíces de plantas sin inocular las cuales fueron procesadas de igual manera.

Para la adquisición de las imágenes, los preparados se observaron en un microscopio Zeiss, Modelo LSM 800 (Jena-Alemania) con un módulo AiryScan integrado, de la plataforma de Microscopía del IIBCE. Las imágenes se tomaron con objetivos 40X utilizando el escaneo en secuencia con 3 canales independientes: un canal transmitido con un detector ESID para

visualizar la morfología del tejido vegetal, una configuración Alexa fluor 546 para detectar la señal de bacterias transformadas (la detección de la emisión de la proteína GFP es entre 480 - 530 nm), y una detección de emisión de rojo lejano para ver la auto fluorescencia de la planta (la detección de rojo lejano fue entre 600 - 700 nm). Los valores del láser, el fotomultiplicador y la intensidad del láser no fueron alterados entre los distintos tratamientos.

Para fraccionar los distintos planos del corte de raíz, la posición del enfoque se movió en profundidad en el plano y en secciones de a 1 mm, produciendo imágenes con z-stack de la misma área xy. Por z-stack se entiende a un conjunto de imágenes confocales tomadas de la muestra de modo que el área de la imagen a lo largo de los ejes x e y permanece igual, pero la distancia desde el objetivo (eje z) es diferente para cada imagen. Como la distancia entre imágenes adyacentes se controla con precisión en la z-stack se puede utilizar para formar una imagen tridimensional.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa de edición de imagen Image J software (228).

3.2.3 Diseño de cebadores específicos para el recuento bacteriano de las cepas en estudio en los tejidos internos vegetales

Para cuantificar la cepa inoculada en los tejidos internos de las plantas inoculadas, se realizaron ensayos de qPCR empleando cebadores específicos a partir de las secuencias nucleotídicas del gen *16S ARNr* de la cepa *P. dispersa* UYSB45.

Los cebadores fueron diseñados con los programas Primer 3 e IDT Primer Quest Primer Design Tool (229). Para ello, el software busca regiones con secuencias únicas evaluándose oligonucleótidos que cumplieran con las siguientes características: 40-70 % de porcentaje GC, 40-62 °C de temperatura de hibridación (TM) y 100-150 pb de tamaño de amplicón. Para la selección final de los mismos se consideró la especificidad y la probabilidad de que los oligonucleótidos formaran estructuras secundarias no deseadas.

La especificidad de los cebadores fue evaluada *in silico* utilizando bases de datos públicos y propios incluyendo BLAST/NCBI, MFEprimer-2.0 (230) y MEGA 5 (231). El programa MEGA 5 se utilizó para estudiar el alineamiento del amplicón teórico con el genoma de cepas *Pantoea* spp. provenientes de la colección de aislamientos asociadas a plantas de sorgo dulce (116).

Una vez chequeada la especificidad *in silico*, se realizó la puesta a punto de los ensayos de qPCR a partir de las muestras de ADN de las siguientes cepas: *Azospirillum brasilensis* Sp7,

Pseudomonas putida KT2440, *P. dispersa* UYSB45, *Rhizobium* sp. UYSB13 y por último una muestra de ADN (raíz y tallo) proveniente de plantas crecidas en una parcela de ensayo de campo inoculado con la cepa *P. dispersa* UYSB45.

3.2.4 Recuento bacteriano en los tejidos internos de plantas inoculadas con la cepa *P. dispersa* UYSB45

El recuento bacteriano se realizó por medio de dos aproximaciones, una independiente de cultivo mediante la técnica de qPCR; y la otra dependiente de cultivo mediante la técnica de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) fluorescentes en placas de Petri.

Para la detección y recuento bacteriano de la cepa *P. dispersa* UYSB45, se partió del mismo material vegetal empleado para el estudio de microscopía. A partir del mismo, las raíces fueron lavadas y cortadas en porciones de 0,5-1 cm para su posterior procesamiento.

En la aproximación independiente de cultivo, la extracción de ADN de las raíces se realizó usando el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.), purificándose mediante precipitación con isopropanol. El ADN obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific) y su calidad evaluada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (p/v) siguiendo el protocolo utilizado en la Sección 2.3.1 En esta aproximación se emplearon los cebadores diseñados en este trabajo (sección 3.2.3, tabla 3.4), realizándose la reacción de qPCR en el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad) utilizando la aproximación SYBR Green. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: 12,5 µl de iQSYBR Green Supermix (Bio-Rad), 1µM de cada cebador, de 4 a 25 ng de ADN molde, y H₂O c.s.p. 25µl. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 50-62°C y 30 seg a 72°C. Para cada reacción se realizaron controles negativos sin el agregado de ADN y tres replicas técnicas por cada replica biológica.

La especificidad del producto fue confirmada mediante análisis de la curva de disociación (62–95°C, 0.5 °C por lectura, 5 s hold), y por la visualización del producto mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (p/v) siguiendo el protocolo utilizado en la Sección 2.3.1 Los datos se analizaron en el software BIORAD CFX Manager 3. 1.

Para la curva estándar, las concentraciones en masa de ADN se convirtieron en concentraciones de copia utilizando la siguiente ecuación (135):

$$ADN \text{ (copia)} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ copia. mol}^{-1} \times \text{cantidad de ADN (g)}}{\text{largo de ADN (pdb)} \times 660 \text{ (g. mol. pdb)}^{-1}}$$

donde el número de Avogadro que es $6,02 \times 10^{23}$ corresponde al número de copias del gen, siendo el peso molecular promedio de un pb de ADN de 660 g/mol. Tanto el largo del ADN del genoma, como el número de copias del gen (expresado como cantidad de ADN en la formula), eran datos conocidos a partir de la información obtenida del genoma de *P. dispersa* UYSB45 (Sección 2.6). El número de copias de cada muestra problema se halló extrapolando a partir de la curva estándar, empleándose triplicados para cada corrida de la curva. Los resultados se expresaron en número de copias de gen/g de raíz fresca (ncg.grf)⁻¹.

Por otro lado, se realizó un abordaje dependiente de cultivo mediante el recuento bacteriano de bacterias fluorescentes en placas de Petri. Para ello se utilizó como material de partida, el material vegetal de la sección 3.2.1. Luego del lavado, las muestras vegetales fueron maceradas en 1 ml de NaCl 0,9% (p/v) realizándose diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) a partir de las cuales se tomaron 100µl, los cuales fueron sembrados por triplicado, en placas conteniendo medio de cultivo TSA suplementado con Tc 25 µg/ml y Amp 100 µg/ml. Las placas se incubaron durante 24 hs a 30°C y las colonias fluorescentes se contaron bajo luz UV.

Los resultados se expresaron mediante el unidades formadoras de colonias/g de raíz fresca (ufc.grf)⁻¹.

Resultados

Modelo bacteriano: *P. dispersa* sp. UYSB45

3. 3 Infección y colonización de los tejidos internos de plantas de sorgo dulce cultivar M81E por la cepa *P. dispersa*. UYSB45

3.3.1 Obtención de cepas *P. dispersa* UYSB45 marcadas con plásmidos reporteros

A partir de trabajos previos se conocía la resistencia o sensibilidad de la cepa *P. dispersa* UYSB45 a los antibióticos Km y Tc (tabla 2.1). Asimismo, en este trabajo se determinó la resistencia natural a Nitrofurantoina (Nf) 100 µg/ml y a Cloranfenicol (Cf) 25 µg/ml. Con esta nueva información, se ensayaron variantes en los protocolos de transformación bacteriana, obteniéndose transformantes en dicha cepa.

Como resultado de la estrategia realizada la cepa UYSB45 fue transformada exitosamente con los plásmidos pMP4655, pMP4641, pMP4658, pMP4662 y pSEVA238M utilizando la electrotransformación para todos los plásmidos y la conjugación biparental para el último nombrado (tabla 3.3, Figura 3.3).

Tabla 3.3: Transformantes obtenidas

Plásmidos	Reportero	<i>P. dispersa</i> UYSB45
pMP4655	eGFP	•
pMP4641	eCFP	•
pMP4658	eYFP	•
pMP4662	RFP	•
pSEVA238M	msfGFP	•
pSEVA247Y	YFP	

• obtención de transformante

La incorporación de los plásmidos en todos los casos fue corroborada mediante. 1- la selección de colonias resistentes a los antibióticos correspondientes según el plásmido utilizado; 2- la selección de colonias fluorescentes bajo luz UV y 3- la extracción del plásmido y su visualización por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v).

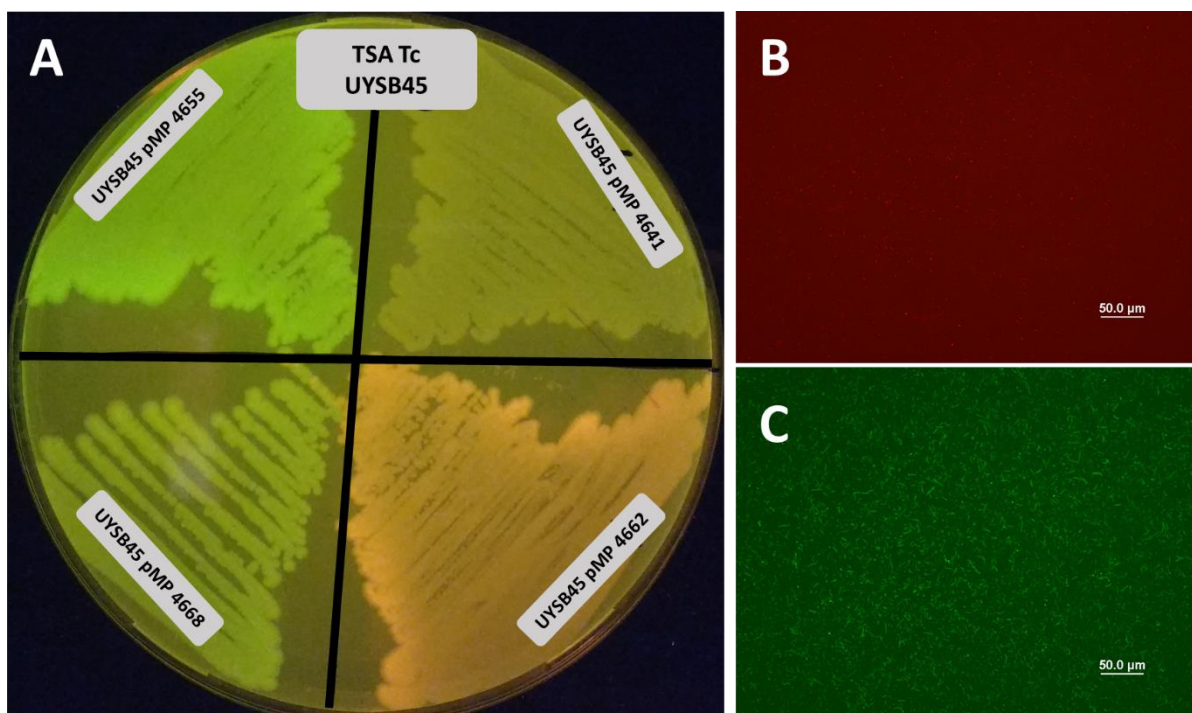


Figura 3.3: Confirmación del marcado de la cepa *P. dispersa* UYSB45 A: Colonias visualizadas bajo exposición de luz UV transformadas con los plásmidos pMP4655, pMP4641, pMP4658 y pMP4662. B: Cultivos O.N (crecidos durante la noche) de la cepa *P. dispersa* UYSB45 observados por microscopía de epifluorescencia transformada con el plásmido pMP4662 y C: con el plásmido pMP4655

Con relación a la incorporación del plásmido pSEVA247Y, se realizó un paso extra de verificación. Con ambas metodologías de transformación (conjugación biparental y electrotransformación) se obtuvieron colonias transformantes Km^R pero no fluorescentes a la exposición con luz UV. Por esto, se verificó la presencia del plásmido pSEVA247Y en la cepa estudiada realizándose la extracción plasmídica de las colonias Km^R no fluorescentes y el plásmido extraído fue utilizado para la transformación de células competentes de *E. coli* S17.1 λpir. En esta oportunidad se obtuvieron colonias de *E. coli* Km^R y fluorescentes bajo luz UV. A partir de estos resultados se concluyó que el plásmido pSEVA247Y no es funcional en la cepa *Pantoea* sp. UYSB45; por lo que no fue utilizado en los ensayos posteriores.

Por otro lado, también se contaba con la cepa transformada con el plásmido pSEVA238M (tabla 3.3). Para determinar que la construcción efectivamente fuera funcional para el estudio de colonización en planta, se realizó un ensayo en condiciones *gnotobióticas*. La cepa UYSB45 transformada con el plásmido pSEVA238M fue inoculada en plantas de sorgo dulce. Al momento de la inoculación bacteriana, también se realizó el agregado del inductor 3MB al medio de cultivo de plantas Jensen. Para determinar el recuento en placa, las plantas se cosecharon a los tiempos 4, 16 y 48 h.p.i. donde no se obtuvieron colonias fluorescentes a la

exposición con luz UV. Con estos resultados, concluimos que esta cepa transformada tampoco era óptima para ser utilizada en los ensayos posteriores.

En conclusión y dado los resultados obtenidos así como las características del microscopio a ser utilizado, se decidió continuar trabajando con las construcciones *P. dispersa* UYSB45 4655 y *P. dispersa* UYSB45 4662.

Para determinar si la presencia del plásmido tiene algún efecto sobre el crecimiento de la cepa UYSB45 modificada, se realizaron curvas de crecimiento de la cepa transformante *P. dispersa* UYSB45 a ser utilizada en los ensayos de colonización bacteriana en plantas de sorgo (Figura 3.4).

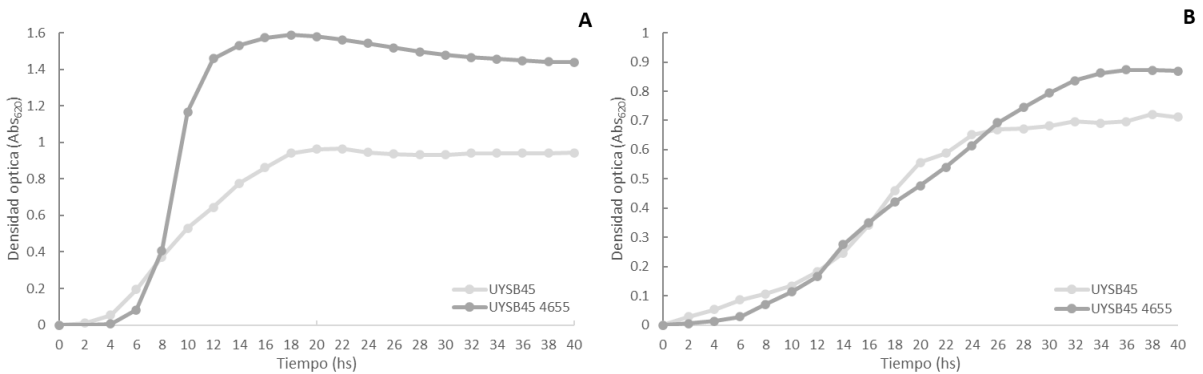


Figura 3.4: Curvas de crecimiento de las cepas *P. dispersa* UYSB45 y *P. dispersa* UYSB45 4655 en medios de cultivos: (A) TSB (B) LGI.

Según las gráficas obtenidas, cuando se creció la cepa transformada en medio rico TSB se observó una D.O. máxima de 1,58 a las 20 hs, mientras que la máxima D.O. alcanzada por la cepa sin el plásmido fue de 0,96 en el mismo tiempo. El mismo comportamiento es detectado cuando se realiza la curva de crecimiento en el medio LGI; a las 40 horas alcanzó una D.O. de 0,87 y 0,69 en las cepas marcada y sin marcar respectivamente.

Por otro lado, al comparar los tiempo de generación (*g*) entre en los distintos medios y entre las cepas con y sin plásmido se observó que el *g* en la cepa transformada con el plásmido es la mitad en comparación a la sin transformar en ambos medios de cultivo ensayados (tabla 2.4). La relación se mantiene entre los medios de cultivo comparados.

Tabla 3.4: Tiempo de generación(*g*) para las condiciones y cepas ensayadas

Cepas	Medios de cultivo (h)	
	TSB	LGI
<i>P. dispersa</i> UYSB45	0.98	2.52
<i>P. dispersa</i> UYSB45 4655	0.51	1.52

3.3.2 Localización de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en los tejidos internos de plantas de sorgo dulce

Para esto, se inocularon las cepas *P. dispersa* UYSB45 4655 (GFP) y *P. dispersa* UYSB45 4662 (RFP) a plantas de sorgo dulce del cultivar M81E en condiciones *gnotobióticas*. Las plantas se cosecharon a distintas h.p.i (4, 16, 48, 72, 120 y 144) y las raíces se analizaron por MCF.

En primera instancia se puso a punto el sistema para la visualización adecuada por MCF, comprobándose en primera instancia que las láminas de grosor óptimas eran las de 40 μm . Para la visualización por MCF con la cepa *P. dispersa* UYSB45 con los plásmidos 4662 (RFP) y 4655 (GFP), se realizó el procedimiento explicado en la sección 3.3.2. En las micrografías se observó que la intensidad de la fluorescencia obtenida a partir de las raíces inoculadas con la cepa UYSB45 conteniendo el plásmido RFP, era inferior y menos evidente que la obtenida con la cepa marcada con el plásmido con GFP. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió seguir los estudios de infección y colonización con la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655.

Los resultados de la micrografías mostraron que a las 4 h.p.i. se detectó la presencia bacteriana en la superficie radicular y en los espacios intercelulares de la raíz principal (Figura 3.5).

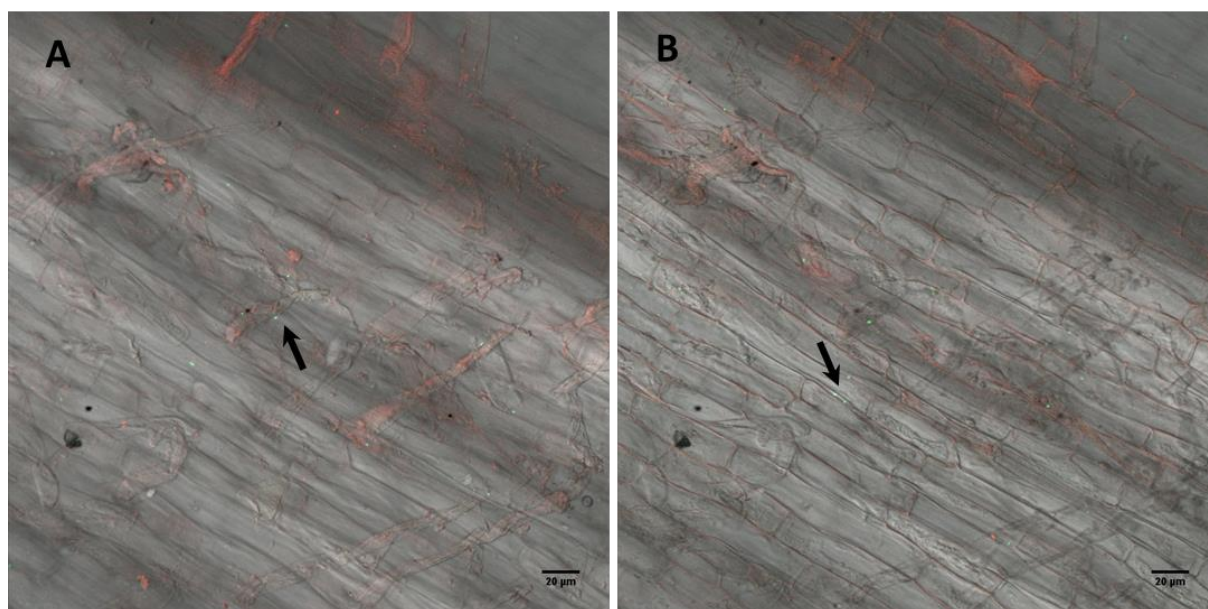


Figura 3.5: Colonización de la raíz principal de plantas de sorgo dulce por la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 a las 4 h.p.i. A: superficie radicular; B: tejidos internos radiculares. Magnificación 40X. La flecha indica las bacterias (puntos verdes). En rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la morfología vegetal.

Hacia las 16 h.p.i, se observó la presencia bacteriana en la superficie de la raíz, así como también en los espacios intercelulares del córtex de la raíz principal (Figura 3.6). Asimismo, mediante z-stack, se pudo observar la presencia de acúmulos bacterianos en los mismos lugares mencionados así como la colonización de la raíz en distintos planos (Figura 3.6).

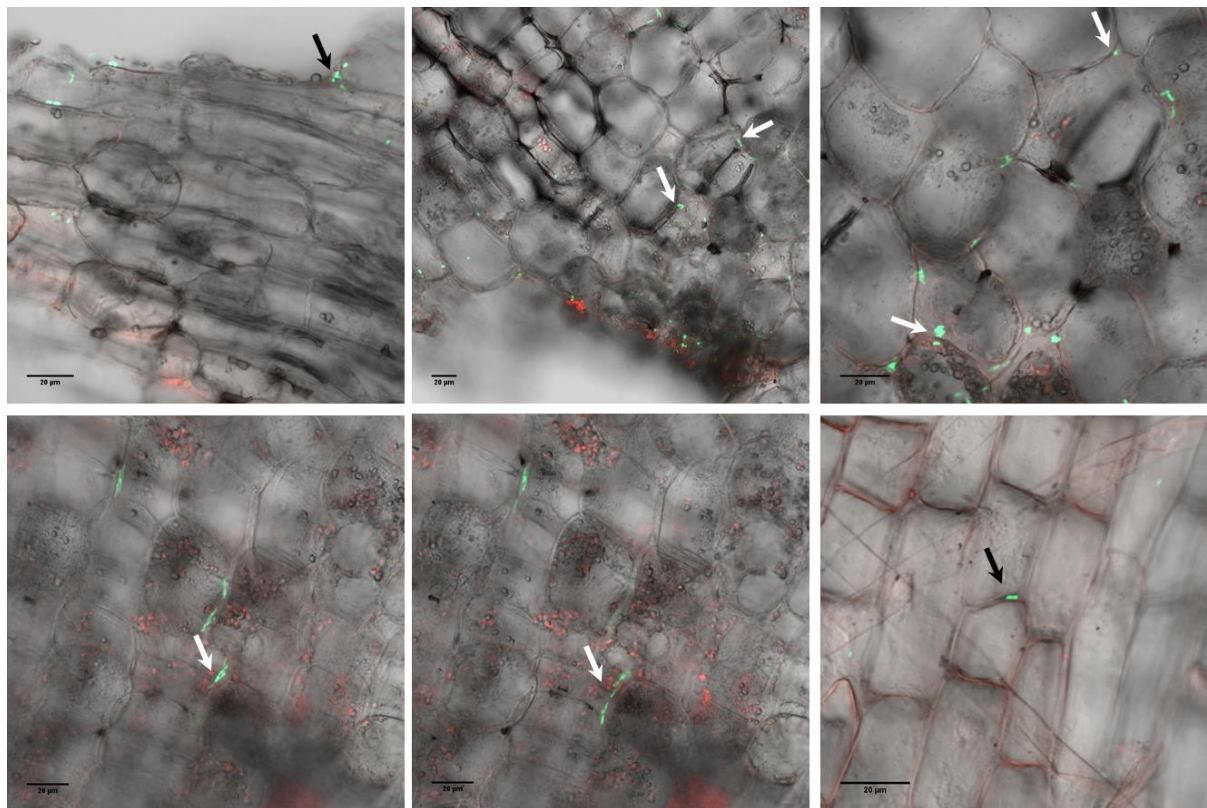


Figura 3.6: Colonización de la raíz principal de plantas de sorgo dulce por la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 a las 16 h.p.i. Magnificación 40X. La flecha indica las bacterias (puntos verdes). En rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la morfología vegetal.

A las 48 h.p.i (Figura 3.7) y a las 72 h.p.i (Figura 3.8) se observa un mayor número de bacterias en los espacios intercelulares del tejido radicular, así como una mayor dispersión en el tejido.

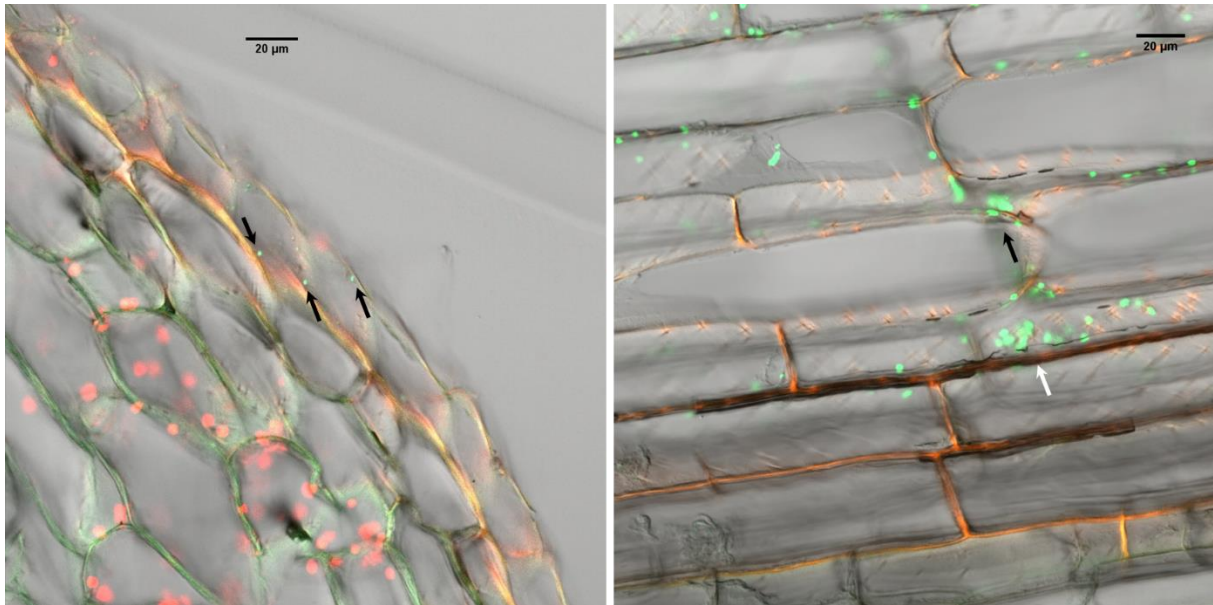


Figura 3.7: Colonización superficial e interna de raíces de sorgo dulce por la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 a las 48 h.p.i. Magnificación 40X. La flecha indica las bacterias (puntos verdes). En rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la morfología vegetal.

A las 72 h.p.i en cortes transversales del tejido radicular se observan células bacterianas adheridas a la zona de emergencia de los pelos radiculares (Figura 3.8A). También se observa la formación de biopelículas en la superficie radicular (Figura 3.8B). En el mismo tiempo y mediante la función z-stack, se observó la disminución de la densidad bacteriana a medida que las imágenes son obtenidas a partir de las capas más internas de la raíz (Figura 3.8B).

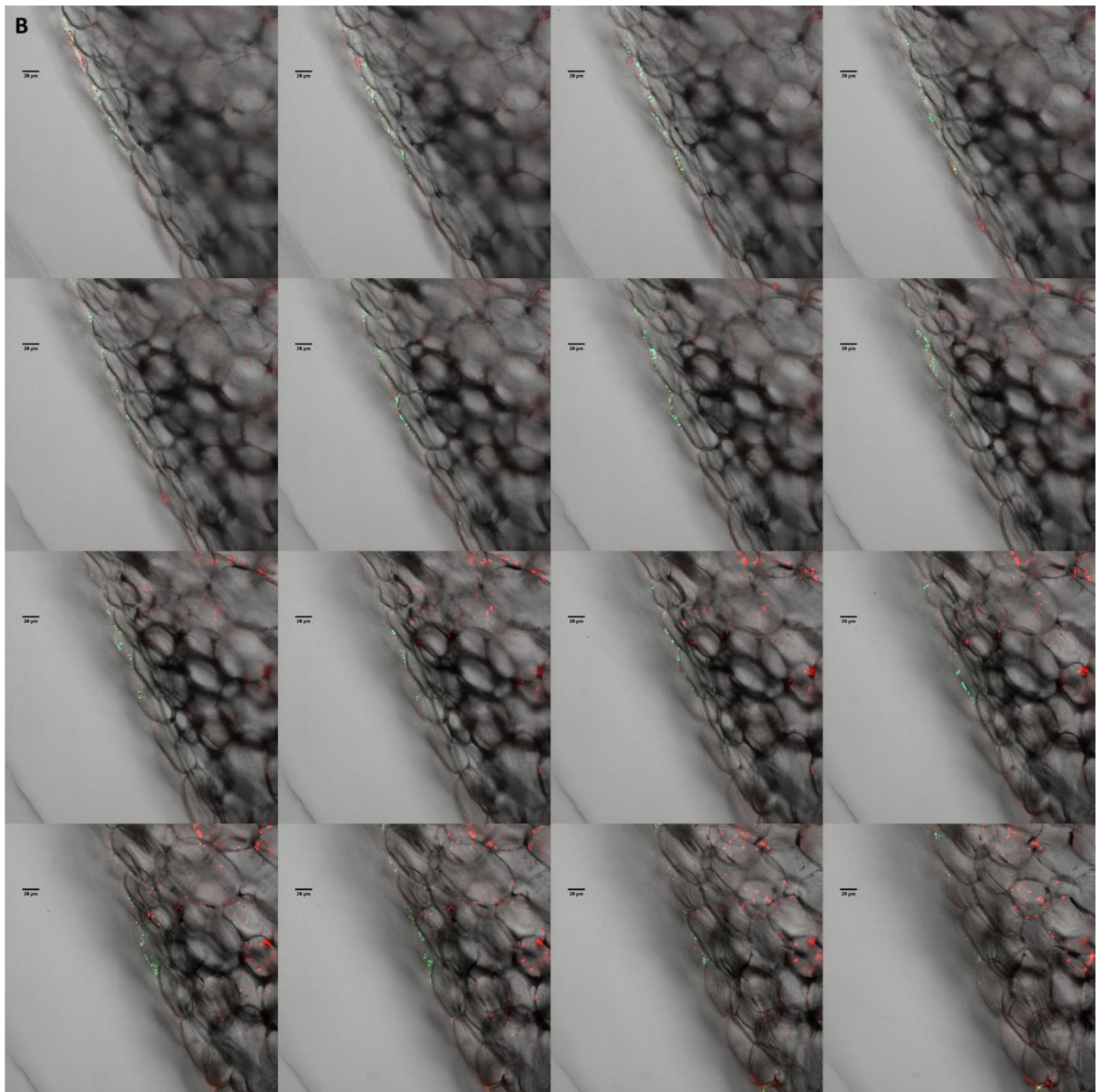
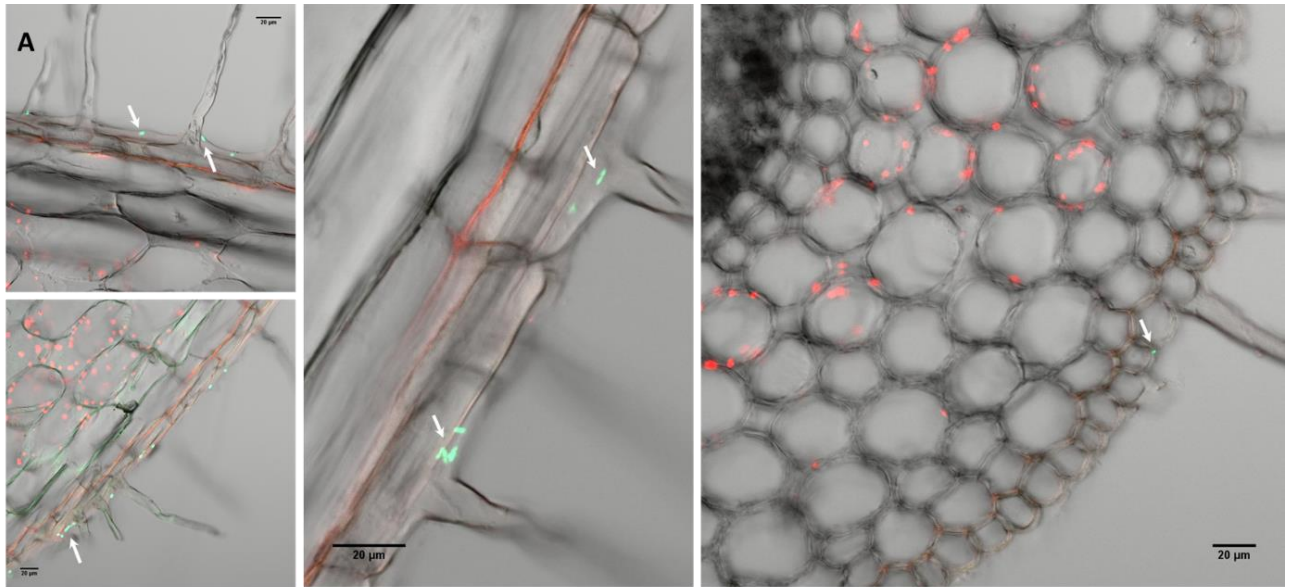


Figura 3.8: Colonización superficial e interna de raíces de sorgo dulce por la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 a las 72 h.p.i. A: Colonización de las células del córtex radicular; B: en sus distintos planos mediante z-stack. Magnificación 40X. La flecha indica las bacterias (puntos verdes). En rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la morfología vegetal.

Por último, a las 144 h.p.i se observó en los cortes transversales la presencia de bacterias en el haz vascular (Figura 3.9).

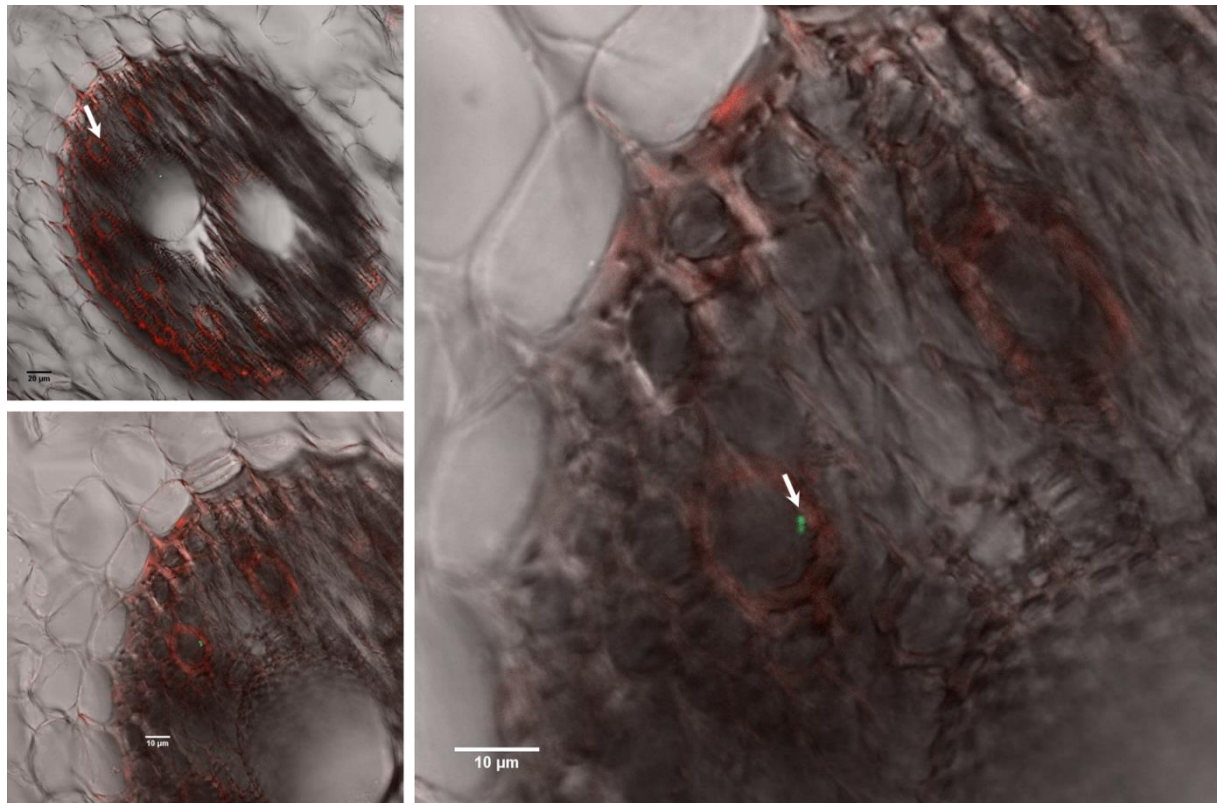


Figura 3.9: Cortes transversales de raíces de sorgo dulce inoculadas con la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 mostrando la colonización de los haces vasculares de la raíz a las 144 h.p.i. Magnificación 40X. La flecha indica las bacterias (puntos verdes). En rojo se visualiza la autofluorescencia de los compuestos vegetales y en gris la morfología vegetal.

En su conjunto los resultados muestran que la cepa UYSB45 coloniza la superficie celular formando biopelículas, ingresando a los tejidos radiculares internos probablemente en la zona de emergencia de los pelos radiculares. Posteriormente, la cepa UYSB45 se mueve desde la epidermis hacia los haces vasculares, atravesando la corteza, para luego posiblemente dispersarse a otros tejidos de la planta.

Por último, a partir del análisis de las imágenes de los controles de plantas sin inocular se observó la ausencia de bacterias marcadas.

3.4 Cuantificación de la colonización de los tejidos internos de plantas de sorgo dulce cultivar M81E por la cepa *P. dispersa* UYSB45

3.4.1. Diseño y validación de cebadores

A partir de la secuencia del gen *16S ARNr* de la cepa en estudio y de las características para tener en cuenta al momento de realizar la reacción de qPCR; se diseñaron cebadores para la cepa UYSB45 (*P. dispersa* UYSB45) con el fin de cuantificar su presencia en los tejidos internos de plantas vegetales (tabla 3.6). Los cebadores diseñados fueron evaluados en primera instancia por su especificidad *in silico* y la probabilidad de formar estructuras secundarias no deseadas.

Tabla 3.6: Cebadores diseñados en este trabajo para la localización dentro de los tejidos vegetales.

Nombre	Secuencia (5'--3')	Posición	% GC	Tm (°C)	Tamaño esperado (pb)
UYSB45f	GTGTGTAGCCCTGGCCG	229-245	70,00	60,00	148
UYSB45r	GTTGGGGTTAAGTCCCGCAA	376-357	55,00	60,54	

Posteriormente, se puso a punto la temperatura de hibridación óptima utilizando como molde distintas extracciones de ADN de las cepas *P. dispersa* UYSB45, *Rhizobium* sp. UYSB13, *Azospirillum brasilensis* Sp7 y *Pseudomonas putida* KT2440, buscándose como objetivo las condiciones óptimas para la detección de la secuencia específica para los que fueron diseñados. En la imagen 3.10 se muestran las curvas de amplificación y *melting* para las muestras ensayadas. En violeta, se muestra aquellas muestras dónde se utilizó el cebador diseñado para la cepa *P. dispersa* UYSB45. Se empleó como molde ADN: 1- genómico de la cepa *Azospirillum brasilensis* Sp7, 2- genómico de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440, 3- extracción de ADN de raíz y tallo de plantas crecidas en parcela de un ensayo de campo inoculado con cepa la cepa UYSB45, 4- genómico de la cepa *P. dispersa* UYSB45, 5- genómico de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13, 6- genómico de la *Pseudomonas putida* KT2440, 7- genómico de la cepa *Azospirillum brasilensis* Sp7, 8- extracción de ADN de raíz y tallo de plantas crecidas en parcela de un ensayo de campo inoculado con cepa la cepa UYSB45. En verde NTC, (Por sus siglas en inglés: *No Template Control*): control de la mezcla de qPCR sin ADN agregado.

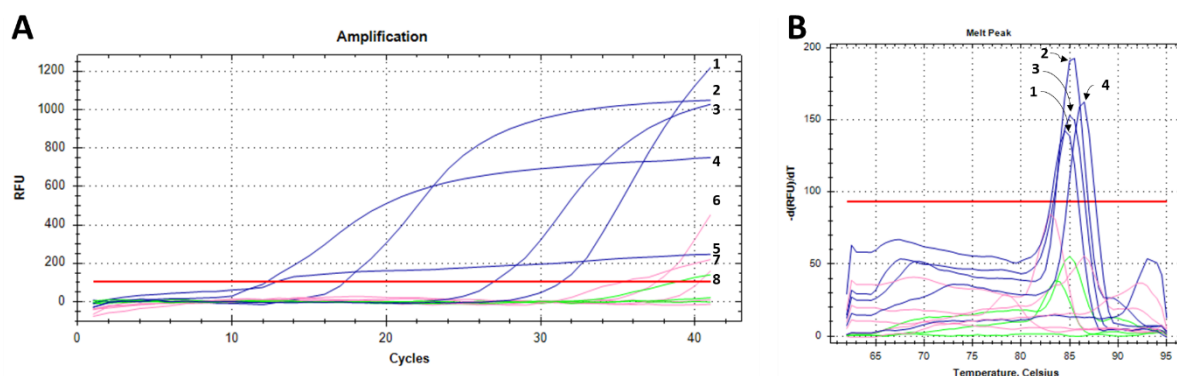


Figura 3.10: Curvas de A: Amplificación y B: Melting de la puesta a punto de la reacción de qPCR con los cebadores diseñados. 1- *A. brasilensis* Sp7 con cebador UYSB45, 2- *P. putida* KT2440 con cebador UYSB45, 3- Muestra de ADN proveniente de raíz y tallo de plantas crecidas en una parcela de ensayo de campo inoculado con cepa UYSB45 con cebador UYSB45, 4- *P. dispersa*. UYSB45 con cebador UYSB45, 5- *Rhizobium* sp. UYSB13 con cebador UYSB45, 6- *P. putida* KT2440 con cebador UYSB13, 7- *A. brasilensis* Sp7 con cebador UYSB13; 8- Muestra de ADN proveniente de raíz y tallo de plantas crecidas en una parcela de ensayo de campo inoculado con cepa UYSB45 con cebador UYSB13. NTC, (No Template Control): control de la mezcla de qPCR sin ADN agregado (en colore verde).

Los resultados mostraron que la temperatura optima de hibridación fue de 62 °C. El tamaño del amplicón esperado fue verificado por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) siguiendo el protocolo utilizado en la Sección 2.3.1. La eficiencia de la reacción de PCR para los cebadores de la cepa UYSB45 fue de 110,3 % con un valor de R^2 de 1.0 y pendiente de -3,098. Respecto a la especificidad en comparación con otras cepas, si bien se observa amplificación en todas las muestras ensayadas, la misma se observó en ciclo más tardíos en comparación con la cepa específica. El Ct obtenido para la cepa para la cual fue diseñada fue de 10, mientras que para las muestras de *A. brasilensis* Sp7 y *P.putida* KT2440 los Ct fueron de 31 y 17 respectivamente. Estos resultados evidencian la especificidad del cebador *in vitro* (Figura 3.10A).

Por último, la amplificación de la muestra a partir del ADN proveniente de plantas cultivadas en la parcela de campo comienza en el ciclo 27.

Cuando se analizan las curvas de disociación, los resultados mostraron que las muestras de ADN en las que se observó el pico esperado para una correcta hibridación con el cebador diseñado para la cepa UYSB45 fueron las provenientes del ADN extraído para las cepas *A. brasilensis* Sp7, *Pantoea* sp. UYSB45, *P.putida* KT2440; así como de la muestra obtenida de plantas crecidas e inoculadas con la cepa UYSB45 a partir de una parcela de un ensayo de campo (Figura 3.10 B).

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que el cebador específico diseñado para *P. dispersa* UYSB45, tiene las condiciones necesarias para ser empleado en la cuantificación de esta cepa en los tejidos internos de plantas inoculadas.

3.4.2 Recuento bacteriano en los tejidos internos de plantas de sorgo dulce var. M81E inoculadas con la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655

Los recuentos bacterianos se realizaron a partir de muestras de ADN extraído de raíces de plantas de sorgo dulce inoculadas con la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655, utilizándose las técnicas de qPCR y recuento en placa de colonias. Los tiempos analizados fueron los mismos que para el ensayo de microscopía (Figura 3.11).

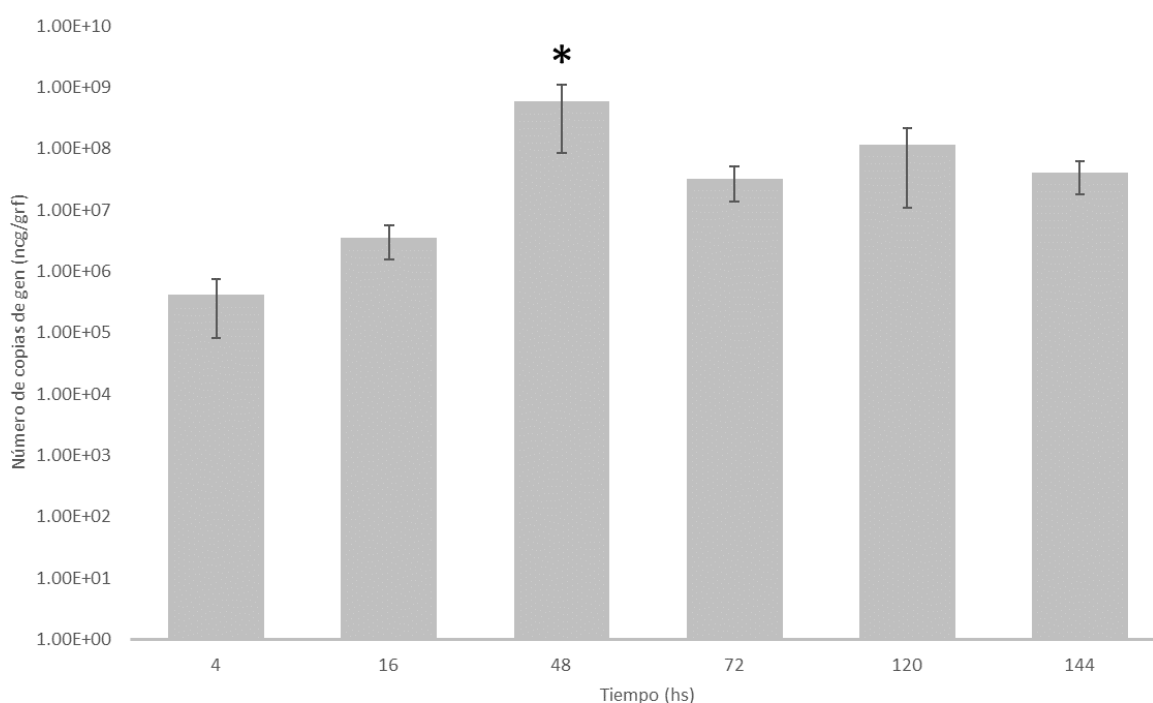


Figura 3.11: Cuantificación del número de copias del gen *16S ARNr* de la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 en plantas de *Sorghum bicolor* cultivar M81E crecidas en condiciones *gnotobióticas* a diferentes tiempo pos-inoculación 4, 16, 48, 72, 120 y 144 h.p.i. El asterisco representa diferencia significativa entre tratamientos (LSD Fisher, $p < 0.05$).

El análisis de los resultado mostró que a las 48 h.p.i el recuento bacteriano alcanza el máximo observándose una diferencia significativa respecto al resto de los tratamientos evaluados. El número de copias en ese tiempo fue de $5,93 \times 10^8$ ng/g/grf. A su vez, el número de copias más bajo se obtuvo a las 4 h.p.i con $1,62 \times 10^6$ ng/g/grf, mientras que a las 144 h.p.i el inóculo alcanza la estabilidad con $3,98 \times 10^7$ ng/g/grf.

Estos cálculos fueron realizados teniendo en cuenta la amplificación de los tratamientos del control negativo. Dado que se detectó amplificación en este tratamiento, este fue tomado como el umbral mínimo y partir de ese valor se realizaron los análisis correspondientes.

Por otro lado, los resultados del recuento de colonias fluorescentes con la técnica de recuento en placa mostraron también la tendencia observada mediante la técnica de qPCR. En este caso, el recuento fue de varios órdenes menor que la obtenida por la metodología anterior alcanzando a las 4 h.p.i valores de $9,50 \times 10^3$ UFC/gfr, seguido de $4,03 \times 10^4$ UFC/gfr a las 16 h.p.i y alcanzando un máximo de $6,86 \times 10^4$ UFC/gfr a las 48 h.p.i.

Respecto a los controles negativos empleados, no se observó crecimiento de UFC fluorescentes.

Modelo bacteriano: cepa *Rhizobium* sp. UYSB13

Marcado molecular de cepas

En trabajos previos, se determinaron las resistencias naturales a antibióticos que presenta la cepa a estudiar (Tabla 3.1) (116), las cuales se emplearán como marcadores para la selección de los plásmidos a utilizar. Mediante técnicas moleculares de conjugación biparental y electrotransformación se buscó transformar ambas cepas con plásmidos que contienen genes codificantes para proteínas fluorescentes (Tabla 3.2).

En primera instancia se prepararon células competentes de las cepas *Escherichia coli* S17.1 λ pir y *Rhizobium* sp. UYSB13. Para esto, se utilizó el mismo protocolo que en la Sección 3.1.1. Para la obtención de las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 transformadas con los plásmidos conteniendo los genes codificantes para las proteínas fluorescentes (tabla 2.2), se realizaron dos aproximaciones: conjugación biparental y electrotransformación. En este caso, se realizó la transformación de las cepas en las mismas condiciones que la cepa *P. dispersa* UYSB45 en la Sección 3.1.2. Las conjugaciones fueron incubadas durante 24 horas a 30°C en medio LB y repicadas a una nueva placa con medio de cultivo LB conteniendo los antibióticos correspondientes para la selección del plásmido (Km₅₀ y Nf₁₀₀), y en el caso correspondiente con el inductor (3MB). Dichas placas fueron incubadas nuevamente a 30°C seleccionándose aquellas colonias transconjugantes que fluorescen en exposición a la luz ultravioleta (U.V.). En iguales condiciones que en la Sección 3.1.3 se realizó la electrotransformación de las células competentes de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13. Se seleccionaron como colonias que adquirieron el plásmido, aquellas en las que se observó fluorescencia al exponerlas a luz U.V. El último paso fue la verificación de la transformación, ídem metodología que la utilizada en la Sección 3.1.4. En este caso, el plásmido fue extraído de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 y transformado en la cepa *E. coli* S17.1 λ pir, verificándose la transformación por la obtención de colonias fluorescentes y Km^R cuando son expuestas a luz U.V.

Obtención de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 marcada con plásmidos reporteros

A partir de trabajos previos se conocía la resistencia o sensibilidad de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 al antibiótico Km (tabla 2.1). Asimismo, en este trabajo se determinó la resistencia

natural a Nitrofurantoina (Nf) 100 µg/ml y a Cloranfenicol (Cf) 25 µg/ml. Con esta nueva información, se ensayaron variantes en los protocolos de transformación bacteriana.

La incorporación del plásmidos fue corroborada mediante. **1-** la selección de colonias resistentes a los antibióticos correspondientes según el plásmido utilizado; **2-** la selección de colonias fluorescentes bajo luz UV y **3-** la extracción del plásmido y su visualización por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v).

Respecto a la incorporación del plásmido pSEVA247Y, se realizó una paso extra de verificación. Con ambas metodologías de transformación (conjugación biparental y electrotransformación) se obtuvieron colonias transformantes Km^R pero no fluorescentes a la exposición con luz UV. Por esto, se verificó la presencia del plásmido pSEVA247Y en las cepas estudiadas. Se realizó la extracción plasmídica de las colonias Km^R no fluorescentes y el plásmido extraído fue utilizado para la transformación de células competentes de *E. coli* S17.1 λpir. En esta oportunidad se obtuvieron colonias de *E. coli* Km^R y fluorescentes bajo luz UV. Concluyendo de esta manera, que el plásmido pSEVA247Y no es funcional en nuestra cepa *Rhizobium* sp. UYSB13; por lo que no será utilizado en los ensayos de inoculación para su localización en planta.

Tabla 3.7: Transformante obtenida

Plásmidos	Reportero	<i>Rhizobium</i> sp. UYSB13
pSEVA238M	msfGFP	•
pSEVA247Y	YFP	-

Por otro lados, la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 fue transformada exitosamente con el plásmido pSEVA238M mediante electrotransformación y conjugación biparental (Tabla 3.7).

Para determinar que la construcción efectivamente fuera funcional para el estudio de colonización en planta, se realizó un ensayo en condiciones *gnotobióticas*. Al igual que la cepa UYSB45, la cepa UYSB13 fue transformada con el plásmido pSEVA238M e inoculadas en plantas de sorgo dulce. Al momento de la inoculación bacteriana, también se realizó el agregado del inductor 3MB al medio de cultivo de plantas Jensen. Las plantas fueron cosechadas a los tiempos 4, 16 y 48 h.p.i. donde no se obtuvieron colonias fluorescentes a la exposición con luz UV. Con estos resultados concluimos que la construcción no será utilizada en los ensayos de inoculación para su localización en planta, quedando excluida esta cepa de los futuros ensayos.

Diseño y validación de cebadores específicos para el recuento bacteriano de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 en los tejidos internos vegetales

Para cuantificar la cepa inoculada en los tejidos internos de las plantas, se realizó en primera instancia el diseño de cebadores específicos para la *Rhizobium* sp. UYSB13, en paralelo con el diseño de los cebadores para la cepa *P. dispersa* UYSB45 como lo explicado en la Sección 3.2.3. Los cebadores obtenidos fueron los mostrados en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8: Cebadores diseñados en este trabajo para la localización dentro de los tejidos vegetales.

Nombre	Secuencia (5'--3')	Posición	% GC	Tm (°C)	Tamaño esperado (pb)
UYSB13f	GACCAGCTATGGATCGTCGCC	1145-1165	61,90	62,93	149
UYSB13r	TACCGTGCCCTGCGGAATAG	1293-1274	60,00	62,02	

Al igual que lo realizado para la evaluación de los cebadores diseñados para la cepa UYSB45 en la Sección 3.5.1, éstos fueron evaluados en primera instancia por su especificidad *in silico* y la probabilidad de formar estructuras secundarias no deseadas. Luego, se realizaron los ensayos *in vitro* donde la curva de amplificación así como la de *melting* para el cebador específico diseñado para la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 muestra que no hay especificidad para la detección de la secuencia para el que fue diseñado (Figura 3.10). La única muestra en la que se observa amplificación es en cepas para los que no fue diseñado y en Ct en los que se observa reacción de NTC. Por lo antes expuesto, estos cebadores no son tenidos en cuenta para análisis. Teniendo en cuenta el desempeño de los cebadores diseñados para la detección de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13, éstos no fueron validados para su uso.

Discusión

3.5 La cepa *Pantoea dispersa* UYSB45 es un endófito verdadero de plantas de sorgo dulce

Como se ha mencionado, la microbiota endofítica es una parte esencial de la microbiota vegetal ya que interactúan estrechamente con su hospedero (232). Como consecuencia de estas interacciones, la microbiota endofítica juega un rol fundamental en la mejora de la tolerancia de las plantas a los estreses bióticos y abióticos; así como en el promover el crecimiento de estas (3). Estas características han convertido a los componentes de la microbiota endofítica, particularmente el componente bacteriano, de gran interés biotecnológico para aumentar la producción y salud de los cultivos de interés agronómico (233). Para maximizar estos efectos positivos, es necesario generar conocimientos sobre la ecología, así como sobre la interacción molecular, endófito-planta (234). Numerosos estudios han estudiado y caracterizado el cómo las bacterias endofíticas infectan y colonizan a sus hospederos, además de conferir rasgos importantes a la planta (86). Por otro lado, no solo es necesario una bacteria colonizadora exitosa, sino que tiene que haber un hospedero compatible a dicha colonización (232).

La cepa *Pantoea dispersa* UYSB45 fue aislada a partir de órganos de plantas de *Sorghum bicolor* (cultivar M81E), esterilizados en su superficie, por lo que *a priori* fue definida como posible endófita (116). Para definirla como endófita verdadera se necesita contar con evidencia microscópica de su infección, colonización y localización en los tejidos internos del hospedero, así como evidencia de su identidad en estos tejidos (235).

Como se describió en el capítulo anterior, el análisis *in silico* del genoma y la caracterización *in vitro* de la cepa *P. dispersa* UYSB45, determinaron la presencia de genes y características potencialmente involucrados en la colonización y reconocimiento bacteriano tales como los receptores para MCPs (quimiotaxis), receptores de ramnosa, formación de biopelícula, producción de PHB (*in vitro*), enzima endoglucanasa y sistemas de secreción bacterianos tipo 2, 4 y 6.

En este capítulo, se organizó la discusión según las distintas etapas de la colonización, e infección de los tejidos internos de la planta con la idea de generar un modelo. Asimismo, se realizó la cuantificación de la cepa UYSB45 durante la colonización de los tejidos internos de

plantas de sorgo dulce cultivar (cv.). En su conjunto este análisis permitió determinar el carácter endofítico de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en plantas de sorgo dulce.

3.5.1 Visualización de la cepa *P. dispersa* UYSB45 colonizando e infectando los tejidos de plantas de sorgo dulce

El primer paso realizado para el estudio de localización y la visualización bacteriana en los tejidos internos de la planta fue el marcado de la cepa UYSB45 con proteínas auto fluorescentes. Dentro de este grupo de proteínas, la más extensamente utilizada es la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), de la cual han surgidos diversas variantes (226). Las utilizadas en esta tesis fueron: *enhanced GFP* (eGFP), *enhanced cyan fluorescent protein* (eCFP), *enhanced yellow fluorescent protein* (eYFP) y la *red fluorescent protein* (DsRed) (226). Las cepas bacterianas marcadas con GFP expresan constitutivamente las proteínas fluorescentes in situ, permitiendo su visualización al emitir fluorescencia en presencia de luz ultravioleta o luz azul (236). Esto permitió poder describir la dinámica de colonización por la bacteriana marcada, en los diferentes compartimentos de la planta. El uso de esta técnica en endófitos, ha permitido evaluar el éxito de la colonización, determinar los sitios de entrada de bacterias e investigar el microhábitat colonizado dentro de los tejidos vegetales (237). Esta metodología ha sido previamente utilizada para el estudio de la colonización bacteriana de cepas como *Streptomyces spp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas spp* y *Azotobacter chroococcum* en plantas de *Hordeum vulgare* (cebada), *Lotus japonicus*, arroz, *Triticum aestivum* (trigo), *Solanum lycopersicum* (tomate), sorgo y sorgo dulce (238–242)

En esta tesis, la cepa UYSB45 fue transformada con 4 plásmidos distintos (pMP4655, pMP4641, pMP4658 y pMP4662) mediante la técnica de electrotransformación en todos los casos. Los resultados mostraron que la presencia del plásmido a utilizar para el estudio de colonización, pMP4655, en *P. dispersa* UYSB45, no alteró la capacidad del crecimiento bacteriano de la cepa. Esto último validó la metodología empleada, siendo nuestros resultados de no alteración del crecimiento bacteriano concordantes con el obtenido en el trabajo donde el plásmido fue descrito (226).

3.5.2 Localización y recuento de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en los tejidos internos de plantas de sorgo dulce cv. M81E

Con el fin de cuantificar la colonización bacteriana dentro de los tejidos internos de las plantas de sorgo dulce, se utilizó la técnica independiente de cultivo qPCR. Esta técnica ha sido empleada para el estudio de la interacción, así como para detectar y cuantificar la bacteria endófito *H. seropedicae* SmR1 asociadas a plantas de maíz (134). A su vez, también se ha utilizado para comparar la abundancia de cepas en los diferentes tejidos de la planta, en comparación con el total del microbioma de endófitos en el modelo *Enterobacter radicincitans* y *Brassica oleracea* (col silvestre) (243).

Para el caso del modelo de estudio de esta tesis, en primera instancia se inoculó la cepa *P. dispersa* UYSB45 4655 (GFP) en plantas de sorgo dulce del cv. M81E en condiciones *gnotobióticas*. Posteriormente las plantas se cosecharon a distintas h.p.i (4, 16, 48, 72, 120 y 144), las raíces se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia (MCF) para el estudio de colonización y por qPCR para la cuantificación bacteriana.

3.5.2.1 Recuento de *P. dispersa* UYSB45 en tejidos internos de plantas de sorgo dulce

Para el recuento exitoso *in planta* de la cepa inoculadas, es necesario el diseño de cebadores específicos. En este trabajo, se obtuvo un juego de cebadores que fue capaz de reconocer específicamente la cepa *P. dispersa* UYSB45. Al evaluar su especificidad, en comparación con otras cepas utilizadas en el ensayo como *A. brasilensis* Sp7 y *P. putida* KT2440, se observó amplificación en todas las muestras ensayadas, sin embargo en ciclos más tardíos en comparación con la cepa UYSB45, para la cual fue diseñado. El Ct obtenido para dicha cepa fue de 10, mientras que para las muestras de *A. brasilensis* Sp7 y *P. putida* KT2440 los Ct fueron de 31 y 17 respectivamente (Figura 3.10A). También se observó una amplificación en ciclos más tardíos en la muestra de ADN proveniente de plantas de sorgo dulce cultivadas en la parcela de campo (244). Estas amplificaciones en los controles se atribuye a un reconocimiento menos específico de las secuencias de ADN, sin embargo en ciclos mucho más tardíos. En el caso de las muestras de ADN provenientes de plantas cultivadas en campo es de esperar que la amplificación se retarde, dado que la concentración de ADN bacteriano presente en esa muestra es menor en comparación con una extracción de ADN genómico de

un cultivo puro. Este trabajo, suma a otros en los que utilizaron esta técnica para la cuantificación de cepas bacterianas endófitas *in planta* en los modelos *P. dispersa* colonizando raíces de *Ipomoea batatas* (boniato) y *Pseudomonas putida* BP25 asociada a plantas de *Piper nigrum* L (pimienta negra) demostrando que es una técnica válida para realizar el recuento y localización dentro de los tejidos internos de la planta (245, 246).

Por otro lado y en paralelo, se realizaron también recuentos bacterianos de colonias fluorescentes crecidas en placas bajo luz UV, a partir de plantas inoculadas con la cepa UYSB45. Los resultados mostraron una diferencia en un orden de magnitud al menos entre ambas técnicas utilizadas. Esto se puede atribuir por un lado, al hecho de que el cebador diseñado no detecta únicamente la cepa UYSB45 ya que su diseño se basó en el gen *16S ARNr*, y por otro lado a las limitaciones de la técnica de recuento en placa.

3.5.2.2 Infección y colonización de los tejidos internos de plantas de sorgo dulce

Las bacterias pueden moverse por diferentes mecanismos, que incluyen *swimming* y *swarming* (movilidad mediada por flagelo) (166). La motilidad flagelar proporciona acceso a los sitios de unión en la superficie de las raíces de la planta y posiblemente desencadena la unión inicial, estando también reportada como involucrada en la maduración de la biopelícula (247). La capacidad de movimiento le permite a la bacteria desplazarse hacia compuestos atrayentes en las inmediaciones de los exudados radiculares (166). Como se presentó en el Capítulo II secciones 2.5.1 y 2.6, se identificaron *in vitro* en la cepa UYSB45, las capacidades de movimiento tipo *swimming*, *twitching* y *swarming*. Asimismo, el genoma de la cepa UYSB45 codifica para todos los genes necesarios para la formación del flagelo Capítulo II sección 2.6.3.2. En ese sentido, y teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos, se podría especular que la presencia del flagelo juegue un rol importante en la atracción a la raíces y posterior colonización de su superficie, ya que a las 4 h.p.i se observen colonias bacterianas adheridas a la superficie de la raíz de las plantas de sorgo dulce analizadas. Por otro lado, al realizar el recuento bacteriano por la técnica de qPCR como era de esperar fue donde se encontró en menor número ($4,18 \times 10^5$ ncg/grf).

Hacia las 16 h.p.i, se observó la presencia bacteriana en la superficie de la raíz, así como también en los espacios intercelulares del córtex de la raíz principal (Figura 3.6). También se observaron acúmulos bacterianos en los lugares antes mencionados y se evidenció la

colonización de la raíz en distintos planos (Figura 3.6). Esto también es corroborado con el aumento en el número bacteriano realizado en dicho estadio por recuento por qPCR, donde dicho recuento en un orden ($3,57 \times 10^6$ ncg/grf) en comparación con 4 h.p.i.

Al avanzar en los tiempos post inoculación, se observa la tendencia en un mayor número de bacterias en los espacios intercelulares del tejido radicular y también una mayor dispersión en el tejido (48 y 72 h.p.i). En estos tiempos p.i se observaron bacterias adheridas a la base de pelos radiculares, pudiendo ser este el sitio de ingreso a los tejidos internos de la raíz y la subsecuente colonización del córtex radicular. En estos sitios es donde se ha reportado una acumulación de los exudados radiculares por lo que es de esperarse una mayor colonización bacteriana (27). Observaciones similares fueron obtenidos en trabajos en los que se estudió la colonización de *P. dispersa* en raíces de *Ipomoea batatas* (boniato) (245).

Por último, a las 144 h.p.i se observó en los cortes transversales la presencia de bacterias en el haz vascular (Figura 3.9). Pudiendo ser esta una vía de diseminación al resto de los órganos de la planta (245).

Con los resultados obtenidos, se desprende que la cepa *P. dispersa* UYSB45 es un endófito verdadero. Esta cepa coloniza la superficie celular formando biopelículas, ingresando a los tejidos radiculares internos probablemente en la zona de emergencia de los pelos radiculares. Posteriormente, la cepa UYSB45 se mueve desde la epidermis hacia los haces vasculares, atravesando la corteza, para luego posiblemente dispersarse a otros tejidos de la planta. En plantas de boniato inoculadas con *P. dispersa*, se observó un patrón de colonización similar al observado en nuestra cepa. En este trabajo, encontraron a dicha cepa a los 14 días colonizando hojas de la planta, siendo su distribución por vasos del xilema (245).

Conclusiones

La estrategia metodológica empleada permitió concluir que la cepa *P. dispersa* UYSB45 es un endófito verdadero de plantas de sorgo dulce cv. M81E. El proceso de colonización e infección del hospedero sigue el típico patrón de infección endofítico, en el cual en primera instancia se forma un agregado bacteriano (biopelícula) en la superficie de las raíces, particularmente en la zona de emergencia de las raíces laterales y pelos radiculares. Posteriormente se produce la infección de los tejidos internos y la colonización de los espacios intercelulares, para luego alcanzar los haces vasculares y posiblemente dispersarse sistémicamente en la planta. El conocer el proceso de interacción con el hospedero es un insumo fundamental para tener en cuenta en el desarrollo de un bioinoculante basado en esta bacteria.

CAPÍTULO IV: Análisis de los perfiles transcripcionales de las interacciones entre plantas de sorgo dulce y la cepa promotora del crecimiento *Pantoea dispersa* UYSB45; o la cepa fitopatógena *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1.

Objetivo:

Identificar y determinar la expresión de genes bacterianos y de la planta, posiblemente involucrados en interacciones planta-bacteria benéfica (PCV) o deletérea (fitopatogénica).

Estrategia

En este capítulo se buscó por un lado, analizar el perfil transcripcional de la cepa PCV *P. dispersa* UYSB45 y de la cepa fitopatógena *H. rubrisubalbicans* M1, al ser inoculadas a plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010. Por otro lado, se buscó analizar el perfil transcripcional de plantas de sorgo dulce (ADV2010), inoculadas con las cepas mencionadas. Para esto se realizó un ensayo biológico que permitió el estudio de los transcriptomas de las cepas a estudiar *in planta*. Esta estrategia permite el estudio en simultáneo de la expresión de genes bacterianos y vegetales (*Dual RNA-seq*). El análisis de la de los resultados aporta conocimientos sobre: **(i)** los mecanismos de respuesta de la planta hospedadora a la colonización con cepas bacterianas (PCV o fitopatogénica) y **(ii)** las estrategias bacterianas para interactuar con el hospedero, pudiéndose comparar la interacción beneficiosa (PCV) con la deletérea (fitopatogénico).

Para esto, en una primera instancia se diseñó un ensayo en condiciones *gnotobióticas* para determinar si la cepa fitopatógena tiene efecto deletéreo en nuestro cultivar de sorgo dulce. Una vez confirmado este efecto, se realizó un nuevo ensayo en las mismas condiciones para la extracción de ARN y posterior perfil de expresión transcripcional. En este último ensayo se

extrajo el ARN total de los distintos sistemas: i- plantas inoculadas con la cepa endófito PCV *P. dispersa* UYSB45, ii-plantas inoculadas con la cepa patógena *H. rubrisubalbicans* M1 y iii- plantas sin inocular. También se extrajo el ARN de las bacterias PCV que no ingresaron a los tejidos internos de la plata (plantónicas) (Figura 3.1).

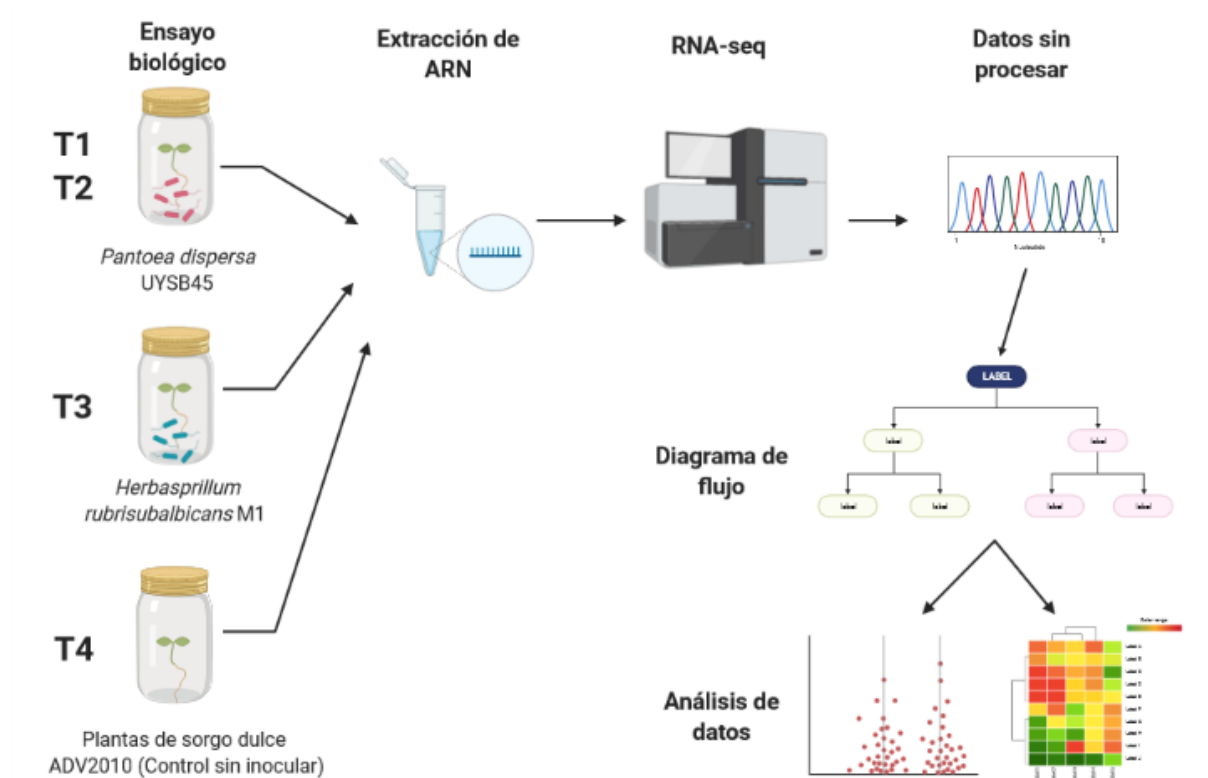


Figura 4.1: Esquema de la estrategia Dual RNA-seq empleada, para determinar el perfil transcripcional bacteriano y de plantas de sorgo dulce cv. ADV2010, inoculadas con la cepa PCV *P. dispersa* UYSB45, o la cepa fitopatógena *H. rubrisubalbicans* M1. Tratamientos: T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T2: *P. dispersa* UYSB45 planctónicas. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce sin inocular. Creado con BioRender.com.

Materiales y Métodos

4.1 Cepas bacterianas y plantas empleadas

Las cepas bacterianas utilizadas en este capítulo fueron, la cepa PCV *P. dispersa* UYSB45 y la cepa fitopatógena *H. rubrisubalbicans* M1. Dichas cepas se inocularon en plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010, la utilización de este cultivar esta dado por la disponibilidad de semillas en buen estado y también por ser la variedad utilizada en su momento para la producción de biocombustibles.

4.2 Ensayo de infección de plantas de sorgo dulce cultivar ADV2010, con la cepa patógena *H. rubrisubalbicans* en condiciones *gnotobióticas*.

En primera instancia, se puso a punto el protocolo a seguir para lograr el desarrollo de la enfermedad en las plantas del cultivar de sorgo dulce utilizado, al ser inoculadas con la cepa fitopatógena *H. rubrisubalbicans* M1. La misma provoca la enfermedad de la raya roja (RSD, por sus siglas en inglés: *red stripe disease*) (104). Para esto, dos técnicas de infección fueron evaluadas, (i) inyección con jeringa de una suspensión bacteriana o (ii) simulación de heridas e inoculación de una suspensión bacteriana.

El ensayo *gnotobiótico* utilizado para la evaluación del efecto fitopatógeno contó con los siguientes tratamientos: **1-** plantas inoculadas con la cepa endófito PCV *P. dispersa* UYSB45, **2-** plantas inoculadas con la cepa patógena *H. rubrisubalbicans* M1 y **3-** plantas sin inocular (control).

Los ensayos se realizaron en condiciones de luz y temperaturas controladas: fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 25°C.

En todos los casos, las semillas fueron esterilizadas en la superficie siguiendo el protocolo descrito en la Sección 3.3.1, y germinadas en placas de agar-agua 0,8% (p/v) a 30°C durante 48 h. Luego, dos plantines fueron transferidos a frascos conteniendo 15 ml del medio de cultivo MS+N, utilizando como soporte bolitas de polipropileno. En el caso de la cepa PCV *P. dispersa* UYSB45, se inoculó con 1×10^7 ufc/ml en la base del tallo de cada planta. En el caso de la bacteria patógena *H. rubrisubalbicans* M1 se evaluaron las 2 vías de infección de la planta previamente mencionadas inoculando 1×10^6 ufc/ml. En el caso de las plantas control, se realizó el mismo procedimiento de inoculación utilizado con la bacteria patógena

(inyección y simulación de heridas) pero en este caso se utilizó H₂O estéril para su inyección. Se evaluaron los efectos de desarrollo de enfermedad a los 4 días p.i. Se realizaron 3 réplicas biológicas por cada tratamiento, siendo cada réplica 2 tubos de planta con 2 plantines cada uno.

4.3 Evaluación del crecimiento de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en distintos medios de cultivo para plantas

Los medios de cultivos evaluados fueron: MS, MS +N, Jensen, Jensen +N (248, 249), ambos medios de cultivo para planta han sido utilizados indistintamente para el crecimiento de plantas de sorgo dulce (250). Para su comparación se inocularon con la misma cepa, los medios de cultivo bacteriano TSB y LGI +N (Anexo I).

El crecimiento bacteriano se evaluó en placas de microtitulación de 96 pocillos en el espectrofotómetro de placa Varioskan Flash (Thermo Scientific) como se explicó en la Sección 2.4.7.1. Las curvas de crecimiento se realizaron por sextuplicado.

4.4 Extracción de ARN a partir de plantas de sorgo dulce inoculadas con las cepas en estudio

A partir de un ensayo montado en las mismas condiciones que las explicadas en la Sección 4.2, se utilizaron tanto plantas como bacterias plantónicas como material de partida. En este caso los tratamientos a utilizar fueron:

(T1) - *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce (muestra mixta, MM)

(T2) - *P. dispersa* UYSB45 planctónicas

(T3) - *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce (MM)

(T4) - Plantas de sorgo dulce (control sin inocular)

Se realizaron 3 réplicas biológicas por cada tratamiento, siendo cada réplica 2 tubos de planta con 2 plantines cada uno. La extracción de ARN fue realizada por tubo de planta, y cada extracción fue evaluada de forma independiente siguiendo los protocolos correspondientes. En la Figura 4.2 se muestra un esquema de la estrategia utilizada para la extracción de ARN en los distintos tratamientos.

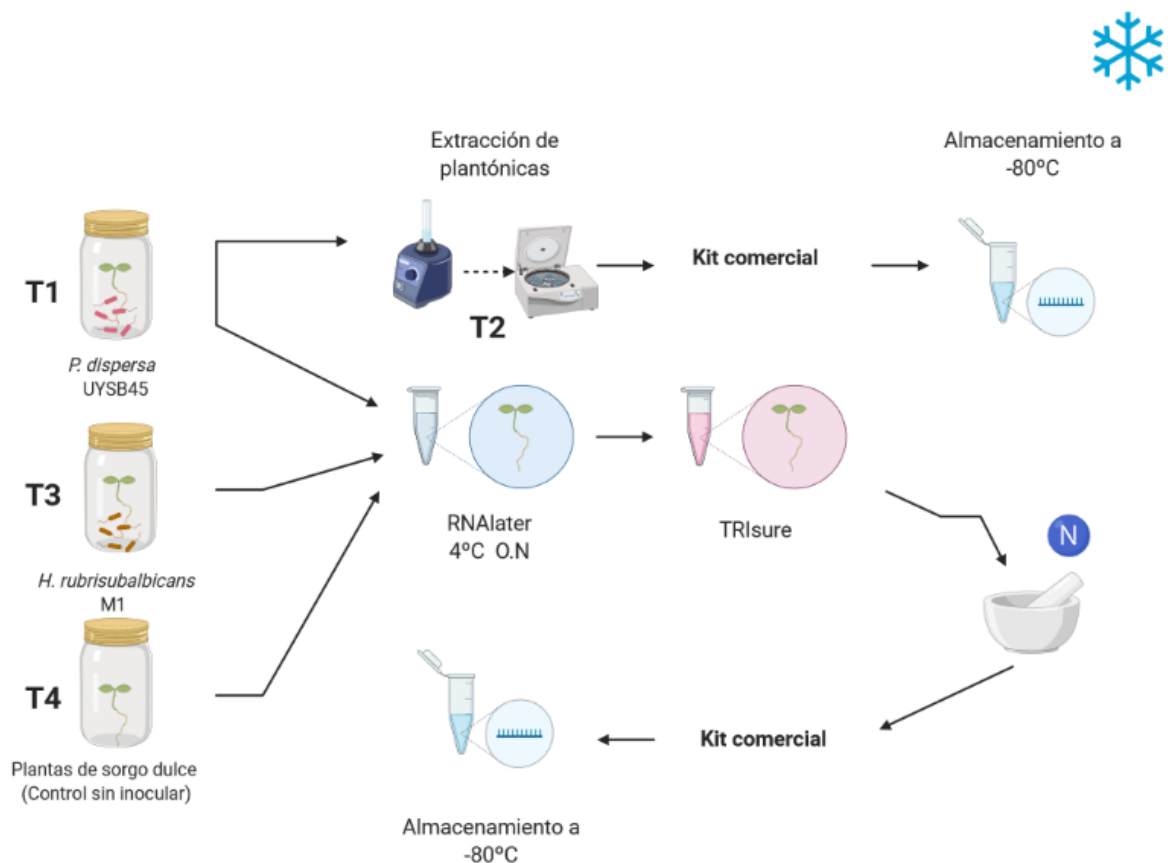


Figura 4.2: Esquema de la estrategia utilizada para la extracción de ARN. Se realizaron 2 protocolos de extracción de ARN, según el tipo de muestra fuera el material de partida. Los tratamientos fueron: T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T2: *P. dispersa* UYSB45 planctónicas. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce. Creado con BioRender.com.

Dado que se tenía 2 tipos de muestras distintas (muestra mixta planta-bacteria y bacterias planctónicas), fue necesario la puesta a punto de la extracción de ARN para cada caso. Por un lado, se procesó la muestra con células bacterianas únicamente y por otro las muestras mixtas (planta-bacterias) junto a las muestras del control sin inocular. En ambos casos, se utilizaron diferentes kits de extracción ya que el material de la muestra de partida era distinto según el tratamiento (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Kits comerciales y muestras estudiadas

Reactivos y Kits comerciales	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo research)	•		•	•
TRIsure™ (Bioline Ltd)	•		•	•
PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™)	•	•	•	•
RNAlater® RNA Stabilization Solution (Ambion™)	•		•	•

A continuación se explicarán de forma independiente el protocolo para la extracción de ARN para cada tipo de muestra y sus respectivos tratamientos.

Tratamientos 1, 3 y 4 (T1, T3 y T4):

En primera instancia el material vegetal fue pesado y guardado O.N a 4°C sumergido en una solución de RNAlater® (Ambion™). Este paso se realizó para conservar y preservar la integridad del ARN. Posteriormente, el material vegetal se cortó en trozos para su macerado en nitrógeno líquido, agregándole 1 ml de TRIsure™ (Bioline Ltd) cada 100 mg de material vegetal de partida. La suspensión obtenida fue empleada para la extracción de ARN, empleando los kits comerciales listados en la tabla 4.1.

Tratamiento 2 (T2):

Se entienden por bacterias plantónicas aquellas que no ingresaron a la planta (pudiendo estar en el proceso de ingreso) y que crecieron en las inmediaciones de las raíces. Estas fueron obtenidas a partir de los mismo frascos donde se crecieron las plantas inoculadas con la cepa UYSB45 en medio de cultivo MS+N, una vez que se retiraron las mismas. Posteriormente las pelotas de polipropileno fueron agitadas durante 60seg con un agitador vórtex en el mismo medio MS durante 60 seg. La suspensión resultante fue pasada a tubos de 50ml centrifugándose a 4°C y 3.000 g por 10 min. El pellet obtenido fue el material que se utilizó para la extracción de ARN, enriquecido en células bacterianas, aplicándose el kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen™) (tabla 4.1).

Todos los procesos explicados previamente fueron realizados manteniendo la muestra en frío en todas las etapas, empleando agua tratada con dietilpirocarbonato al 0,1% (DEPC 75% v/v). Las extracciones de ARN se hicieron según el protocolo recomendado por el fabricante de cada kit comercial.

4.5 Verificación de la integridad y concentración del ARN obtenido

Previo al envío de las muestras para su secuenciación, se chequeó la integridad por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en buffer TAE 1X. Para una correcta visualización de la electroforesis, la muestra de ARN debe ser desnaturalizada a 70°C por 3 min para luego realizar el shock térmico en hielo. Tanto el buffer utilizado TAE 1X, como la corrida electroforética se realizaron en frío.

La integridad y la concentración de ARN fueron confirmadas por Bioanalyzer (Agilent).

4.6 Secuenciación del ARN obtenido

La construcción de librerías y posterior secuenciación de las muestras se realizó a través del servicio de Macrogen Inc. Corea. La secuenciación se realizó en el secuenciador HiSeq2500 (Illumina) con lecturas de 101 pb de largo, de tipo “paired-end”.

El flujo de trabajo utilizado se muestra en el siguiente esquema:



Figura 4.3: Flujo de trabajo utilizado en Macrogen

A modo de resumen, el flujo de trabajo de NGS consta en 4 pasos básicos. El primero es la preparación de la muestra, para esto se realiza el control de calidad (QC), y aquellas muestras que superan los estándares previamente determinados por la empresa son las utilizadas para la construcción de las biblioteca. El paso siguiente es la construcción de las bibliotecas, que en este caso se realizaron con el ADNc. Las bibliotecas se realizaron con la fragmentación aleatoria de dicho ADNc presente en la muestra. El tercer paso es la secuenciación y por último la conversión de los datos de secuenciación en datos brutos para el análisis.

4.7 Análisis de secuencias de ARN

El análisis de RNA-Seq se realiza mapeando y contando la distribución de las lecturas obtenidas, tomando como base la anotación del genoma de referencia.

4.7.1 Preprocesamiento de datos y ensamblado de los transcriptomas

En una primera instancia, la calidad de las lecturas de cada transcriptoma fue evaluada con el programa FastQC [v.0.11.9] (167). Luego, los datos obtenidos fueron procesados para eliminar artefactos de secuenciación, así como los adaptadores de Illumina utilizando el software Skewer [v.0.2.2] (251), mientras que el software Prinseq [v. 0.20.4] (252) fue utilizado para remover secuencias de baja calidad ($Q < 20$) así como las lecturas de tamaño menor a 50 pb.

Para el ensamblado de los respectivos transcriptomas se utilizó una estrategia basada en genomas de referencia, donde utilizándose las secuencias de los siguientes genomas:

Sorghum bicolor V3.1.1 (253), *P. dispersa* UYSB45 (este trabajo) y *H. rubrisubalbicans* M1 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP013737.1). Todos las lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia correspondiente utilizando el software HISAT2 (V2.2.1). Por último, el ensamblado de los transcritos y el cálculo de sus respectivas abundancias fue realizado usando el software Stringtie (V2.1.2) (254).

4.7.2 Análisis de la expresión génica diferencial y clasificación funcional

Posteriormente, se realizó un análisis de la expresión diferencial, basado en los datos normalizados por el valor: *the transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads* (TPM). Para esto se empleó el programa R, utilizando el paquete estadístico EdgeR (255). Aquellos genes con un valor umbral de FDR (*False Discovery Rate*) < 0.05 y $|fold-change| \geq 4$ fueron identificados como diferenciales y significativamente expresados.

Para identificar las categorías basadas en Gene Ontology, estos genes expresados diferencialmente (DEGs) fueron anotados usando el software InterProScan (256). Posteriormente, los resultados obtenidos fueron clasificados en categorías GO utilizando el software GOATOOLS (257).

Por otro lado, se realizó la categorización funcional de este conjunto de DEGs utilizando MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>).

4.7.3 Representación gráfica de los análisis de expresión génica diferencial Self-Organizing Maps (SOM) y diagrama de Venn

Los valores normalizados (TPM) de cada gen fueron agrupados, basándose en sus patrones de expresión. Los análisis se realizaron con aquellos genes que presentaron expresión diferencial. Dichos valores de expresión fueron escalados dentro de las muestras y usados para agrupar los genes y de esta manera generar un Self-Organizing Maps (SOM) hexagonal multidimensional de 3×2 a lo largo de 100 iteraciones de entrenamiento utilizando el paquete Kohonen en R (258). Seguido al proceso de iteración, se asignaron los genes según su perfil de expresión a 6 grupos distintos (en adelante denominados nodos). Para visualizar los patrones de acumulación de genes asociados, en relación con los tratamientos, cada nodo fue representado como un boxplot, utilizando el paquete ggplot2 en R.

Por otro lado, con la finalidad de comparar presencia, ausencia y genes compartidos entre tratamientos se realizaron diagramas de Venn. Para ello cada diagrama fue realizado con la herramienta online: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

Resultados

4.8 Optimización del crecimiento bacteriano y desarrollo de la enfermedad RSD en plantas de sorgo dulce

La cepa *H. rubrisubalbicans* M1 ha sido previamente reportada como fitopatógena de sorgo dulce (104). Con la finalidad de ser empleada como uno de los modelos de estudio en esta tesis, en primera instancia se evaluaron las metodologías de inoculación por inyección y por simulación de heridas, que mejor desarrollan la enfermedad.

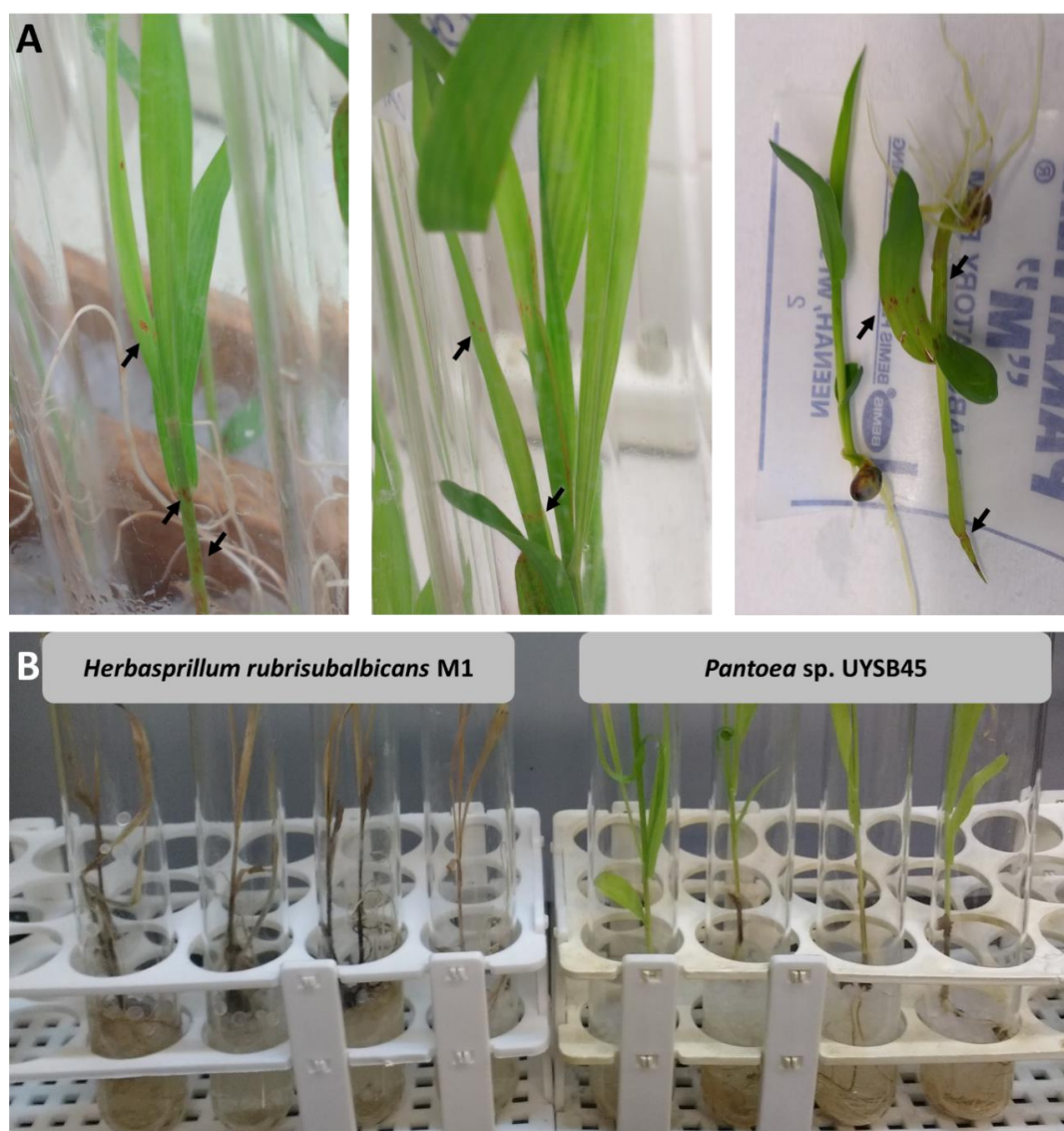


Figura 4.4: Vista de los distintos ensayos en los que se evaluó la metodología de inoculación bacteriana para el desarrollo de la enfermedad por la cepa patógena M1 en plantas de *Sorghum bicolor* cultivar ADV2010. A: Ensayo a los 4 dpi donde se observan rayas rojas en tallo y hojas de la planta, correspondientes a la enfermedad, indicadas con flechas. La inoculación se realizó mediante la inyección con jeringa en hoja o tallo B: Ensayo a los 30 d.p.i donde se observa el desarrollo de la planta inoculada con la cepa patógena (izquierda) y la ausencia de síntomas cuando se inocula la cepa PCV (derecha).

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que la metodología óptima para el desarrollo de la enfermedad RSD fue la inoculación de una carga bacteriana de 1×10^6 ufc/ml de la cepa *H. rubrisubalbicans* M1 por planta mediante su inyección con jeringa en hoja o tallo. Mediante el empleo de esta aproximación fue posible el desarrollo de la enfermedad RSD a los 4 d.p.i. (Figura 4.4A).

Por otro lado y dado que uno de los objetivos es analizar el transcriptoma de las bacterias asociadas a plantas de sorgo dulce que no ingresaron a los tejidos internos (T2, plantónicas), previamente se evaluó el crecimiento bacteriano en distintos medios de cultivo de plantas, con la finalidad de elegir el más adecuado para ser usado en la estrategia experimental propuesta.

En la Figura 4.5 se presentan las curvas de crecimiento obtenidas en 4 medios de cultivo, 2 utilizados para el crecimiento bacteriano (TSB y LGI) y dos utilizados para el crecimiento vegetal, suplementado o no con N (MS y Jensen).

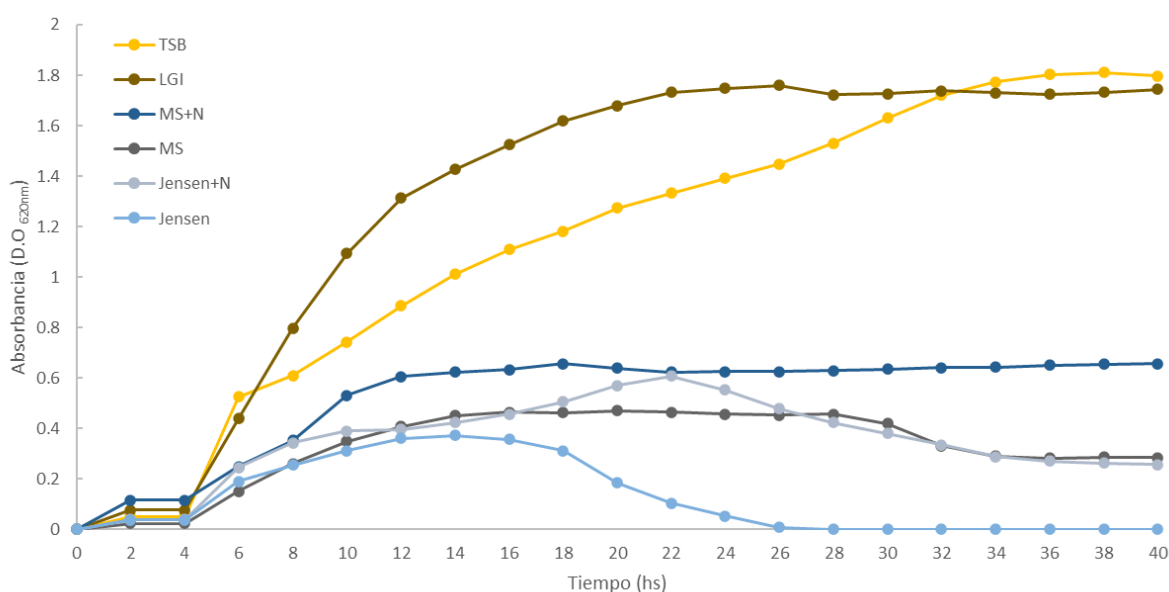


Figura 4.5: Curvas de crecimiento de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en diferentes medios de cultivos bacterianos y de plantas.

Los resultados de las curvas de crecimiento mostraron que los medios MS y Jensen presentaron una D.O.₆₂₀ menor con respecto a los medios TSB y LGI, lo cual es esperable dado que los nutrientes presentes en dichos medios son los óptimos para el crecimiento de plantas. A su vez, al comparar ambos medios de plantas, se observó que el crecimiento bacteriano es mayor en el medios MS y dentro de este la versión con el adiconado de N.

Cuando se calculan los tiempos de generación (g) de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en los distintos medios de cultivo, se observa que para los medios de cultivos bacterianos óptimos (TSB y LGI) es similar siendo de 1,2 horas aproximadamente (tabla 4.2). Por otro lado, el tiempo de generación en los medios de cultivos óptimos para el crecimiento de plantas (MS y Jensen en sus dos variaciones), tiene valores similares al medio TSB y LGI. En el caso del medio de cultivo MS+N el crecimiento es más lento (g mayor) pero el comportamiento de la curva de crecimiento es más estable a lo largo del tiempo, permitiendo que la población se establezca y crezca (Figura 4.5).

Tabla 4.2: Tiempo de generación (g) de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en los diferentes medios de cultivo evaluados

Cepa	Medios de cultivo (h)					
	Bacteria			Planta		
	TSB	LGI	MS+N	MS	Jensen+N	Jensen
<i>P. dispersa</i> UYSB45	1.13	1.20	2.51	1.16	1.30	1.44

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió utilizar el medio de cultivo MS+N para el crecimiento de plantas de sorgo dulce utilizados en el ensayo de extracción de ARN (Sección 4.4).

4.9 Obtención de ARN a partir de plantas de sorgo dulce inoculadas con las cepas en estudio

4.9.1 Control de calidad

La calidad del ARN extraído fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa y por el valor RIN (RNA Integrity Number), siendo 7 el valor mínimo requerido por la empresa Macrogen. En la Figura 3.5 se observan las bandas obtenidas en la electroforesis capilar empleando el Bioanalyzer.

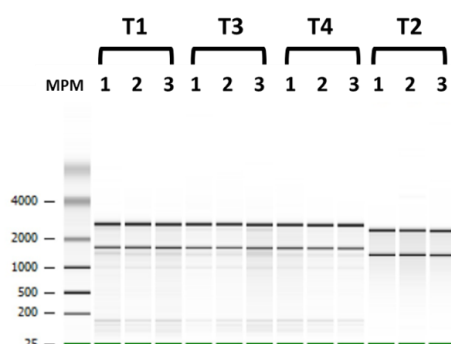


Figura 4.6: Electroforesis capilar generada por Bioanalyzer, de las extracciones de ARN obtenido a partir de plantas de sorgo dulce. Carriles: muestras de los tratamientos de 1 a 4 con sus 3 réplicas biológicas. MPM: Marcador de peso molecular.

Según las medidas obtenidas en el Bioanalyzer, todas las muestras pasaron el valor umbral requerido por MacroGen y fueron enviadas para su secuenciación.

Tabla 4.3: Concentración y valor de RIN de las extracciones de ARN de los diferentes tratamientos

Tratamientos y replicas biológicas		Concentración de ARN (ng/μl)	Proporción rARN (28S/18S) (23S/16S)	RIN
T1	1	423	1,8	7,60
	2	537	1,4	7,80
	3	391	1,6	7,40
T2	1	318	1,1	8,10
	2	277	1,0	7,50
	3	243	1,1	8,30
T3	1	254	1,6	8,30
	2	244	1,6	8,00
	3	266	1,4	7,20
T4	1	407	1,4	7,50
	2	498	1,6	8,20
	3	515	1,6	8,20

4.9.2 Mapeo de las secuencias

Para la selección de los transcritos con la calidad necesaria para ser empleados en los análisis posteriores, se realizó un flujo de trabajo en 2 etapas en todos los tratamientos. Los transcritos utilizados para esto, fueron los obtenidos en la columna “lecturas post QC” de la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Datos obtenidos luego de ser procesados siguiendo el flujo de trabajo utilizado.

Tratamientos y replicas biológicas	Nº Total de lecturas (pb)*	Lecturas sin QC**	Lecturas post QC	% Lecturas post QC
T1	4117657890	40768890	40352758	98.98
	4520526286	44757686	44354732	99.10
	4747652056	47006456	46546724	99.02
T2	3198481130	31668130	31421966	99.22
	3524208352	34893152	34609844	99.19
	3578336070	35429070	35170446	99.27
T3	4126340254	40854854	40523340	99.19
	4176926912	41355712	40992744	99.12
	4163935282	41227082	40885618	99.17
T4	3734188766	36972166	36697924	99.26
	3492694736	34581136	34314952	99.23
	3749471884	37123484	36802982	99.14

*Datos recibidos de MacroGen, sin procesar; **QC, control de calidad

En la cuarta columna se muestran las lecturas y transcritos obtenidos post procesamiento. Cabe destacar que las lecturas que se perdieron después del procesamiento fueron 1% aproximadamente.

En una primera instancia se mapearon los transcritos de las muestras mixtas (Parte I y II, Figura 4.7) en 2 eventos en paralelo con el mismo set de datos de partida. En todos los casos se utilizaron los genomas de referencias correspondientes; genomas bacterianos y genoma de la planta. Luego se realizó el mapeo de los transcritos bacterianos de T2 con el genoma de referencia de *P. dispersa* UYSB45 (Parte II, Figura 4.7).

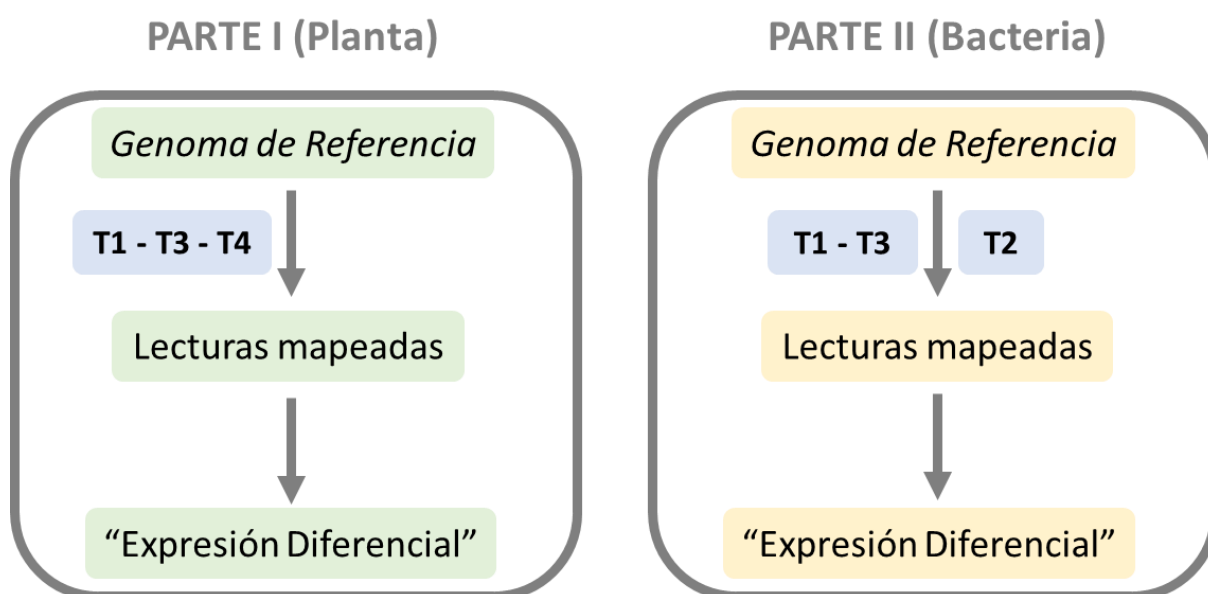


Figura 4.7: Flujo de trabajo del análisis de los datos de ARN-seq. Donde los recuadros en azul hacen referencia a los transcritos provenientes de, T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T2: *P. dispersa* UYSB45 planctónica. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce

En la tabla 4.5 se muestran los datos obtenidos como resultado del flujo de trabajo utilizado. El promedio de los transcritos identificados de *P. dispersa* UYSB45 en T1 y T2 fueron similares en número. En el caso del número de transcritos identificados de *S. bicolor* fueron también similares entre tratamientos.

Tabla 4.5: Número de transcritos mapeados en cada tratamiento en relación con el genoma de referencia en cada caso

Tratamientos y replicas biológicas	Transcriptos mapeados		
	<i>S. bicolor</i>	<i>P. dispersa</i> UYSB45	<i>H. rubrisubalbicans</i> M1
T1	15698	4911	40
	14741	4820	25
	14926	4886	35
T2	-	4963	-
	-	4965	-
	-	4965	-
T3	16018	371	3112
	15886	369	3122
	15660	330	3170
T4	14696	235	6
	14918	303	11
	14750	300	23

Cabe destacar que se detectó un orden menos en los transcritos de *P. dispersa* UYSB45 mapeados en los tratamientos en los cuales las plantas no fueron inoculadas con esta cepa (T3 y T4). Por otro lado, en el tratamiento sin inóculo bacteriano (T4) se observó dos órdenes menos de transcritos de *H. rubrisubalbicans* M1 mapeados en relación con T3. Siendo estos transcritos en comparación con los transcritos mapeados de *P. dispersa* UYSB45 en el mismo tratamiento (T4), un orden menos.

4.9.3 Perfil transcriptómico de plantas de *S. bicolor* inoculadas con las bacterias evaluadas

Según los resultados del análisis de la expresión diferencial basados en TPM (*Transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads*), 1860 genes en *S. bicolor* fueron identificados como diferencial y significativamente expresados (DEGs) (Figura 4.8). Este conjunto de genes fue el seleccionado para trabajar en esta sección de la tesis.

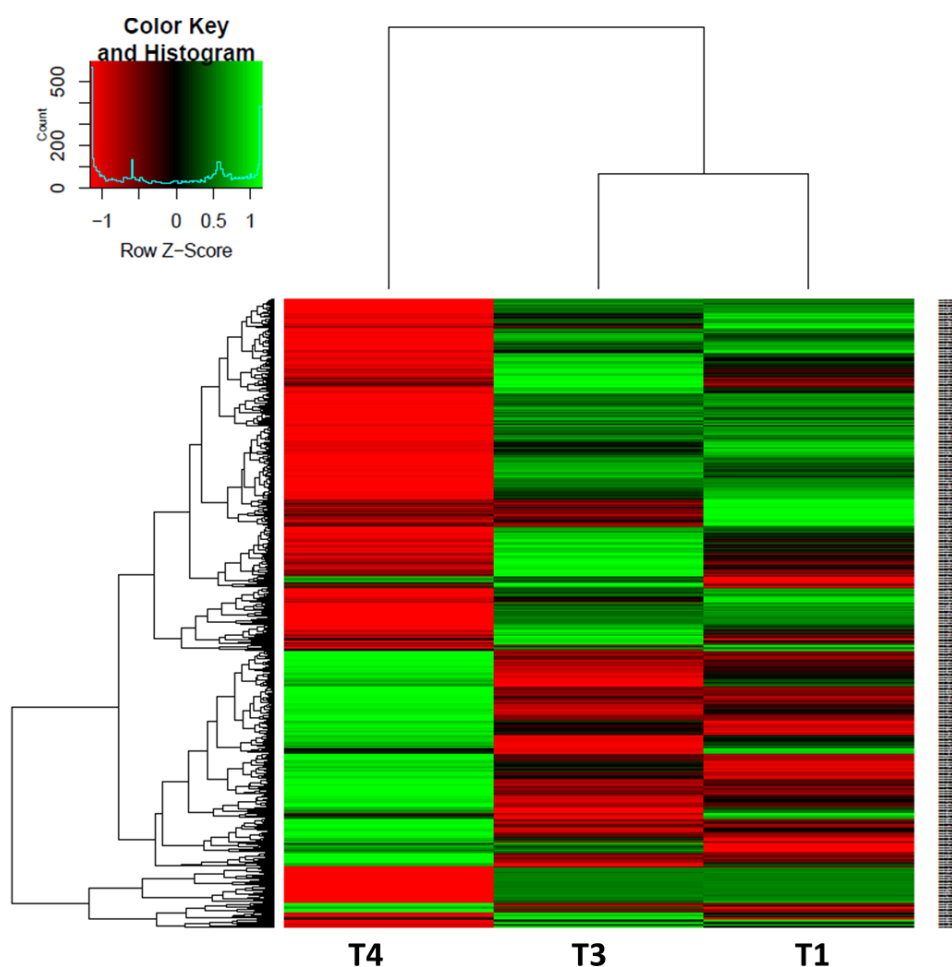


Figura 4.8: Visualización de mapas de calor (*heatmap*) de genes expresados diferencialmente (DEG) en plantas de sorgo dulce inoculadas con T1: *P. dispersa* UYSB45 T3: *H. rubrisubalbicans* M1 y T4: Plantas de sorgo dulce sin inocular. Se utilizaron los DEG con un fold change ≥ 4 El color rojo representa una expresión más baja y el color verde corresponde a una expresión alta.

Para determinar presencia, ausencia y genes compartidos en el transcriptoma de *S. bicolor* entre tratamientos (T1, T3 y T4), se construyeron diagramas de Venn (Figura 4.9A). En la Figura de los diagramas de Venn se representan los 1860 genes expresados diferencialmente (DEGs). De las comparaciones realizadas se desprende aquellos genes inducidos o reprimidos para las siguientes comparaciones: T1 vs T4, T3 vs T4 y T1 vs T3. Donde la comparación T1 vs T3 nos permite ver los genes de sorgo dulce expresados en presencia de inóculo bacteriano, T1 vs T4 muestra los genes de sorgo expresados diferencialmente al inocularse la cepa UYSB45 y por último la comparación T3 vs T4 son los genes de sorgo expresados diferencialmente al inocularse la cepa M1. De estas comparaciones, 501 genes de la planta fueron inducidos en respuesta a la inoculación bacteriana, por otro lado 189 genes de la planta fueron reprimidos como respuesta a la inoculación bacteriana (Figura 4.9A).

Luego, utilizando el software InterProScan se procedió a la anotación funcional de los DEGs. La anotación con GO, permite la comparación entre categorías (Anexo III, Tabla A14). Por último, se realizó la representación por Self-Organizing Maps (SOM) de los DEGs permitiendo la agrupación según su perfil de expresión (nodos) (Figura 4.9B). Los resultados mostraron que los DEG se agruparon en 6 nodos distintos, pudiendo representar los genes expresados en distintas etapas de la respuesta a la colonización bacteriana.

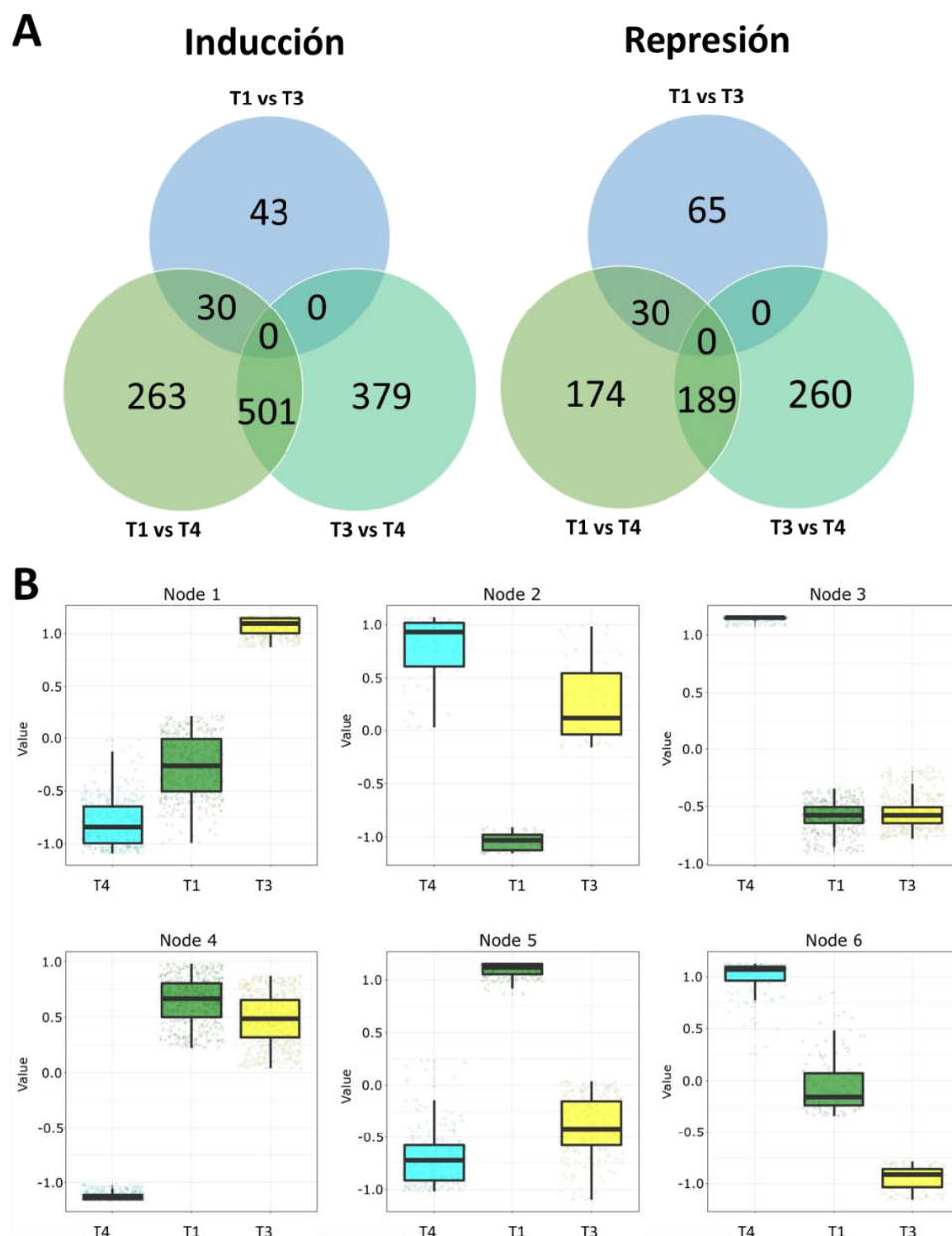


Figura 4.9: A: Diagrama de Venn que muestra los DEGs inducidos o reprimidos como respuesta a la inoculación bacteriana. Los datos representan el número de genes con un *fold change* ≥ 4 . B: SOM (Self-Organizing Maps) de los DEGs. Las líneas y barras horizontales en cada boxplot representan la mediana y los valores máximo y mínimo de la abundancia de los transcritos. T1: *P. dispersa* UYSB45-plantas de sorgo dulce. T3: *H. rubrisubalbicans* M1-plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce.

En la tabla 4.5 se muestra la distribución de las distintas categorías G.O según los nodos obtenidos para cada SOM. Cabe destacar que muchos de los genes representados en dichas gráficas pueden estar comprendidos en distintas categorías. Por lo que no son el número único de genes, sino las distintas comparaciones que equivalen a los 1860 genes expresados diferencialmente.

Tabla 4.5: Recuentos de genes dentro de las 3 principales categorías GO, según agrupación por nodo

Categorías GO	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Total
Función Molecular	112	474	97	93	346	271	1393
Componente Celular	30	5	2	25	3	-	65
Procesos Biológicos	133	176	167	62	317	205	1060
Total	275	655	266	180	666	476	2518

Dentro de las 3 categorías generales nombradas en la tabla 3.5, se agrupan otras subcategorías más específicas relacionadas a la respuesta de la planta a la infección bacteriana. Dentro de los genes de interés, están los receptores de plantas ampliamente descritos como relacionados a dicha función (tabla A14 Anexo III, Figura 4.10).

Entre ellos se encuentran genes que codifican para proteínas relacionadas a la patogenicidad, como por ejemplo las enzimas quitinasa y un precursor de la β -glucanasa.

Por otro lado, los genes de resistencia (genes R) son genes presentes en los genomas de las plantas que mediante la producción de proteínas R, les confieren resistencia a las enfermedades frente a patógenos. La clase principal de genes R consiste en un dominio de unión de nucleótidos (NB) y un dominio de repetición rica en leucina (LRR), denominados a menudo como genes R (NB-LRR) o NLR. Dentro de estos, en el transcriptoma de *S. bicolor* en T1, T3 y T4 se encontraron genes que codifican para los diferentes tipos de receptores LRR, RLK, WAK, lectina y CC-NBS-LRR. También se encontraron genes DEAD-box que pertenecen a la familia de las helicasa de ARN y están asociados a la respuesta por estrés abiótico.

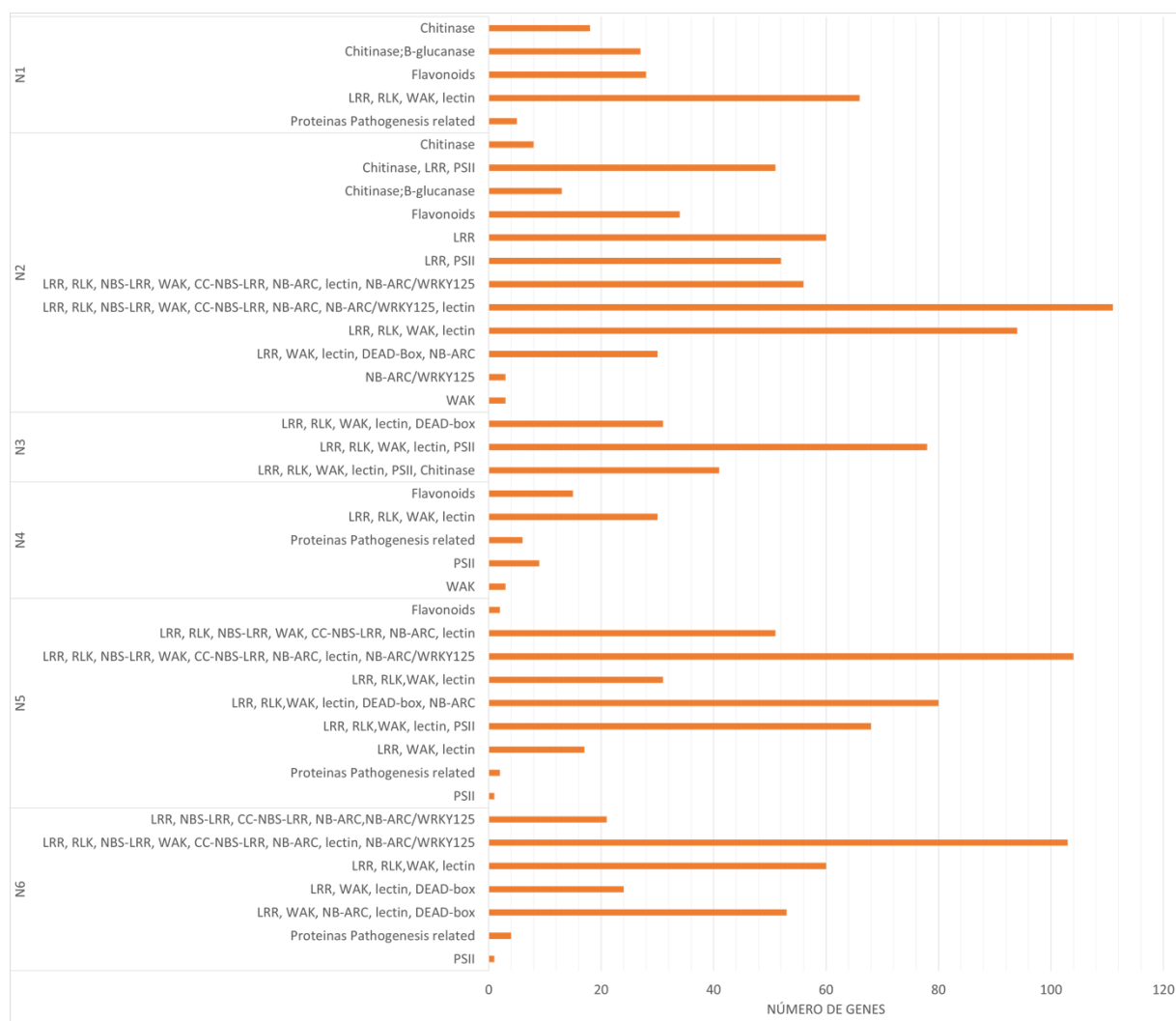


Figura 4.10: Representación gráfica del recuento de los receptores de plantas relacionados a la respuesta a la inoculación bacteriana y su distribución por nodos (tabla A14 Anexo III).

Dentro de los genes vegetales que resultan de interés por su relación con la respuesta a la inoculación bacteriana, se identificaron DEG que codifican para proteínas involucradas en la ruta metabólica de algunos flavonoides, así como también genes relacionados a los fotosistemas (WRKY125) (tabla A14 Anexo III, Figura 4.10).

Particularmente, se estaba interesado en identificar los posibles genes de la planta involucrados en la interacción planta-bacteria. Para esto el análisis se complementó con la anotación de los transcritos identificados como DEGs, mediante el servicio KAAS (KEGG Automatic Annotation Server), en los mapas nombrados: interacción planta-patógeno y transducción de señales de fitohormonas en dicho sitio web. Una vez que se contaba con los transcritos que se habían encontrados en esas vías, se realizó la búsqueda de los valores de expresión TPM para dichos DEGs.

En primer lugar, dentro de estos DEGs se buscaron genes relacionados a la transducción de señales de fitohormonas (Figura 4.11).

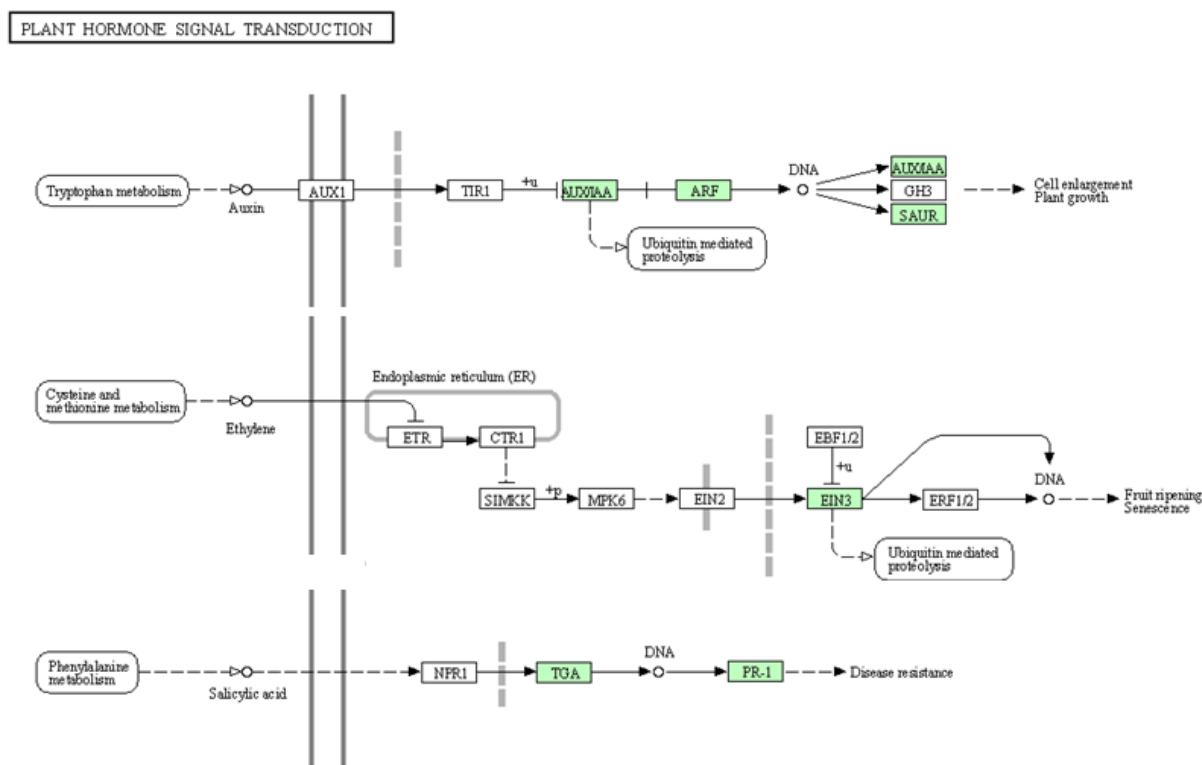


Figura 4.11: Transducción de señales de fitohormonas. Los recuadros coloreados indican genes que se encontraron en el transcriptoma de *S. bicolor* (verde) o no (blanco). Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y la base de datos KEGG. Los genes y los valores de expresión se muestran en la tabla 3.6.

Una vez identificados en la Figura 4.11 los genes encontrados en el transcriptoma de sorgo dulce se listaron los mismos en la tabla 4.6 junto a sus correspondientes valores de expresión en cada tratamiento.

Tabla 4.6: Listado de genes de interés involucrados en la transducción de señales de fitohormonas y sus respectivos valores TPM.

Gen	TPM			Transducción de señales de fitohormonas
	T1	T3	T4	
Sobic.003G291200.1	5.85	11.62	1.80	IAA, auxin-responsive protein IAA
Sobic.009G231800.2	6.95	2.35	0.00	ARF, auxin response factor
Sobic.004G038700.1	1.58	1.19	14.62	SAUR, SAUR family protein
Sobic.007G210700.4	4.23	1.97	0.00	EIN3, ethylene-insensitive protein 3
Sobic.001G390800.8	5.25	1.38	9.79	TGA, transcription factor TGA
Sobic.010G110100.1	1.08	8.10	1.01	TGA, transcription factor TGA
Sobic.010G020200.1	36.14	102.69	10.65	PR1, pathogenesis-related protein 1

TPM: Transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads. 0 ausencia del gen en el tratamiento correspondiente. Tratamientos: T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce

Los resultados permitieron identificar dentro de los DEGs genes pertenecientes a las proteínas reguladas por auxinas (IAA: Sobic.003G291200.1, SAUR: Sobic.004G038700.1) y el factor de respuesta a auxinas (ARF: Sobic.009G231800.2). Es interesante destacar que el valor TPM del gen IAA fue un orden mayor en el tratamiento con la bacteria patógena *H. rubrisubalbicans* M1 (T3) en comparación con los otros tratamientos.

Por otro lado, también se encontró uno de los genes intermediarios en la vía de la señalización por Etileno (ET) (EIN3, Sobic.007G210700.4). En este caso, el valor TPM en T4 es 0 y en T1 (inoculación con bacteria PCV) es el doble que el observado en T3 (inoculación con bacteria fitopatógena).

Por último, se identificaron genes intermediarios de la vía del ácido salicílico (SA) (Tabla 4.6, Figura 4.11). El factor de transcripción TGA: Sobic.010G110100.1, está mayormente expresado en T3, mientras que el factor de transcripción TGA: Sobic.001G390800.8 tiene menores valores en T3 en comparación con T2 y T1. Por último, es de destacar que en el tratamiento con la bacteria fitopatógena (T3), el gen codificante para el receptor PR1 tiene valores de 1 orden más en comparación con los 2 tratamientos restantes. Esto es de esperar, dado que PR1 es un gen comúnmente inducido durante PTI (por sus siglas en inglés, “*PAMP-triggered immunity*”).

Por otro lado, dentro de los DEGs se buscaron también genes relacionados a la interacción planta-patógeno (Figura 4.12).

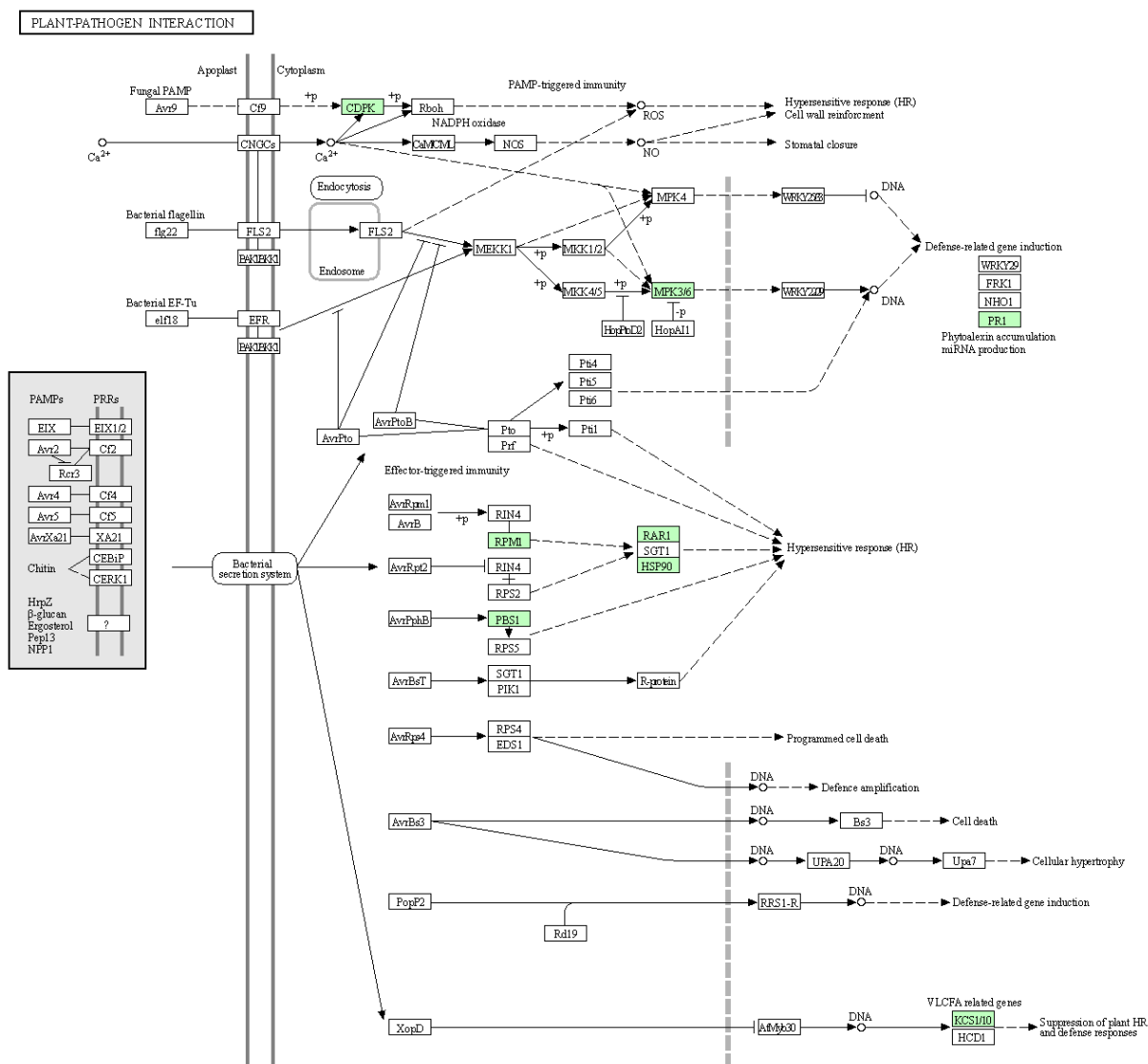


Figura 4.12: Esquema mostrando las vías y sus genes relacionados en el reconocimiento del patógeno por parte de la planta durante la interacción planta-patógeno. Los recuadros coloreados indican genes que se encontraron en el transcriptoma de *S. bicolor* (verde) o no (blanco). Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y la base de datos KEGG. Los genes y los valores de expresión se muestran en la tabla 3.7.

Una vez identificados en la Figura 4.12 los genes encontrados en el transcriptoma de sorgo dulce relacionados al reconocimiento del patógeno por parte de la planta, los mismos se listaron en la tabla 4.7 junto a sus correspondientes valores de expresión en cada tratamiento.

Tabla 4.7: valores TPM y algunos de los genes de interés involucrados en la interacción planta-patógeno

Gen	TPM			Interacción planta-patógeno
	T1	T3	T4	
Sobic.009G260650.2	3.80	2.13	0.08	CDPK, calcium-dependent protein kinase
Sobic.001G410100.2	10.56	16.13	2.08	MPK3, mitogen-activated protein kinase 3
Sobic.002G023300.1	66.60	448.49	17.59	PR1, pathogenesis-related protein 1
Sobic.001G291000.1	0.80	0.04	5.88	RPM1, RPS3, disease resistance protein RPM1
Sobic.005G047700.3	5.52	7.23	1.73	RPM1, RPS3, disease resistance protein RPM1

Gen	TPM			Interacción planta-patógeno
	T1	T3	T4	
Sobic.005G092600.1	4.42	9.71	2.94	RPM1, RPS3, disease resistance protein RPM1
Sobic.004G167100.2	22.79	0.25	0.00	RAR1, disease resistance protein
Sobic.006G005600.1	15.75	2.97	1.03	HSP90A, htpG, molecular chaperone HtpG
Sobic.006G054700.3	4.03	5.26	1.43	PBS1, serine/threonine-protein kinase PBS1
Sobic.001G354700.1	23.36	37.74	10.63	KCS1/10, 3-ketoacyl-CoA synthase

TPM: Transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads. 0 ausencia del gen en el tratamiento correspondiente. Tratamientos: T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce

Para los 3 primeros genes listados en la tabla 4.7, involucrados en la regulación de la respuesta PTI, se observaron valores 1 y 2 órdenes mayores en los tratamientos T1 y T3 en comparación con T4, (Sobic.009G260650.2, Sobic.001G410100.2 y Sobic.002G023300.1). Al igual que lo sucedido en la sección de la transducción de señales de fitohormonas, el gen PR1 (Sobic.002G023300.1) presenta valores de un orden más en T3 al ser comparado con T1 y T4. Continuando con la misma tendencia, los valores en T3 fueron mayores en comparación con T1 y T4 en los genes codificantes para la proteína RPM1 (Sobic.005G047700.3 y Sobic.005G092600.1), gen involucrado en la respuesta HR (por sus siglas en inglés, “*Hypersensitivity response*”). La resistencia mediada por genes-R se asocia en la mayoría de los casos con la activación de una reacción de muerte de la célula huésped. Dentro de la respuesta mediada por genes-R, encontramos que los genes que codifican para las proteínas RAR1 y HSP90A (Sobic.004G167100.2 y Sobic.006G005600.1) tuvieron valores mayores de TPM en T1 (inoculación con la bacteria PCV) en comparación con los 2 tratamientos restantes. Por último, los genes que codifican para las proteínas PBS1 y KCS1/10 (Sobic.006G054700.3 y Sobic.001G354700.14.03 respectivamente) y que están relacionadas al reconocimiento de sistema de secreción bacteriano desencadenante de la respuesta HR, también presentaron valores de TPM mayores en T1 y T3 (plantas inoculadas) (tabla 4.7).

4.9.4 Perfil transcripcional de la cepa *P. dispersa* UYSB45 durante la interacción con plantas de sorgo dulce

Para el análisis de los genes bacterianos obtenidos en las muestras T1, T2 y T3 el procedimiento utilizado fue el mismo que en la sección anterior. Una vez que los transcriptos fueron mapeados contra el genoma de referencia correspondiente, se procedió a la anotación funcional de los mismos utilizando el software InterProScan. Posteriormente, los genes

fueron clasificados en categorías GO. Pudiendo encontrarse el mismo gen dentro de 1 categoría GO o más.

En la Figura 4.13 se observan los porcentajes relativos de cada gen dentro de una misma categoría en referencia al total de genes en dicha categoría GO en cada tratamiento.

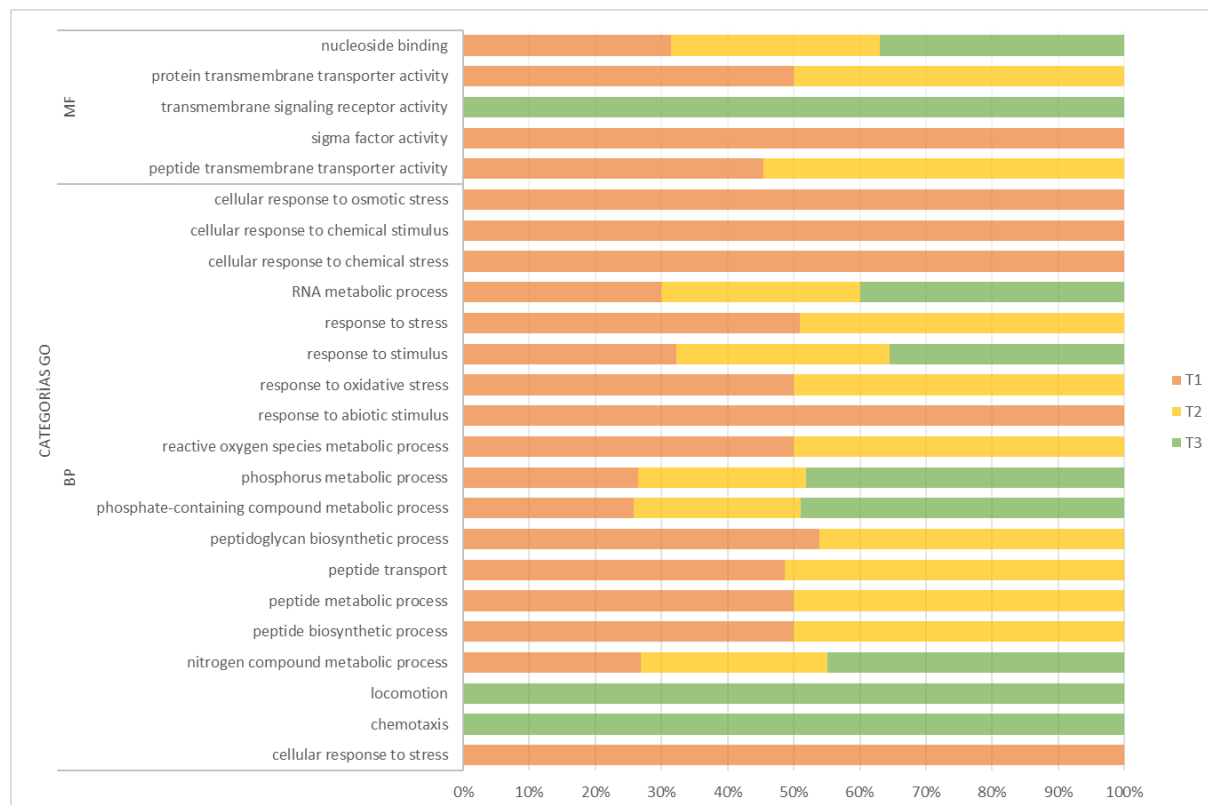


Figura 4.13: Distintas categorías GO y su porcentaje relativo al total de categorías GO encontrados en los tratamientos T1, T2 y T3. MF: Función Molecular. BP: Procesos Biológicos.

Al analizar específicamente los transcritos de *P. dispersa* UYSB45 pertenecientes a los tratamientos T1 y T2, se identificaron genes compartidos entre los dos estilos de vida de la bacteria en vida libre y endófito. Los genes en ambos escenarios resultan de interés por su relación con la interacción bacteria-planta. En la tabla 4.8 se listan algunos de estos con sus correspondientes TPM, reflejando en que estilo de vida el gen fue inducido.

Tabla 4.8: Algunos de los genes detectados en los tratamientos T1 y T2 y sus TPM correspondientes

Gen	TPM		Rol	GO
	T1	T2		
UYSB45.4611	80	1832	2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase I alpha	GO:0009086methionine biosynthetic process
UYSB45.4420	30	156	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	GO:0009061anaerobic respiration
UYSB45.1593	1213	5890	ABC transporter, permease protein 1 (cluster 1, maltose/g3p/polyamine/iron)	GO:0046872metal ion binding
UYSB45.189	35	467	ABC transporter, substrate-binding protein (cluster 3, basic aa/glutamine/opines)	GO:0015276ligand-gated ion channel activity
UYSB45.1568	85	466	ABC transporter, substrate-binding protein (cluster 5, nickel/peptides/opines)	GO:0000162tryptophan biosynthetic process
UYSB45.1069	3964	846	Acyl carrier protein	GO:0006633fatty acid biosynthetic process
UYSB45.2625	195	46	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnL	
UYSB45.4206	65	269	Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase	GO:0016491oxidoreductase activity
UYSB45.1883	978	183	Anthranilate synthase, amidotransferase component	
UYSB45.2245	112	1255	Arsenic efflux pump protein	GO:0055085transmembrane transport
UYSB45.2145	189	812	Arsenical resistance operon repressor	
UYSB45.3440	175	888	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	GO:0006529asparagine biosynthetic process
UYSB45.2666	15	78	CidA-associated membrane protein CidB	GO:0016021integral component of membrane
UYSB45.1677	72	363	Cystathionine gamma-synthase	GO:0003676nucleic acid binding
UYSB45.400	3383	233	Exopolysaccharide production protein YjbE	GO:0045226extracellular polysaccharide biosynthetic process
UYSB45.310	85	18	Holin-like protein CidA	GO:0016021integral component of membrane
UYSB45.2037	32	262	hypothetical protein	
UYSB45.3643	96	448	Isocitrate dehydrogenase phosphatase/kinase	GO:0009067aspartate family amino acid biosynthetic process
UYSB45.371	28	118	Isocitrate lyase	GO:0006865amino acid transport
UYSB45.407	186	17	Isocitrate lyase	GO:0004451isocitrate lyase activity
UYSB45.2808	7	55	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase	
UYSB45.3329	497	1997	Blue copper oxidase CueO precursor	GO:0005507copper ion binding
UYSB45.3547	266	1242	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase; Copper-translocating P-type ATPase	GO:0019829ATPase-coupled cation transmembrane transporter activity

Gen	TPM		Rol	GO
	T1	T2		
UYSB45.382	53	362	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase; Copper-translocating P-type ATPase	GO:0019829ATPase-coupled cation transmembrane transporter activity
UYSB45.1567	69	618	Lipase	
UYSB45.3784	43	268	Malate synthase	GO:0009067aspartate family amino acid biosynthetic process
UYSB45.2272	73	375	Mobile element protein	GO:0015074DNA integration
UYSB45.1417	216	949	Molybdenum ABC transporter permease protein ModB	GO:0009102biotin biosynthetic process
UYSB45.4227	65	517	Nitrate reductase cytochrome c550-type subunit	GO:0042128nitrate assimilation
UYSB45.4229	67	393	Nitrite transporter NirC	GO:0055085transmembrane transport
UYSB45.2911	34	139	Nitrogen regulatory protein P-II, GlnK	GO:0006808regulation of nitrogen utilization
UYSB45.3480	1497	287	Outer membrane porin OmpC	GO:0015288porin activity
UYSB45.4712	107	446	Outer membrane porin OmpF	GO:0015419ATPase-coupled sulfate transmembrane transporter activity
UYSB45.15	105	546	Outer membrane protein V OmpF	GO:0009067aspartate family amino acid biosynthetic process
UYSB45.4228	50	453	Periplasmic nitrate reductase	GO:0008942nitrite reductase [NAD(P)H] activity
UYSB45.237	475	92	Phosphonate ABC transporter ATP-binding protein PhnC	
UYSB45.2273	3472	26	Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE1	GO:0015416ABC-type phosphonate transporter activity
UYSB45.234	152	37	Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE2	
UYSB45.235	151	31	Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein PhnD	
UYSB45.2824	7910	1390	Phosphonates utilization ATP-binding protein PhnK	
UYSB45.483	130	566	Positive transcription regulator EvgA	GO:0009073aromatic amino acid family biosynthetic process
UYSB45.2635	11	183	probable DNA-binding prophage protein YPO1092	GO:0016787hydrolase activity
UYSB45.1566	75	446	putative exported protein	GO:0004049anthranilate synthase activity
UYSB45.2012	67	12	Ribose ABC transport system, ATP-binding protein RbsA	GO:0015752D-ribose transmembrane transport
UYSB45.733	1182	264	RND efflux system, membrane fusion protein	GO:0003677DNA binding
UYSB45.2068	64	335	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	GO:0006069ethanol oxidation
UYSB45.3476	3654	12596	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	GO:1901363heterocyclic compound binding
UYSB45.2750	32	170	SSU ribosomal protein S20p	GO:0000287magnesium ion binding
UYSB45.4421	28	150	Sulfate-binding protein Sbp	GO:0030151molybdenum ion binding
UYSB45.2111	263	1093	Thiaminase IIinvolved in salvage of thiamin pyrimidine moiety	GO:0015288porin activity
UYSB45.3239	2603	584	Thiosulfate reductase cytochrome B subunit (membrane anchoring protein)	GO:0006412translation

Gen	TPM		Rol	GO
	T1	T2		
UYSB45.2062	113	25	Two-component system sensor histidine kinase/response regulator hybrid	GO:0000155phosphorelay sensor kinase activity
UYSB45.3585	71	291	Uncharacterized protein STM4441	GO:0072488ammonium transmembrane transport
UYSB45.4485	12	56	Uncharacterized protein YfgJ	GO:0071978Bacterial-type flagellum-dependent swarming motility
UYSB45.1152	155	8	Uncharacterized protein YmdF	
UYSB45.1166	1154	85	Uncharacterized protein YmdF	GO:0005829cytosol
UYSB45.1882	47	268	Uncharacterized protein YodC	GO:0016491oxidoreductase activity
UYSB45.3949	7330	990	Uncharacterized protein YtfK	GO:0006979response to oxidative stress
UYSB45.3830	106	10	UPF0304 protein YfbU	GO:0006974cellular response to DNA damage stimulus
UYSB45.341	2310	560	UPF0337 protein YjbJ	GO:0005829cytosol

En color se muestran los que valores que están por encima del valor promedio de los TPM

Entre los genes inducidos en mayor proporción en T1 (*P. dispersa* UYSB45 endófito) que en T2 (*P. dispersa* UYSB45 planctónica) a destacar están: **1-** los relacionados a la respuesta por estrés (UYSB45.3949, UYSB45.1166); **2-** los genes codificantes para proteínas transmembranas (UYSB45.2273, UYSB45.3480); y **3-** los genes codificantes para proteínas de membrana (UYSB45.1069, UYSB45.400, UYSB45.733, UYSB45.3239 y UYSB45.341).

Por otro lado, los genes inducidos en mayor proporción en T2 fueron los relacionados al transporte y reconocimiento de metales pesados como unión a ion metálico (UYSB45.1593), unión a cobre (UYSB45.3329), a la actividad de transporte transmembrana (UYSB45.3547, UYSB45.382, UYSB45.2245 y UYSB45.2808) y a otros metales pesados (UYSB45.1417 y UYSB45.4421). Asimismo, se observó una expresión diferencialmente mayor en este tratamiento para el gen codificante para la proteína YfgJ, relacionado al movimiento bacteriano por *swarming*.

Otro grupo de genes de interés y que están expresados en ambas condiciones pero sin diferencia significativa de expresión entre planctónica (T2) y endófito (T1), fueron aquellos relacionados a la PCV y colonización bacteriana (tabla 4.9). Entre ellos los genes expresados a destacar son los del sistema Sec-SRP (Figura 1.10), relacionados tanto al sistema de secreción bacteriano, como a la exportación de proteínas y a al *quorum sensing* (259). Por otro lado, también se detectaron transcritos de los genes involucrados en la síntesis del AIA, así como de sideróforos (tabla 4.9).

Tabla 4.9: Genes de interés encontrados en T1 y T2.

Gen	Rol
UYSB45.3140	Protein translocase membrane subunit SecG
UYSB45.3631	Protein translocase subunit SecF
UYSB45.3632	Protein translocase subunit SecD
UYSB45.681	Protein translocase subunit SecE
UYSB45.246	Nitrilase (EC 3.5.5.7). Siderophore
UYSB45.2258	Pyruvate metabolism II: acetyl-CoA, ipdC
UYSB45.195	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)
UYSB45.3128	Enterobactin synthetase component F, serine activating enzyme (EC 2.7.7.-)
UYSB45.3121	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (EC 2.7.7.58) [enterobactin] siderophore
UYSB45.3120	[enterobactin] siderophore EntB (EC 3.3.2.1)

Por otro lado, también se encontraron genes expresados exclusivamente en *P. dispersa* UYSB45 endófito (T1). Aquellos que se encontraron únicamente en T1 se agruparon en las siguientes categorías GO: *response to abiotic stimulus*, *response to stimulus*, *response to*

stress, cellular response to chemical stress, response to chemical stimulus, response to osmotic stress, sigma factor activity y por último la categoría GO *nucleoside binding* (Anexo III, tabla A17).

Dentro de las categorías mencionada, algunos de los genes expresados en *P. dispersa* UYSB45 endófito, que están relacionados a la protección a diferentes tipos de estrés, son la trehalasa periplasmática, la proteína A relacionada a la inanición de C (Sistema de Dos Componentes, SDC), el inhibidor de la división celular y genes varios relacionados a la reparación y preservación del ADN (Anexo III, tabla A17). Los genes pertenecientes a los sistemas de secreción bacterianos también fueron detectados, el Sistema de Secreción Tat (UYSB45.4603) y uno de los genes pertenecientes al SST6 (UYSB45.491). Por último, se identificó un gen que codifica para una posible proteína YcgZ (UYSB45.1157), relacionada al SDC regulador de la formación de biopelícula (RcsBC, Figura 2.11 y 2.13).

Por último, cuando se analizaron los genes bacterianos obtenidos en T3 (plantas inoculadas con *H. rubisubalbicans* M1 fitopatogénica), se encontraron genes previamente reportados en esta cepa en la interacción con la planta de sorgo dulce (104). Estos fueron los relacionados a la colonización en plantas de sorgo (*bcsAB*) así como genes relacionados a la quimiotaxis, *cheABDVWI* (28, 260) (Anexo III, tabla A18). Curiosamente, no se encontró el gen relacionado al SST3 siendo éste el asociado a la enfermedad RSD (52).

Discusión

4.10 *Sorghum bicolor* cv. ADV2010 es susceptible a *H. rubrisubalbicans* M1, agente causante de RSD

Herbaspirillum rubrisubalbicans es el agente causal de la enfermedad de la raya roja (RSD) y la enfermedad de la raya moteada de en plantas de sorgo y caña de azúcar, respectivamente (47, 104). En el trabajo donde se propone a dicha cepa como fitopatógeno modelo para el estudio del sistema inmunológico de *Sorghum bicolor*, se inocularon 63 genotipos de *Sorghum bicolor* con *H. rubrisubalbicans*, de los cuales 59 mostraron síntomas de RSD (104). Nuestro resultado contribuye al agregado de un cultivar utilizado en Uruguay donde dicha cepa tiene el mismo efecto fitopatogénico. Siendo un excelente modelo para este trabajo donde nos planteamos dilucidar si existe una respuesta diferencial en la planta al ser colonizada por una bacteria PCV o por una bacteria fitopatogénica.

4.11 Análisis de los transcriptos obtenidos mediante la técnica *dual RNA-seq*

Las plantas están colonizadas en su superficie (rizósfera y filósfera), por una multitud de microorganismos diferentes, así como internamente por los endófitos. La mayoría de éstos últimos actúan como comensales sin ningún efecto conocido sobre su hospedero, pero múltiples bacterias y hongos establecen una relación mutualista con las plantas y algunos actúan como patógenos (261). En estas interacciones, los organismos involucrados, modulan su expresión génica con el fin de establecer desde relaciones patógenas hasta beneficiosas (262). El resultado de estas interacciones planta-microorganismo depende de factores ambientales bióticos y abióticos, así como del genotipo del hospedero y del microorganismo que interactúa (261). Sin embargo, la forma en que las plantas reconocen y responden ante estas dos situaciones opuestas sigue siendo muy poco conocida (263). Asimismo, la composición y actividad de la microbiota endofítica y las múltiples interacciones entre sus miembros, incluidos los patógenos, tienen una profunda influencia en la función del sistema vegetal (261), siendo un desafío su estudio. En este sentido, apenas se comprenden algunos de los mecanismos moleculares involucrados en el reconocimiento y colonización de las plantas por las bacterias endofíticas (264). Teniendo en cuenta la falta de información así como lo fundamental de entender las relaciones microbioma-planta, es que en este trabajo

se buscó identificar genes bacterianos y de la planta, expresados durante las interacciones PCV y patogénica. Para estudiar estos cambios en el transcriptoma, la secuenciación de ARN (RNA-seq) se ha convertido en el método por excelencia a utilizar (262). Particularmente la técnica de *dual RNA-seq*, permite evaluar simultáneamente el transcriptoma de dos (o más) socios que interactúan, separando el ARN de ambas especies *in silico* en lugar de físicamente, evitando así sesgos de manipulación experimental (262). Asimismo, el enfoque secuencial, empleado en este trabajo para el análisis de los transcriptomas, ha sido el método de mapeo más comúnmente utilizado en trabajos similares (105). Sin embargo, una de las limitaciones del *dual RNA-seq* es la subrepresentación del material endofítico, en los tejidos vegetales (88). En este trabajo el número de transcriptomas encontrado en los tratamientos mixtos (transcriptos vegetales y bacteriano), fue consistente para ambas bacterias (PCV y fitopatógena), pero claramente menor en comparación con el transcriptoma de la planta (aproximadamente 3x). Esta cifra está en concordancia con otro trabajo en el que se estudió el transcriptoma de la bacteria endófita *Burkholderia phytofirmans* PsJN colonizando plantas de papa (93).

Por otro lado, cuando se analizó el número de transcriptos bacterianos, tanto del tratamiento sin inocular (T4), así como del tratamiento inoculado con la cepa fitopatógena (T3), se detectaron en el orden de 300 transcriptos que mapearon en el genoma de la cepa *P. dispersa* UYSB45 (tabla 4.4, capítulo 4). Dado que dicha bacteria no fue inoculada en ninguno de estos tratamientos, la presencia de estos puede estar explicada por el hecho de que la cepa UYSB45 se encuentre como endófito en la semilla de sorgo, y sea esta una de las vías de colonización (265). En un trabajo similar, empleando la misma técnica de *dual RNA-seq* en la interacción *Azospirillum brasilense* y plantas de *Triticum aestivum* (trigo), también detectan transcriptos pertenecientes a la bacteria endófita en el tratamiento sin inocular, a diferencia que en nuestro caso los números fueron menores que el trabajo mencionado (101).

A su vez, en el caso del tratamiento T4 (plantas sin inocular) y T1 (plantas inoculadas con *P. dispersa* UYSB45), también se detectaron transcriptos que mapearon con el genoma de la cepa *H. rubrisubalbicans* M1. El número de transcriptos de la cepa M1 fue de un orden menor que el observado para el caso de la cepa UYSB45, y dos órdenes menos que el tratamiento inoculado con la bacteria fitopatógena. Esto también podría indicar que la bacteria fitopatógena está presente como endófito de semilla pero en menor número que la cepa PCV *P. dispersa* UYSB45.

4.12 Transcriptoma de la interacción entre plantas de sorgo dulce y la bacteria PCV o fitopatógena

4.12.1 Cambios transcripcionales diferenciales en la planta en respuesta a la interacción con bacterias.

Una vez identificados los 1860 genes expresados diferencialmente (DEGs) en todos los tratamientos, los mismos fueron agrupados por el algoritmo SOM, considerando que los genes con patrones de expresión similares probablemente posean funciones similares o participen en las mismas vías reguladoras (266, 267).

Según el análisis de clústeres, los DEGs tienen 6 patrones de agrupamiento (nodos) que podrían estar mostrando las distintas etapas de la respuesta de la planta a la colonización (Figura 4.9B).

Los nodos 1, 3 y 4 representan la respuesta de la planta a la interacción. Según el comportamiento de los datos y la información de las categorías GO en la tabla A14 (Anexo III) podemos inferir que el nodo 1 es el punto de partida de la infección patogénica T3 (*H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce). Esto está basado en que se observan genes inducidos diferencialmente en el tratamiento T3, en relación con los tratamientos T1 (inoculado con la bacteria PCV) y T4 (plantas sin inocular). Utilizando la misma línea de pensamiento, al enfrentarnos con el patrón de expresión de los DEGs en el nodo 3 y 4 estamos ante la represión de genes en presencia del inóculo bacteriano (nodo 3) y la inducción de genes ante la presencia del inóculo bacteriano (nodo 4). Estas últimas comparaciones son en relación con la expresión del control sin inocular (T4).

Por otro lado, los nodos 5 y 6 también representan la respuesta de la planta a la inoculación bacteriana. Pero en este caso, según lo que se observa en el SOM y la información de las categorías GO (Figura 4.9B, Tabla A16-Anexo III) el nodo 5 muestra los genes inducidos en la presencia de la bacteria PCV mientras que en el nodo 6, es el grupo de genes que se inhiben ante la presencia del inóculo bacteriano.

En una primer instancia, para comprender la respuesta de la planta a la inoculación bacteriana nos enfocamos en los DEGs comprendidos en los nodos 1, 3 y 4. En la tabla A15, se listan algunos de los DEGs seleccionados y sus valores de expresión dentro de dichos nodos medidos en TPM (*Transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads*). En la misma se observa que en los nodos 1, 3 y 4 se identificaron genes codificantes para receptores relacionados a la respuesta por estrés en las plantas, concordando con lo observado en los SOMs. Complementariamente y con el fin de obtener una visión general completa de los procesos biológicos en las plantas de sorgo, cuando son inoculadas con bacterias (PCV o fitopatógene), se realizó un análisis con el software MapMan.

En la Figura 4.15 (A) se muestra una descripción general de la expresión de genes involucrados en la procesos hormonales y redox de la planta, en respuesta a la inoculación con *P. dispersa* UYSB45, en comparación con el control sin inocular. La misma muestra que los genes inducidos (en azul), están relacionados a la regulación hormonal de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA). A su vez, dentro de los genes involucrados en procesos redox, aquellos genes inducidos en su mayoría son los relacionados a la organización de la pared celular como las glutaredoxina y una enzima betaglucosidasa (enzimas dismutasa/catalasa). Nótese que uno de los genes relacionados a la regulación de la fitohormona AIA se reprime en presencia de la bacteria PCV.

Por otra parte, en el panel B de la Figura 4.15, se observa que los genes inducidos en el caso anterior (panel A, bacteria PCV), son los mismos reprimidos (rojo) en presencia de la bacteria fitopatógene *H. rubrisubalbicans* M1, por lo que se observa una respuesta opuesta en este conjunto de genes identificados dependiendo de si está presente una bacteria PCV o fitopatógene.

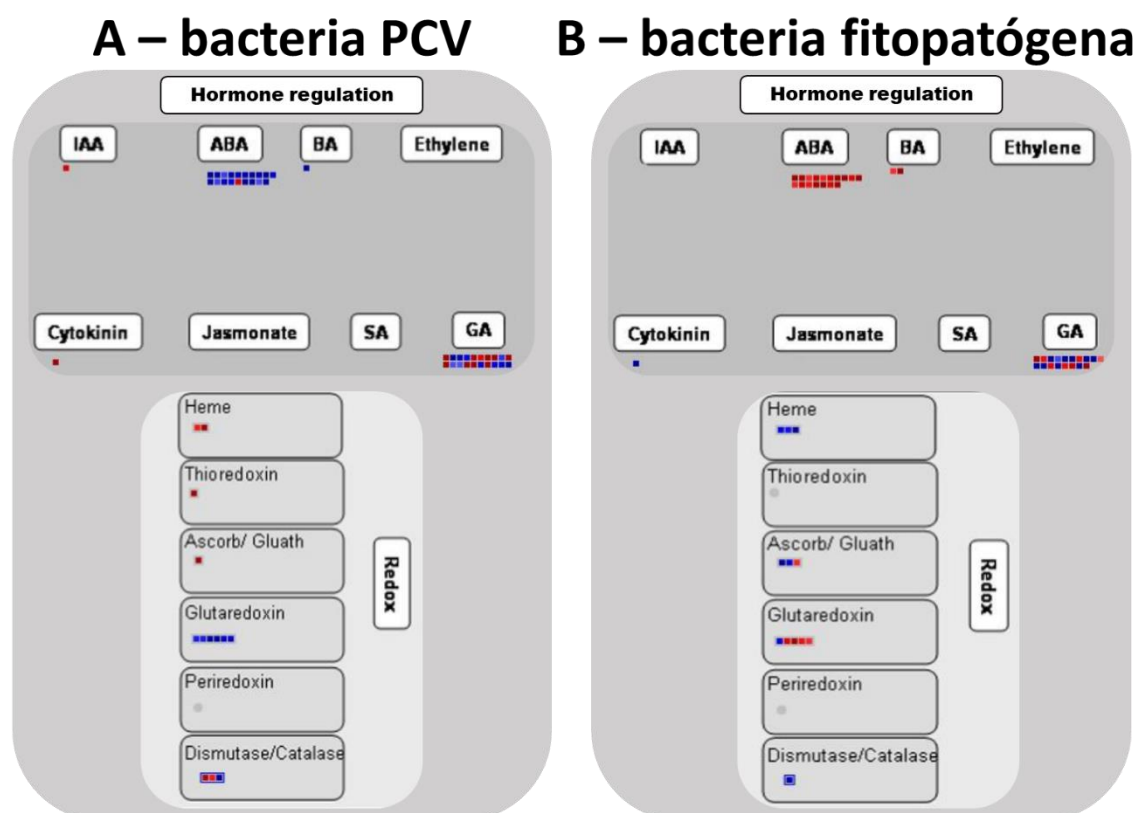


Figura E: Visualización del *heatmap* de los transcritos expresados diferencialmente (DEG) en plantas de sorgo involucrados en procesos regulatorios en plantas inoculadas con: (A) *P. dispersa* UYSB45 o (B) *H. rubrisubalbicans* M1, utilizando MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>). En ambas Figuras se muestra la descripción general de la regulación redox y regulación hormonal, así como las comparaciones de las correspondientes bacterias con los controles de las plantas sin inocular. El esquema se construyó utilizando sólo genes con *fold change* ≥ 4 . Los cuadrados pequeños representan genes inducidos (azul) o reprimidos (rojo). ABA, ácido abscísico; CK, citoquinina; ET, etileno; GA, ácido de giberelina; IAA, ácido indol-3-acético; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico.

Respuesta a estrés biótico y abiótico

Las plantas están continuamente expuestas a diversos estreses abióticos y bióticos en el entorno natural, por lo que han desarrollado diversos mecanismos de adaptación. Estos dependen de una variedad de vías de señalización para reaccionar ante dichas condiciones alteradas y de esta manera por ejemplo combatir los ataques de patógenos para sobrevivir. Estas vías de señalización relacionadas con el estrés están reguladas individualmente por fitohormonas, incluido el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), que pueden generar diversas respuestas fisiológicas tales como ajuste osmótico, movimiento de estomas y estallido respiratorio/oxidativo (268).

Utilizando el programa MapMan, se construyó una imagen a partir de los transcritos que se expresan en respuesta a la inoculación bacteriana, relacionados con la respuesta de la planta

al estrés biótico y abiótico (Figura 4.16). Para ello se compararon los tratamientos inoculados con las distintas bacterias (estrés biótico), con los controles sin inocular, permitiendo así visualizar de forma global la respuesta diferencial de la planta según la bacteria con la cual se inoculó.

En el panel A de la Figura 4.16, se observa como la inoculación de la bacteria endófito PCV *P. dispersa* UYSB45 genera una inducción (azul), en muchos de los genes relacionados con la respuesta al estrés biótico tales como los genes R, los relacionados al estallido respiratorio, a la señalización, así como a transcritos relacionados con factores de transcripción.

En contraste, estos mismos genes fueron reprimidos en términos generales (rojo), en el caso en el cual se inoculó la bacteria fitopatogénica *H. rubrisubalbicans* M1 (Figura 4.16, B).

Los resultados obtenidos en la interacción con la bacteria PCV se corresponden con los obtenidos cuando se estudió la respuesta a la inoculación de plantas de trigo con la endófito diazótrofa *Azospirillum spp.* en interacciones compatibles e incompatibles (142). En dicho trabajo también se identificaron como respuesta a la inoculación con la bacteria endófito, genes que codifican para peroxidasas, factores de transcripción de las familias MYB, WRKY y ERF, así como genes relacionados con la patogénesis (PR) (142). En otro estudio que complementa nuestros resultados, estudiaron la respuesta del plantas de maíz a la inoculación con las bacterias PCV *H. seropedicae* y *A. brasilense* (269). En el mismo identificaron, transcritos involucrados en las vías de respuesta del maíz al estrés biótico, particularmente los relacionados con la desintoxicación de especies ROS y la señalización de AIA, fueron identificadas en mayor medida en respuesta a la inoculación con la cepa *H. seropedicae* (269). En su conjunto esta evidencia revela que cada organismo podría desencadenar respuestas diferenciales en el hospedero.

En cuanto a la respuesta global, el análisis mostró que los transcritos asociados a genes relacionados al estado redox (inducidos y reprimidos), fueron los mismos en número, y algunos de ellos compartidos entre tratamientos (inoculación con la cepa PCV y la fitopatogénica) (Figura 4.16). Sin embargo, el número de genes relacionados al estrés biótico y a la pared celular, fue mayor cuando se inoculó la bacteria fitopatogénica (Figura 4.16 B).

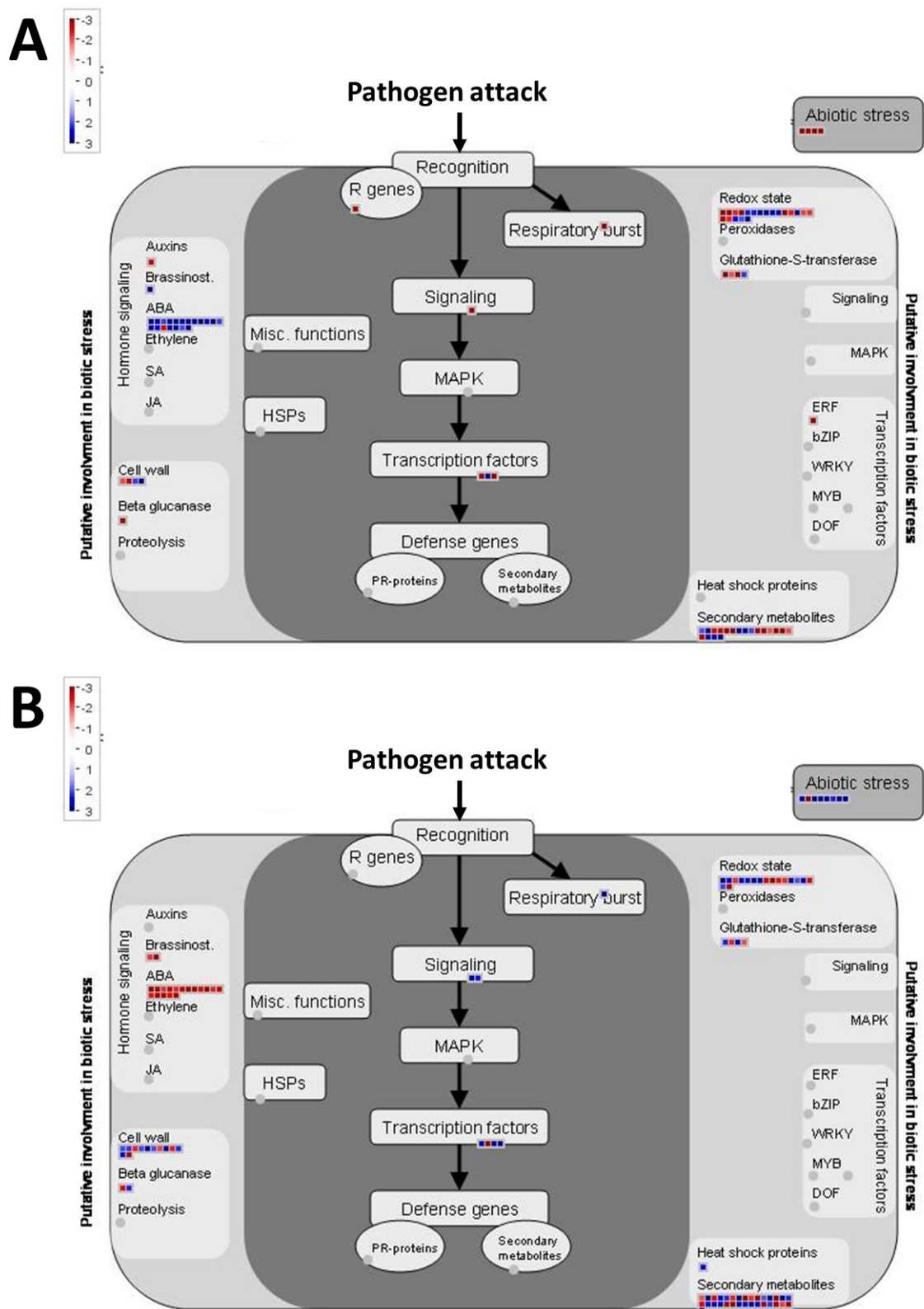


Figura F: Los transcritos expresados diferencialmente (DEG) en plantas de sorgo colonizadas por (A) *P. dispersa* UYSB45 o (B) *H. rubrisubalbicans* M1 fueron agrupadas según las categorías metabólicas mediante MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>). En ambas figuras se muestra la vías relacionadas con la respuesta al estrés biótico y abiótico. Asimismo se muestra las comparaciones de las correspondientes bacterias con los controles de las plantas sin inocular. El esquema se construyó utilizando sólo genes con *fold change* ≥ 4 . Los cuadrados pequeños representan genes inducidos (azul) o reprimidos (rojo).

Estudiando en detalle la identidad así como la expresión de los genes listados en la tabla A15, se destacan aquellos que codifican para las osmotinas. Estas proteínas antifúngicas sensibles al estrés, pertenecen a la familia relacionada con la patogénesis (PR)-5, y confieren tolerancia a los estreses bióticos y abióticos (270). Son proteínas expresadas diferencialmente y reguladas por el desarrollo vegetal protegiendo a las células del estrés osmótico y también de patógenos invasores, mediante alteraciones estructurales o metabólicas (270). En la tabla A15 se observa que la expresión de estas proteínas es mayor en los tratamientos inoculados con bacteria, pero dentro de estas se destacan los altos valores en el tratamiento con la fitopatógena. Esta es una evidencia más que apoya la idea que el nodo 1 representa la respuesta a la inoculación con la fitopatógena *H. rubrisubalbicans* M1.

Por otro lado, también se destacan las helicasas de ARN DEAD-box. Las mismas pertenecen a una gran familia de proteínas, las cuales algunas de ellas han sido identificadas por sus funciones biológicas en el crecimiento y desarrollo de las plantas así como relacionadas a las respuestas al estrés (271, 272). La participación de las helicasas de ARN DEAD-box en las respuestas al estrés de las plantas ha sido evidenciado en estudios en *Arabidopsis* (273). Tanto en nuestro trabajo como en el artículo donde proponen a *H. rubrisubalbicans* M1 como modelo fitopatógeno, estas helicasas fueron detectadas reprimidos ante la presencia de la bacteria fitopatógena (104).

Fotosíntesis/Fotosistemas

Los factores estresantes como la salinidad, la sequía y las altas temperaturas, así como la infección por patógenos, provocan alteraciones en una amplia gama de procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas. La fotosíntesis, proceso fisiológico fundamental en todas las plantas verdes, también se ve gravemente afectada en todas sus fases por tales estreses. Dado que el mecanismo de la fotosíntesis involucra varios componentes, incluidos los pigmentos fotosintéticos y los fotosistemas, el sistema de transporte de electrones y las vías de reducción de CO₂, cualquier daño causado por estrés puede reducir la capacidad fotosintética general de una planta (274). Los fotosistemas son una fuente potencial de ROS que pueden inducir respuestas de defensa y una HR en limitando el crecimiento de patógenos (275).

Según lo planteado previamente, el nodo 4 representa la inducción de genes ante la presencia del inóculo bacteriano. En este nodo se identificaron genes codificantes para los fotosistemas

I y II, cuya expresión fue mayor en presencia del inóculo bacteriano, pero aun mayor cuando la bacteria inoculada era la PCV *P. dispersa* UYSB45. Esto está ligado al hecho de que la inoculación bacteriana con una bacteria PCV en plantas, tiene el potencial de aumentar las tasas de fotosíntesis y el crecimiento de las plantas (276). Interesantemente estos resultados son similares a los obtenidos al inocular plantas de *Capsicum chinense* Jacq (morrón) y plantas de *Brassica napus* (canola) con bacterias PCV del género *Bacillus* spp. (276, 277).

Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios de plantas desempeñan muchas funciones, incluida la defensa contra patógenos, plagas y herbívoros; así como la respuesta al estrés ambiental y la mediación de las interacciones entre organismos. De manera similar, los microbiomas de las plantas participan directa e indirectamente en muchos de los procesos mencionados con anterioridad, al regular el metabolismo de las plantas. Diversos estudios han demostrado que tanto las plantas pueden influir en su microbioma al secretar metabolitos, como el microbioma puede afectar el metaboloma del hospedero (278). Dentro de los metabolitos secundarios involucrados, se listan a los flavonoides y particularmente la chalcona sintasa, enzima clave de la ruta de biosíntesis de los mismos. La expresión del gen codificante para dicha enzima se induce en plantas en condiciones de estrés como luz UV, infección bacteriana o fúngica (279). Como consecuencia aumenta la acumulación de fitoalexinas, flavonoides e isoflavonoides, siendo descripta como involucrada en la vía de defensa del SA (279). En ese sentido, los resultados obtenidos en esta tesis comprobaron la detección de los genes codificantes para la chalcona sintasa, en el nodo 5. Específicamente, los niveles de expresión de estos genes fueron mayores en el tratamiento con la bacteria PCV (T1), en comparación con el tratamiento con la cepa fitopatógena (T3). Curiosamente, lo opuesto ocurrió cuando se estudió la respuesta de plantas de *Malus domestica* (manzano), a la inoculación con la bacteria fitopatógena *Erwinia amylovora*, (279). Sin embargo, en respuesta a la inoculación con *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN (bacteria PCV) se observó su inducción en las plantas de *Vitis vinífera* (vid) (280). Por lo que no se observa un comportamiento único en la expresión de dicho gen, la cual depende del sistema.

Respuestas al estrés oxidativo.

Las plantas responden a los ataques de patógenos con aumentos rápidos de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido y el H_2O_2 . Las peroxidasas producen ROS que causan daño oxidativo a proteínas, ADN y lípidos microbianos (281). En este trabajo se identificaron expresados genes codificantes para peroxidasas, los cuales se agruparon en los nodos 3, 5 y 6. La enzima inducida por la presencia de la bacteria PCV, presente en el nodo 5 es la codificada por el gen Sobic.008G010500.1, mientras que las reprimidas por el inóculo bacteriano (en mayor medida por la bacteria PCV, T1) se agruparon en el nodo 6 (Sobic.002G392000.1, Sobic.002G416500.1, Sobic.003G140700.4).

En el trabajo donde se estudió el metagenoma endófito de plantas de arroz, se encontró un alto número y diversidad de genes que codifican enzimas potencialmente involucradas en la producción de ROS (214). Teniendo en cuenta que las plantas producen una gran variedad de ROS en respuesta al estrés abiótico o a la colonización por microorganismos, provocando un estallido oxidativo; así como su abundancia en el metagenoma mencionado, se sugiere que los endófitos requieren estas enzimas para poder colonizar con éxito las plantas (214).

Por otra parte, en estudios proteómicos de raíces de arroz en respuesta a la inoculación con la cepa *H. seropedicae* (bacteria PCV), se detectó la inducción de peroxidasas de ascorbato, relacionadas a la defensa antioxidante. Sin embargo, en otro trabajo donde se estudia la modulación de la defensa y homeostasis del hierro del mismo endófito colonizando raíces de plantas de arroz mediante RNAseq, se mostró que los genes que codifican para estas enzimas no se vieron afectados en su expresión (97, 282). Dados los distintos datos obtenidos para el mismo grupo de enzima en trabajos previos con distintos enfoques y metodologías, el efecto directo de las peroxidasas en diversos cultivos inoculados con bacterias PCV debe investigarse en mayor profundidad. En este contexto es probable que exista una interacción de diferentes isoformas de la enzima, una respuesta dependiente del cultivo y/o una expresión de las enzimas peroxidasas actuando en conjunto (283).

Respuesta de defensa molecular de la planta a la colonización bacteriana

Las plantas poseen mecanismos de reconocimiento para detectar la presencia de fitopatógenos. Este reconocimiento involucra un conjunto de proteínas receptoras, denominadas PRR (*Pattern Recognition Receptors*), capaces de reconocer una serie de

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Pattern*) (284). Los PPR son proteínas de membrana plasmática que puede ser clasificados como receptores del tipo quinasas (RLKs, *receptor-like kinases*) y se encuentran mediando el crecimiento, el desarrollo y las señales de respuesta al estrés en las plantas (284). En *Arabidopsis* las RLK transmembrana se pueden clasificar en 14 tipos, alguno de ellos son los siguientes: repetición rica en leucina (LRR), lectina (C-Lectina y L-Lectina), quinasa asociada a la pared (WAK), quinasa de la roya de la hoja como (LRK), de las cuales solo se ha estudiado en detalle el papel biológico de unos pocos (284). En el caso específico del nodo 1, descrito como el representante de la respuesta de reconocimiento de la planta a la presencia de la cepa fitopatógena *H. rubrisubalbicans* M1 (T3), se detectaron los genes previamente nombrados LRR, NB-ARC y RLK, siendo los valores de expresión en dichos genes mayor en el tratamiento T3, en relación con el control sin inocular (T4) y al tratamiento inoculado con *P. dispersa* UYSB45 (T1). Este resultado es similar a lo previamente reportado en genotipos susceptibles de sorgo dulce a la infección con el mismo fitopatógeno (104).

Por otra parte, muchos genes de resistencia a enfermedades de plantas (R), codifican proteínas que tienen un dominio de espiral en espiral (CC) N-terminal, un dominio de sitio de unión de nucleótidos central (NBS) y un dominio de repetición rica en leucina (LRR) C-terminal. Estas proteínas CC-NBS-LRR reconocen productos derivados de patógenos específicos e inician una respuesta de resistencia que a menudo incluye una respuesta hipersensible (HR) (285), siendo importantes para generar resistencia a los patógenos (57). Por otro lado, los receptores NLRs detectados agrupándose en el nodo 4, fueron genes codificantes para los receptores NB-ARC (91), así como también los receptores WRKY, alguno de ellos reportados como genes que responden a la fitohormona Ácido Salicílico (SA) (91). En el trabajo donde se estudian las respuestas transcripcionales de plantas de *Oryza sativa* (arroz), a la inoculación con la bacteria *Burkholderia vietnamiensis* TVV75, también se observó una regulación en la expresión génica de los genes NB-ARC y WRKY, siendo los primeros inducidos y los segundos reprimidos por la presencia de la misma (91). En nuestro trabajo ambos genes se encontraron inducidos ante la inoculación bacteriana y la expresión fue mayor en presencia de la bacteria fitopatógena (T3).

Dentro de respuesta mediada por genes-R, se identificaron en el transcriptoma de sorgo dulce, genes codificantes para las proteínas RAR1 y HSP90A (Sobic.004G167100.2 y

Sobic.006G005600.1) (Tabla A16). Estos genes se agruparon dentro del nodo 5 y son componentes claves en la vía de transducción de señales que conducen a la resistencia mediada por CC-NB-LRR, que regula la HR (286). Estos genes tuvieron valores mayores de TPM en un orden en T1 (plantas inoculadas con la bacteria PCV) que en los 2 tratamientos restantes. Estos resultados podrían implicar que la cepa endófito PCV juega un rol en el desencadenamiento de la respuesta HR o que la respuesta en el sitio de infección es la misma. Cuando se estudió más en detalle los valores de expresión de otros genes relacionados a la interacción planta-bacteria (tabla 4.7), se detectaron valores mayores de expresión génica en los tratamientos T1 y T3 (plantas inoculadas) en comparación con el T4 (sin inocular), en los genes posiblemente involucrados en la regulación de la respuesta PTI (Sobic.009G260650.2, Sobic.001G410100.2 y Sobic.002G023300.1) (tabla 4.7) (55). En el tratamiento donde se inoculó la bacteria fitopatógena (T3), el valor de TPM en el gen que codifica para la proteína PR1, fue un orden mayor que en el T1 (planta inoculada con *P. dispersa* UYSB45), de manera similar a lo reportado previamente en sorgo dulce (104). Por otro lado en el caso del gen CDPK (Sobic.009G260650.2), codificante para la proteína quinasa dependiente de Ca, su expresión fue menor en el tratamiento T3, en comparación con el T1, al igual que en trabajos previos (REF). En el mismo se especula que la represión e inducción de dichos genes implica que las bacterias tienen la capacidad de modular la respuesta inmune de la planta para aumentar la susceptibilidad (104). Particularmente el último de este grupo de genes, que codifica para la proteína MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3), posee valores de expresión mayores en los tratamientos inoculados con bacterias y a su vez dentro de estos, en el que fue inoculado con la bacteria fitopatógena. Una vez más, estos resultados fueron concordantes con lo obtenido previamente, en plantas de sorgo dulce inoculadas con la cepa M1 (104). Este gen, ha sido asociado tanto con la defensa directa contra patógenos microbianos en *Arabidopsis*, así como propuesto como candidato para las vía de señalización que media el *priming* (287). Por *priming* se entiende la sensibilización de una célula u organismo para mejorar la defensa; provocando una activación más rápida y robusta de las respuestas de defensa ante un nuevo desafío (287). Esto, puede explicar los valores de expresión observados en los tratamientos con inóculos bacterianos (T1: 10,56 y T3: 16,13) en comparación al control sin inocular (T4: 2.08). Siendo que la expresión observada en los tratamientos que fueron inoculados con bacterias puede estar dada por el *priming* y la inmunidad sistémica en plantas. Esto se observó en plantas de *Solanum muricatum* (pepino),

en interacción con el hongo *Trichoderma asperellum*, donde el hongo coloniza la raíz y estimula el *priming* de las defensas sistémicas y la ISR contra *P. syringae* pv. *lachrymans* en dicho cultivo (287).

Modulación de la producción de fitohormonas como respuesta a la colonización bacteriana

Las fitohormonas son una parte integral del sistema de defensa de la planta, comúnmente conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR) de las planta. Las fitohormonas son una clase de pequeñas moléculas bioactivas (288). Además de regular las respuestas fisiológicas y morfológicas de las plantas, las fitohormonas tales como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas (SL), tienen también un impacto en el microbioma de las mismas (278). En esta tesis cuando se estudiaron genes específicos relacionados a las vías de biosíntesis de las fitohormonas, se identificaron genes intermediarios de la vía de síntesis del SA (Tabla A16, Tabla 4.6 y Figura 4.11). En las respuestas activadas por SA, el intermediario NPR1 (no detectado en este trabajo), interactúa con un miembro de la familia de factores de transcripción (TGA) el cual, junto con los factores de transcripción WRKY (encontrados en este trabajo), se unen a los promotores de genes de defensa que responden a SA resultando en su activación (289). Estudios previos que utilizaron mutantes de *Arabidopsis* demostraron que el SA es la principal vía hormonal que modula la composición del microbioma de las raíces, sin embargo un trabajo reciente en el endófito *A. olearius* BH72 colonizando plantas de arroz, establece que la vía del ácido jasmónico (JA), es el que restringe la colonización de las raíces de arroz por dicho endófito (288, 290). Cabe destacar que en las condiciones ensayadas en este trabajo, no fue posible detectar los genes intermediarios de la vía del JA. Estas evidencias muestran que no hay una única respuesta de las plantas a la infección bacteriana.

Por otro lado, el gen EIN3 (Sobic.007G210700.4) (Tabla 4.6 y Figura 4.11), el cual codifica para la proteína intermediaria en la vía de la señalización por ET, presentó valores en TPM mayores en el tratamiento donde se inoculó la bacteria PCV en comparación con la fitopatógena y fue 0 en el tratamiento sin inocular (Tabla A16). Esto resulta interesante ya que dicho gen es un intermediario en la vía de la señalización por ET y en *Arabidopsis* ha sido propuesto como fundamental en la respuesta transcripcional provocada por el péptido flagelar Flg22, así como la deposición de callosa en los cotiledones, siendo este efecto también observado en plantas

de sorgo dulce (104, 291). Según nuestros resultados, el gen EIN3 podría estar siendo inducido por el péptido flagelar cuando se inocula la bacteria PCV, ya que en las condiciones ensayadas se detectaron algunos transcriptos pertenecientes al aparato flagelar en la forma de vida endófito. Como ha sido previamente propuesto, el producto del gen EIN3 podría estar cumpliendo un rol de regulación negativa de la inmunidad activada por PAMPs, lo que provocaría una colonización exitosa por parte de la bacteria PCV (292).

Es necesario seguir profundizando en el estudio de los mecanismos moleculares, la identificación de las proteínas de percepción específicas de endófitos, así como de las señales involucrados que imperan en la modulación de la colonización de la planta por parte de su microbioma endófito asociado.

4.12.2 Transcriptomas bacterianos en asociación con plantas de sorgo dulce

Lo interesante de realizar la técnica de *dual RNA-seq* es que permite la evaluación de perfiles de expresión génica de la planta y microbianos en diferentes escenarios, como el estrés abiótico, o en interacciones específicas (293).

Luego del análisis de la calidad de los datos sin procesar, las lecturas procesadas de las muestras T1, T2 y T3 se mapearon contra el genoma de *P. dispersa* UYSB45 o *H. rubisubalbicans* M1 según correspondiera, calculándose los valores de TPM.

4.12.2.1 Perfil transcripcional de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en ambos estilos de vida (planctónico y endofítico)

Al analizar y comparar la expresión de los transcriptos encontrados en ambos estilos de vida, en primer lugar se agruparon aquellos con un valor de expresión mayor en el tratamiento T1. Dentro de este grupo, se encuentran transcriptos correspondientes a genes relacionados a la respuesta por estrés (UYSB45.3949, UYSB45.1166), transcriptos de genes codificantes para proteínas transmembranas (UYSB45.2273, UYSB45.3480, UYSB45.1593), así como transcriptos correspondientes a genes codificantes para proteínas de membrana (UYSB45.1069, UYSB45.400, UYSB45.733, UYSB45.3239 y UYSB45.341) (Figura G).

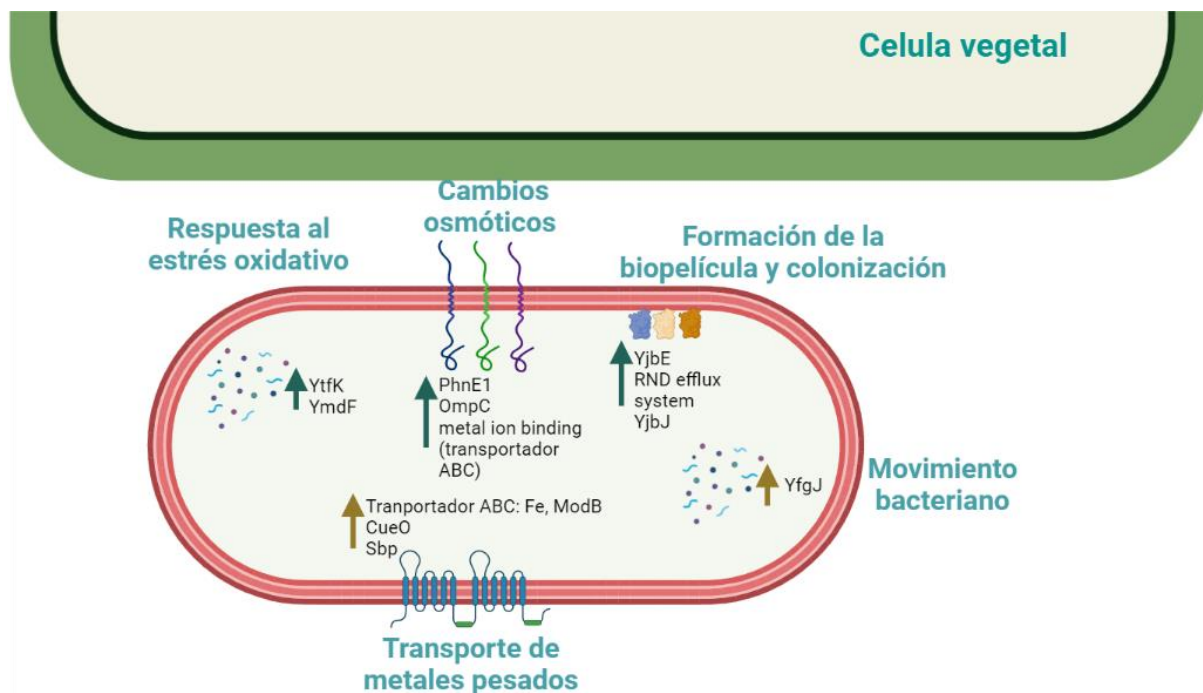


Figura G: Genes expresados en ambos tratamientos T1 (estilo de vida endofítica) y T2 (estilo de vida planctónica). La flecha verde indica mayor expresión en T1, mientras que marrones indican mayor expresión en T2. En la tabla 4.8 se muestran los valores de cada gen en ambos tratamientos.

Particularmente se identificó en la cepa UYSB45 el gen UYSB45.3949, que codifica para la proteína YtfK, inducido por la falta de fósforo en *E. coli* (294) (Figura G). Para sobrevivir en entornos con limitaciones de fósforo, *E. coli* responden utilizando un sistema de dos componentes PhoB-PhoR, que induce la expresión de varios genes (295). También en *E. coli*, el tratamiento con H_2O_2 induce notablemente dos genes del regulón PhoB, siendo uno de ellos el gen *ytfK* (296). Por lo que aunque no se sabe con exactitud la función de dicho gen, está bien reportado que se induce en situaciones de estrés (296).

Interacción con hospedero

Dentro del grupo de los genes transmembranas con una mayor expresión en el estilo de vida endófito (T1) que en planctónico (T2), se identificaron por un lado el gen que codifica para la proteína de membrana externa, porina OmpC (UYSB45.3480), y por otro lado el gen que codifica para la proteína permeasa transportadora ABC de fosfonato PhnE1 (UYSB45.2273). La colonización de la rizósfera, así como la de los tejidos internos de la planta, implica cambios osmóticos, lo que requiere una rápida adaptación de la bacteria (297). En *E. coli* se ha detectado el SDC que censa la osmolaridad (OmpR/EnvZ) y regula la expresión de las porinas de membrana externa OmpF y OmpC (298). Asimismo, al igual que en nuestro trabajo, en el

endófito *Enterobacter* sp. 638, se observó un aumento en los niveles de expresión de dicho gen cuando se imitó las condiciones de crecimiento dentro de la planta (299). A su vez, se detectó la presencia de proteínas relacionadas con la síntesis trehalosa (figura H), sugiriendo que en dentro de la planta la bacteria se encuentra en un ambiente osmóticamente diferente y debe sortearlo mediante estos sistemas.

Por otro lado, entre los genes que codifican para proteínas de membrana transportadoras, RND (*resistance nodulation and cell division family*) encontrada en este trabajo (UYSB45.733). Dicha proteína fue reportada cuando se estudió bioinformáticamente el genoma de diversas bacterias endófitas y los posibles genes involucrados en el estilo de vida endofítico (300). También se han identificado proteínas asociadas a la membrana del sistema de eflujo de RND en el genoma del endófito bacteriano PCV *Enterobacter* sp. 638, sugiriéndose que están asociadas con la naturaleza endofítica de la bacteria (301). Por otro lado, el mismo sistema juega un papel activo en la colonización exitosa de plantas de manzano por el endófito *Erwinia amylovora*. Esta bacteria *E. amylovora* se comporta como endófito en algunas plantas y como patógeno en otras (302).

Por otro lado, los genes inducidos en mayor proporción en T2 fueron los relacionados al transporte y reconocimiento de metales pesados como unión a ion metálico (UYSB45.1593), unión a cobre (UYSB45.3329), a la actividad de transporte transmembrana (UYSB45.3547, UYSB45.382, UYSB45.2245 y UYSB45.2808) y a otros metales pesados (UYSB45.1417 y UYSB45.4421). Asimismo, se observó una expresión diferencialmente mayor en este tratamiento para el gen codificante para la proteína YfgJ, relacionado al movimiento bacteriano por *swarming* (302). Esto nos lleva a la conclusión que en el estilo de vida plantónico la bacteria está expresando genes fundamentales para la sobrevivencia en la rizosfera, como lo es el movimiento, transporte transmembrana entre otros.

4.12.2.2 Perfil transcripcional de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en su estilo de vida endofítico

Resulta interesante que la mayoría de los genes encontrados en esta sección se agrupan en categorías relacionadas a respuesta por estrés (Figura H).

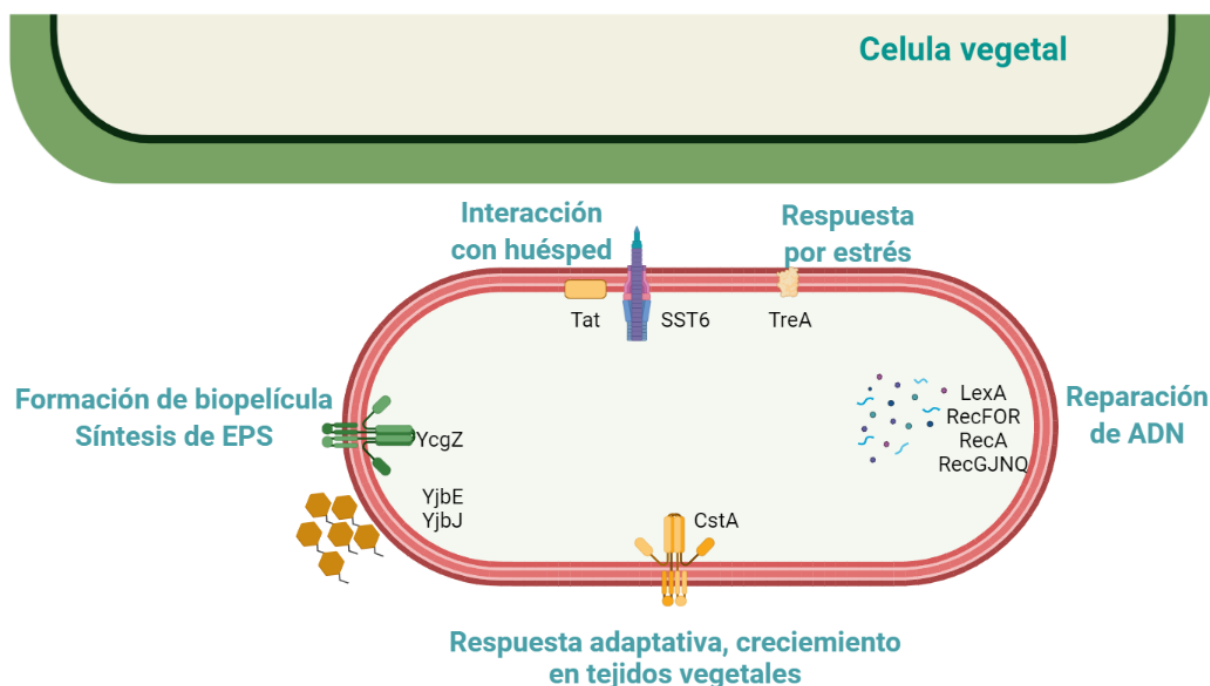


Figura H: Genes expresados exclusivamente en la condición de vida endofítico por la cepa UYSB45 (T1) (Tabla A17).

Una de las enzimas encontrada únicamente en la forma de vida endófito es la trehalasa periplasmática (gen *treA*). El gen *treA* en *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 está regulado por una alta osmolaridad así como por la presencia de trehalosa externa (295). En *Escherichia coli*, *treA* se induce solo en condiciones de alta osmolaridad y la osmotolerancia se asocia con la inducción de dicho gen (303). Según lo previamente reportado, la presencia de transcripto perteneciente a este gen puede estar cumpliendo un rol en la sobrevivencia en un ambiente “hostil” dentro de los tejidos de la planta. Se ha visto que la acumulación de xeroprotectores, como la trehalosa, por algunos microorganismo y plantas les permite a estos sobrellevar un estrés abiótico extremo como la desecación (304). En la interacción de la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 con plantas de caña de azúcar, también se detectó la enzima trehalosa cuando se creció dicho endófito en co-cultivo con plantas de caña de azúcar. En este caso atribuyéndose la presencia de dicha enzima a la diferencia osmótica entre el interior y el exterior de la planta dada la alta concentración de azúcar en este cultivo (163). Dicho esto, podemos inferir que la expresión del gen *treA* en nuestro caso está probablemente regulado por la alta osmolaridad en los tejidos internos de la planta ya que dicha enzima no se encontró en el estilo de vida planctónico (T2).

Por otro lado, en esta condición se identificaron genes codificantes relacionados con los sistemas de secreción bacterianos *Tat* (UYSB45.4603) y *SST6* (UYSB45.491) (tabla A15). Un

resultado similar se reportó cuando se comparó la expresión génica de la cepa *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* (Xoc) infectando plantas de arroz. En dicho trabajo observaron que los genes regulados positivamente *in planta* incluían los relacionados a los sistemas de secreción bacteriana, mientras que los genes regulados negativamente *in planta* estaban relacionados con las vías de ensamblaje flagelar y quimiotaxis bacteriana (103). En línea con esto, nuestros resultados mostraron una menor expresión de uno de los genes relacionado al movimiento *swarming* (UYSB45.4485) en T2 (*P. dispersa* UYSB45 plantónica) en comparación con T1 (*P. dispersa* UYSB45 endófito). Este resultado se puede atribuir al hecho que dentro de los tejidos internos de la planta el flagelo es necesario para la colonización y traslado desde los tejidos externos hacia los haces vasculares de la planta, como se demostró en el Capítulo III.

Otro de los transcritos detectados únicamente en el estilo de vida endófito fue un gen que codifica para una posible proteína YcgZ (UYSB45.1157), relacionada al sistema de dos componentes (SDC), involucrado en la regulación de la formación de biopelículas y de la síntesis de polisacáridos capsulares (RcsFCDAB) (299). Esto fue también observado cuando se estudió las respuestas transcripcionales del endófito PCV *Enterobacter* sp. 638 a la sacarosa, imitando las condiciones en los tejidos internos de la planta. En dicho trabajo los niveles de expresión de los operones implicados en la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y la formación de biopelículas, así como como los del gen *rcsA* fueron mayores cuando se imitaron las condiciones de vida endófito (299). Nuestros resultados también mostraron una mayor expresión de los genes relacionados a la síntesis de EPS (YjbE: UYSB45.400 y YjbJ: UYSB45.341) cuando la cepa UYSB45 se encuentra dentro de la planta (299).

En su conjunto estos resultados podría estar indicando que la cepa *P. dispersa* UYSB45 una vez dentro de la planta, forma biopelícula y de esta manera coloniza los tejidos internos de la planta. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos cuando se estudió la colonización e infección de la cepa *P. dispersa* UYSB45 en plantas de sorgo dulce (Capítulo III).

Otro de los genes que se encontraron únicamente en el estado endófito de la cepa UYSB45, fue el transcritos correspondiente a uno de los genes del SDC relacionado a la falta de C (*Carbon starvation protein A*, UYSB45.1539) (Anexo III, tabla A17). En la cepa *Enterobacter lignolyticus* SCF1 (bacteria aislada de suelo), este gen fue inducido cuando la cepa fue crecida en un medio de cultivo enriquecido en lignina (305). Dado que este gen se detectó únicamente en el estado endofítico de *P. dispersa* UYSB45, podría sugerir un mecanismo de

respuesta adaptativa a la presencia de una fuente de carbono más recalcitrante dentro de los tejidos internos de la planta (305).

Conclusiones

La caracterización de la respuesta génica de plantas de sorgo dulce inoculadas con bacterias PCV o fitopatógenas nos proporciona información que revelan los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la interacción planta-bacteria. El análisis por *RNA-seq* mostró una expresión génica diferencial en plantas inoculadas con las cepas *P. dispersa* o *H. rubrisubalbicans*, debida a la diferencia en la naturaleza de dicha asociación. En este sentido, se determinó que los genes relacionados a la regulación hormonal detectados en este trabajo (ABA y GA), genes relacionados a la organización de la pared celular (glutaredoxina y betaglucosidasa), son inducidos en presencia de la bacteria PCV y reprimidos en presencia de la bacteria fitopatógena.

En general, las respuestas observadas a nivel molecular de las plantas de sorgo dulce a la inoculación bacteriana son muy complejas y este trabajo aporta a mejorar nuestra comprensión de este fenómeno.

Al analizar el perfil transcripcional de *P. dispersa* UYSB45 en estilo de vida plantónica y endófito, se identificaron un conjunto de genes que le permiten a la misma establecer una asociación con su hospedero. Es así como los genes expresados diferencialmente entre los estilos de vida identificados con la técnica de dual *RNA-seq* complementa el modelo de infección descrito mediante microscopia en esta tesis. Estos hallazgos sugieren que se produjo una gama de cambios en la expresión génica durante la adaptación al entorno dentro de la planta. Genes relacionados a la formación de biopelícula, síntesis de EPS, interacción con el hospedero (SST6) así como respuestas adaptativas para el crecimiento dentro del hospedero fueron observadas únicamente en la forma de vida endófito. Pudiendo agregar a esto que el estilo de vida endófito para *P. dispersa* UYSB45 es un estado de estrés.

Perspectivas

Con respecto al **capítulo I**:

Sería interesante determinar para los cultivares de sorgo dulce M81E y ADV2010, el efecto combinado de la inoculación con cepas bacterianas PCV (ej *Pantoea dispersa* UYSB45 y *Rhizobium* sp. UYSB13) y diferentes concentraciones de fertilización química.

Con respecto al **capítulo II**:

Se logró en la cepa *Pantoea dispersa* UYSB45 la obtención de una mutante en el gen *entF*, sin embargo no se observó un fenotipo asociado a la pérdida de función de producción de sideróforo. Dado esto, es necesario poner a punto el ensayo de detección de producción de sideróforo en medio líquido. De esta manera sería posible determinar si se observa la pérdida de dicha función en la mutante *Pantoea dispersa* UYSB45 Δ *sid* o si es necesario mutar otro gen relacionado a la producción de sideróforos. Una vez obtenida la mutante con pérdida de función, sería revelador realizar un ensayo en planta en condiciones *gnotobióticas*, de competencia de colonización de las raíces entre la cepa salvaje y la mutante.

Respecto a la construcción de las mutantes *Pantoea dispersa* UYSB45 Δ *acdS* y *Pantoea dispersa* UYSB45 Δ *ipdC*, el paso en el cual no se pudo avanzar fue en la resolución del cointegrado. Para resolver esto, sería necesario ensayar distintas condiciones en la inducción de la enzima *Scel* para lograr la resolución del cointegrado y así la mutante en dichos genes. Otra alternativa sería utilizar otro método de mutagénesis dirigida o incorporar un gen reportero para conocer su función o su rol en la interacción planta-bacteria.

Con respecto al **capítulo III**:

En trabajos anteriores se ha determinado que el plásmido pMP4655 no interfiere con la capacidad de colonización e infección de las plantas por parte de la cepa portadora. Ya que no hay reportes de este plásmido en *Pantoea*, es necesario realizar un ensayo de competencia de colonización entre la cepa *Pantoea dispersa* UYSB45 pMP4655 y *Pantoea dispersa* UYSB45 por recuento mediante qPCR. El resultado de este ensayo permitiría determinar si el plásmido en la cepa UYSB45 tiene algún efecto en la capacidad de colonización de plantas de sorgo dulce.

Con respecto al **capítulo IV**:

Se obtuvieron genes con expresión diferencial entre los tratamientos ensayados por *RNAseq*, estos resultados debe ser validados mediante RT-qPCR en una selección de genes.

Por otro lado, sería interesante profundizar en el análisis bioinformático haciendo foco en la respuesta hormonal de la planta a la inoculación bacteriana.

Por último, desde el punto de vista de la bacteria sería interesante profundizar aún más en el estudio de la expresión génica diferencial en los distintos estilos de vida estudiados en esta tesis.

Anexo I. Medios de cultivos y soluciones

Medios de cultivo para bacterias

Medio de cultivo Luria-Bertani liquido (LB)

Componentes	Cantidad por litro
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O c.s.p 1000ml	
Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 15 g/l	

Medio de cultivo NFb

Componentes	Cantidad por litro
Ácido málico	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	2,0
K ₂ HPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
Solución de vitaminas	1 ml
Solución de micronutrientes	2 ml
NH ₄ Cl	1,0 g
H ₂ O c.s.p 1000ml	
Ajustar pH a 6,5. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 15 g/l.	

Medio de cultivo LGI

Componentes	Cantidad por litro
Azúcar cristal	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,015 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
Solución FeEDTA 1,64 %	4,0mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,01

Componentes	Cantidad por litro
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002
Solución de vitaminas	1 ml
Extracto de levadura*	0,05 g
H ₂ O c.s.p 1000ml	

Ajustar pH 6,0-6,2. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 18 g/l.

*Solo para medio sólido.

Solución de micronutrientes para medio NFb

Componentes	Cantidad por litro
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ .H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
MoO ₃ .H ₂ O	0,09 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g
H ₂ O c.s.p 1000ml	

Solución de vitaminas para medio NFb y LGI

Componentes	Cantidad
Biotina	0,01 g
Pyrodoxal-HCl	0,02 g
H ₂ O c.s.p 1000ml	

Medios de cultivo para plantas

Medio Jensen

Componentes	Cantidad
CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,01 g
Solución de micronutrientes	1,0 mL
H ₂ O c.s.p. 1000ml	

Medio MS

Componentes	Cantidad (mg)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
IK	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
EDTA	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
H ₂ O c.s.p. 1000ml	

Solución de vitaminas del medio
de cultivo Staba

Componentes	Cantidad (mg)
Ácido fólico	50
Biotina	100
Cloro colina	100
Ácido pantoténico	100
Tiamina	100
Nicotinamida	200
Piridoxina	200
Ácido aminobenzoico	200
H ₂ O c.s.p. 1000ml	

Agregar al medio de cultivo base MS solución de vitaminas 1 ml/l, sacarosa 20 g/l y mioinositol 100 mg/l. Ajustar el pH a 5,8.

Se utilizó la siguiente modificación del medio cultivo, diluido al décimo y sin el agregado de la fuente de N (NH₄NO₃ ni KNO₃) (306).

Otras soluciones

Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE)

Componentes	Concentración
Tris-Acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE)

Componentes	Concentración
Tris	0,089 M
Ácido Bórico	0,089 M
EDTA	0,002 M

Buffer PBS

Componentes	Cantidad
NaCl	8,0 g
NaH ₂ PO ₄	0,36 g
Na ₂ HPO ₄	0,99 g
H ₂ O c.s.p. 1000ml	

pH 7,2.

Anexo II. Tablas suplementarias Capítulo I

Metadatos utilizados para la construcción filogenética

Tabla A1: Metadatos de las cepas utilizadas para la construcción del árbol filogenético. AP: Asociado a planta, E: Endófito, P: Patógeno, C: Clínico, S: Suelo, SA: Simbionte de animal, A: Acuático. Marcadas en negrita: genomas que se agruparon en el mismo nodo que *Pantoea dispersa* UYSB45.

Numero de acceso	Cepa	AP	E	P	C	S	SA	A	Hospedero	Región	Referencia
GCA_000025405	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103			*					<i>Eucalyptus</i> spp.	Sudáfrica	(307)
GCA_000148935	<i>Pantoea vagans</i> C9-1	*							Árbol de pera y manzana		
GCA_000175935	<i>Pantoea</i> sp. At-9b			*						USA	(308)
GCA_000179655	<i>Pantoea</i> sp. aB						*		Hormiga		
GCA_000180175	Plautia stali symbiont						*		Plautia stali	Japón	(201)
GCA_000233595	<i>Pantoea ananatis</i> PA13			*					Grano de arroz con desarrollo de enfermedad	Corea	(309)
GCA_000248395	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> DC283			*					<i>Zea mays</i>		(310)
GCA_000255315	<i>Pantoea</i> sp. Sc1			*					<i>Zea mays</i>		(311)
GCA_000270125	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355			*							-
GCA_000282675	<i>Pantoea</i> sp. GM01	*									
GCA_000282695	<i>Pantoea</i> sp. YR343	*							Raíces de <i>Populus deltoides</i>	USA	(312)
GCA_000283875	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 5342				*						(313)
GCA_000330765	<i>Pantoea agglomerans</i> 299R	*							Árbol de pera	USA	(314)
GCA_000465555	<i>Pantoea dispersa</i> EGD-AAK13					*			Suelo de mercado vegetal	India	-
GCA_000468095	<i>Pantoea</i> sp. AS-PWVM4	*							<i>Punica granatum</i>		(315)
GCA_000475035	<i>Pantoea ananatis</i> BRT175	*							Fragaria × ananassa		(316)
GCA_000475055	<i>Pantoea agglomerans</i> Tx10				*					USA	(317)
GCA_000627115	<i>Pantoea agglomerans</i> RIT273		*						<i>Salix purpurea</i>	USA	(204)
GCA_000687245	<i>Pantoea agglomerans</i> Eh318	*							Hojas de manzano		(318)

Numero de acceso	Cepa	AP	E	P	C	S	SA	A	Hospedero	Región	Referencia
GCA_000731025	<i>Pantoea</i> sp. 3.5.1					*				Rusia	(319)
GCA_000731125	<i>Pantoea agglomerans</i> 190					*				Corea del Sur	-
GCA_000743785	<i>Pantoea agglomerans</i> 4	*							Semilla de <i>Triticum aestivum</i>	Canadá	(320)
GCA_000757405	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. indologenes LMG 2632		*						<i>Setaria italica</i>	India	-
GCA_000757415	<i>Pantoea agglomerans</i> MP2					*			Termitas	Sudáfrica	(321)
GCA_000757435	<i>Pantoea vagans</i> MP7					*			Termitas		
GCA_000759475	<i>Pantoea rwandensis</i> ND04							*		Malasia	-
GCA_000766045	<i>Pantoea ananatis</i> PaMB1		*							China	-
GCA_000784875	<i>Pantoea</i> sp. PSNIH1				*					USA	(322)
GCA_000784965	<i>Pantoea</i> sp. PSNIH2				*					USA	
GCA_000786255	<i>Pantoea stewartii</i> M009							*		Malasia	(323)
GCA_000801085	<i>Pantoea rodasii</i> ND03							*		Malasia	-
GCA_000803205	<i>Pantoea stewartii</i> M073a							*		Malasia	(324)
GCA_000814075	<i>Pantoea agglomerans</i> LMAE-2								Sedimento	Chile	(324)
GCA_000952095	<i>Pantoea agglomerans</i> GB1	*							Raíz de <i>Poplar</i> spp.	Bélgica	(203)
GCA_000963985	<i>Pantoea</i> sp. BL1							*	Lago	Malasia	-
GCA_000963995	<i>Pantoea</i> sp. SM3							*	Lago	Malasia	-
GCA_000969395	<i>Pantoea anthophila</i> 11-2							*	Lago hipersalino	USA	(324)
GCA_001005095	<i>Pantoea ananatis</i> MR5	*							Raiz de <i>Cenchrus biflorus</i>	India	-
GCA_001187705	<i>Pantoea ananatis</i> CFH 7-1		*						Invernáculo con plantación de algodón	USA	(325)
GCA_001187905	<i>Pantoea</i> sp. RIT-PI-b	*							<i>Toxicodendron radicans</i>	USA	(205)
GCA_001238615	<i>Pantoea vagans</i> ZBG6				*				Suelo	Francia	-
GCA_001264395	<i>Pantoea</i> sp. CFSAN033090		*						Nuez	Chile	(326)
GCA_001288285	<i>Pantoea agglomerans</i> P10c	*							Árbol de manzana	Nueva Zelanda	(327)
GCA_001369355	<i>Pantoea ananatis</i> S6		*							Austria	-
GCA_001369375	<i>Pantoea ananatis</i> S7		*						Semillas de <i>Zea mays</i>		
GCA_001369395	<i>Pantoea ananatis</i> S8		*								
GCA_001475715	<i>Pantoea ananatis</i> NS296	*							Semillas de <i>Oryza sativa</i>	India	(202)

Numero de acceso	Cepa	AP	E	P	C	S	SA	A	Hospedero	Región	Referencia
GCA_001475725	<i>Pantoea ananatis</i> NS311	*									
GCA_001475885	<i>Pantoea ananatis</i> RSA47	*									
GCA_001476115	<i>Pantoea ananatis</i> NS303	*									
GCA_001476295	<i>Pantoea dispersa</i> NS375	*									
GCA_001476325	<i>Pantoea dispersa</i> SA3	*									
GCA_001476355	<i>Pantoea stewartii</i> NS381	*									
GCA_001476375	<i>Pantoea stewartii</i> RSA36	*									
GCA_001476715	<i>Pantoea dispersa</i> NS215	*									
GCA_001476735	<i>Pantoea dispersa</i> NS389	*									
GCA_001476745	<i>Pantoea dispersa</i> SA2	*									
GCA_001476765	<i>Pantoea dispersa</i> SA5	*									
GCA_001476795	<i>Pantoea stewartii</i> RSA30	*									
GCA_001477155	<i>Pantoea dispersa</i> NS380	*									
GCA_001477165	<i>Pantoea dispersa</i> RSA31	*									
GCA_001477195	<i>Pantoea dispersa</i> SA4	*									
GCA_001477215	<i>Pantoea stewartii</i> RSA13	*									
GCA_001506165	<i>Pantoea vagans</i> ND02							*		Malasia	-
GCA_001543055	<i>Pantoea ananatis</i> R100	*							Semillas de <i>Oryza sativa</i>	China	-
GCA_001597625	<i>Pantoea agglomerans</i> 3	*							Semillas de <i>Triticum aestivum</i>	Canadá	(320)
GCA_001641135	<i>Pantoea</i> sp. OXWO6B1	*							Semillas de <i>Avena sativa</i>	Canadá	-
GCA_001709315	<i>Pantoea agglomerans</i> C410P1	*							<i>Lactuca sativa</i>	China	-
GCA_001881025	<i>Pantoea</i> sp. Ae16						*		<i>Aedes albopictus</i>	USA	-
GCA_002077695	<i>Pantoea latae</i> AS1	*							<i>Zamia integrifolia</i>	USA	(328)
GCA_002082215	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> DC283	*							<i>Zea mays</i>	USA	-
GCA_002082355	<i>Pantoea vagans</i>	*							Raíces de <i>Triticum durum</i>	Algeria	-
GCA_002095305	<i>Pantoea brenneri</i> LMG 5343				*					USA	
GCA_002095315	<i>Pantoea conspicua</i> LMG 24534				*					Francia	
GCA_002095375	<i>Pantoea deleyi</i> LMG 24200		*						<i>Eucalyptus</i> spp.	Uganda	(308)
GCA_002095385	<i>Pantoea eucrina</i> LMG 5346				*					USA	
GCA_002095465	<i>Pantoea rodasii</i> LMG 26273		*						<i>Eucalyptus</i> spp.	Colombia	

Numero de acceso	Cepa	AP	E	P	C	S	SA	A	Hospedero	Región	Referencia
GCA_002095475	<i>Pantoea rwandensis</i> LMG 26275			*					<i>Eucalyptus</i> spp.	Ruanda	
GCA_002095485	<i>Pantoea wallisii</i> LMG 26277			*					<i>Eucalyptus</i> spp.	Sudáfrica	
GCA_002095535	<i>Pantoea cypripedii</i> LMG 2657			*					<i>Cypripedium</i>	USA	
GCA_002095545	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248			*					Semillas de <i>Allium cepa</i>	Sudáfrica	
GCA_002095575	<i>Pantoea septica</i> LMG 5345				*					USA	
GCA_002101395	<i>Pantoea alhagi</i> LTYR-11Z			*					<i>Alhagi sparsifolia</i> Shap.	China	-
GCA_002157425	<i>Pantoea agglomerans</i> P5		*						Suelo	Irán	(328)
GCA_002207995	<i>Pantoea</i> sp. VS1		*						<i>Magnolia grandiflora</i>	USA	-
GCA_002215245	<i>Pantoea</i> sp. AMG 501		*						<i>Oryza sativa</i>	España	-
GCA_002222515	<i>Pantoea agglomerans</i> JM1					*			Suelo	Eslovaquia	-
GCA_002233725	<i>Pantoea</i> sp. AV62			*					<i>Salix atrocinerea</i>		-
GCA_002287745	<i>Pantoea vagans</i> TYU1			*					Semillas de <i>Taxus cuspidata</i>	Corea del Sur	-
GCA_002307475	<i>Pantoea allii</i> LMG 24248		*						<i>Allium cepa</i>	Sudafrica	-
GCA_002313185	<i>Pantoea</i> sp. FDAARGOS_194					*				USA	(328)
GCA_002554555	<i>Pantoea agglomerans</i> FDAARGOS_407					*			Fruta (Mango)	-	
GCA_002811195	<i>Pantoea rodasii</i> DSM 26611			*					<i>Eucalyptus</i> spp.	Colombia	-
GCA_002858935	<i>Pantoea endophytica</i> 596			*					Raíces de <i>Zea mays</i>	China	-
GCA_900114175	<i>Pantoea</i> sp. YR512		*								
GCA_900115075	<i>Pantoea</i> sp. OV426		*						Microbioma de raíz de <i>Populus</i> spp.	USA	-
GCA_900116775	<i>Pantoea</i> sp. YR525		*								
GCA_900119405	<i>Pantoea ananatis</i> NFR11		*						<i>Panicum virgatum</i>	-	-

Tablas de genes anotados según RAST

Tabla A2: Listado de la abundancia relativa de los genes anotados en las distintas subcategorías según RAST

Categoría	Recuento de Subcategoría
Ácidos Grasos, Lípidos e Isoprenoides	75
Adquisición y metabolismo de Fe	30
Aminoácidos y Derivados	289
Carbohidratos	251
Cofactores, Vitaminas, Grupos Prostéticos, Pigmentos	144
División y Ciclo celular	8
Dormancia y Esporulación	2
Fagos, Profagos, Elementos transponibles, Plásmidos	27
Metabolismo de Componentes Aromáticos	16
Metabolismo de las Proteínas	187
Metabolismo del ADN	76
Metabolismo del ARN	57
Metabolismo del K	13
Metabolismo del N	18
Metabolismo del P	29
Metabolismo del S	32
Metabolismo Secundario	4
Misceláneos	15
Motilidad y Quimiotaxis	56
Nucleósidos y Nucleótidos	86
Pared celular y Cápsula	36
Regulación y Señalización celular	56
Respiración	85
Respuesta al Stress	79
Transporte de Membrana	108
Virulencia, Enfermedad y Defensa	46

Sistemas de secreción

Tabla A3: Genes pertenecientes a sistemas de secreción (SS) presentes en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Subcategoría	Rol	Número del gen
SS Tipo I	Type I secretion system, outer membrane component LapE	UYSB45.3832
	Type I secretion system, membrane fusion protein LapC	UYSB45.3834
	Type I secretion system ATPase, LssB family LapB	UYSB45.3833
	T1SS secreted agglutinin RTX	UYSB45.3831, UYSB45.4123
SS Tipo IV	Type IV fimbrial assembly, ATPase PilB	UYSB45.3303
	Type IV pilus biogenesis protein PilQ	UYSB45.4239
	N-methyltransferase (EC 2.1.1.-)	UYSB45.2716
	3-dehydroquinate synthase (EC 4.2.3.4)	UYSB45.4237
	Type IV fimbrial assembly protein PilC	UYSB45.3302
	Twitching motility protein PilT	UYSB45.3817
	Leader peptidase (Prepilin peptidase) (EC 3.4.23.43)	UYSB45.2716
	Type IV pilin PilA	UYSB45.3304
	Multimodular transpeptidase-transglycosylase (EC 2.4.1.129) (EC 3.4.-.-)	UYSB45.3346, UYSB45.4243
	Type IV pilus biogenesis protein PilM	UYSB45.4242
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraV	UYSB45.277
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraB	UYSB45.282
	IncF plasmid conjugative transfer protein TraG	UYSB45.259
	IncF plasmid conjugative transfer protein TraD	UYSB45.254
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraW	UYSB45.273
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraH	UYSB45.260
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraC	UYSB45.275
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraU	UYSB45.268
	IncF plasmid conjugative transfer DNA-nicking and unwinding protein TraI	UYSB45.253
	IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein TraT	UYSB45.257
	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbB	UYSB45.262
	IncF plasmid conjugative transfer protein TraN	UYSB45.266
	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbC	UYSB45.267
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraF	UYSB45.265
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraV	UYSB45.277

Subcategoría	Rol	Número del gen
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraB	UYSB45.282
	IncF plasmid conjugative transfer protein TraG	UYSB45.259
	IncF plasmid conjugative transfer protein TraD	UYSB45.254
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraW	UYSB45.273
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraH	UYSB45.260
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraC	UYSB45.275
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraU	UYSB45.268
	IncF plasmid conjugative transfer DNA-nicking and unwinding protein TraI	UYSB45.253
	IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein TraT	UYSB45.257
	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbB	UYSB45.262
	IncF plasmid conjugative transfer protein TraN	UYSB45.266
	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbC	UYSB45.267
	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraF	UYSB45.265
	IcmF-related protein	UYSB45.1781, UYSB45.3724
	Uncharacterized protein ImpI/VasC	UYSB45.1783, UYSB45.3739
SS Tipo VI	Uncharacterized protein ImpF	UYSB45.3743
	Uncharacterized protein ImpB	UYSB45.2241, UYSB45.3727
	Protein of avirulence locus ImpE	UYSB45.3742
	Protein ImpG/VasA	UYSB45.2217, UYSB45.3744
	Uncharacterized protein similar to VCA0109	UYSB45.2214
	Uncharacterized protein ImpA	UYSB45.2223, UYSB45.3726
	Outer membrane protein ImpK/VasF, OmpA/MotB domain	UYSB45.1780, UYSB45.3723
	ClpB protein	UYSB45.491
	Uncharacterized protein ImpC	UYSB45.2240, UYSB45.3728
	Uncharacterized protein ImpJ/VasE	UYSB45.2239, UYSB45.3722
	Uncharacterized protein ImpD	UYSB45.2236, UYSB45.3731, UYSB45.3825
	Protein phosphatase ImpM	UYSB45.1782, UYSB45.3725
	VgrG protein	UYSB45.2233, UYSB45.3748
	Uncharacterized protein ImpH/VasB	UYSB45.2216, UYSB45.3745
	Type VI secretion lipoprotein/VasD	UYSB45.3721
SS Tipo VII	Sigma-fimbriae usher protein	UYSB45.4126
	Sigma-fimbriae uncharacterized paralogous subunit	UYSB45.4128, UYSB45.4129
	Sigma-fimbriae tip adhesin	UYSB45.4125
	Sigma-fimbriae chaperone protein	UYSB45.4127

Quimiotaxis, formación de biopelículas y motilidad bacteriana

Tabla A4: Genes pertenecientes a movilidad y quimiotaxis en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Categoría	Subsistema	Rol	Número del gen
Movilidad y quimiotaxis	Flagelo en <i>Campylobacter</i>	Flagellar basal-body rod protein FlgC	UYSB45.1049
		Flagellin protein FlaA	UYSB45.3711
		Cell division protein FtsI [Peptidoglycan synthetase] (EC 2.4.1.129)	UYSB45.3281, UYSB45.3890
		Flagellar hook-basal body complex protein FliE	UYSB45.1860
		Flagellar basal-body rod protein FlgB	UYSB45.1048
	Flagelo	RNA polymerase sigma factor RpoD	UYSB45.4072
		Flagellar hook-associated protein FlgK	UYSB45.1057
		Flagellar assembly protein FliH	UYSB45.1863
		Flagellar biosynthesis protein FliR	UYSB45.1873
		Flagellar biosynthesis protein FliP	UYSB45.1871
		Flagellar hook protein FlgE	UYSB45.1051
		Flagellar M-ring protein FliF	UYSB45.1861
		Flagellar basal-body rod modification protein FlgD	UYSB45.1050
		Flagellar P-ring protein FlgI	UYSB45.1055
		Flagellar basal-body rod protein FlgC	UYSB45.1049
		Flagellar biosynthesis protein FlhB	UYSB45.1776
		Flagellar hook-basal body complex protein FliE	UYSB45.1860
		Flagellar basal-body rod protein FlgB	UYSB45.1048
		Flagellar biosynthesis protein FliO	UYSB45.1870
		Flagellar biosynthesis protein FliS	UYSB45.1841
		Flagellar basal-body rod protein FlgF	UYSB45.1052
		Flagellar L-ring protein FlgH	UYSB45.1054
		Flagellar transcriptional activator FlhD	UYSB45.1190
		Flagellin protein FlaA	UYSB45.3711
		Flagellar basal-body P-ring formation protein FlgA	UYSB45.1047
		Flagellar motor switch protein FliN	UYSB45.1869
		Flagellar protein FlhE	UYSB45.1774
		Flagellar basal-body rod protein FlgG	UYSB45.1053
		Flagellar biosynthesis protein FlgN	UYSB45.1045
		RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	UYSB45.2534, UYSB45.3099
		Flagellar motor rotation protein MotB	UYSB45.1193, UYSB45.3171
		Flagellar protein FliJ	UYSB45.1865
		Flagellar hook-associated protein FlgL	UYSB45.1058
		Flagellum-specific ATP synthase FliI	UYSB45.1864

Categoría	Subsistema	Rol	Número del gen
		Flagellar biosynthesis protein FlhA	UYSB45.1775, UYSB45.3170
		Flagellar biosynthesis protein FliQ	UYSB45.1872
		Flagellar hook-length control protein FliK	UYSB45.1866
		Flagellar transcriptional activator FlhC	UYSB45.1191
		Flagellar motor switch protein FliM	UYSB45.1868
		Flagellar motor rotation protein MotA	UYSB45.1192
		Flagellar motor switch protein FliG	UYSB45.1862
		RNA polymerase sigma factor for flagellar operon	UYSB45.1836
		Flagellar biosynthesis protein FliT	UYSB45.1842
		Flagellar motor switch protein FliM	UYSB45.1868
		Flagellar L-ring protein FlgH	UYSB45.1054
		Chemotaxis protein CheV (EC 2.7.3.-)	UYSB45.3704
		Flagellar motor switch protein FliN	UYSB45.1869
		Flagellar biosynthesis protein FlhB	UYSB45.1776
		Flagellar motor rotation protein MotA	UYSB45.1192
		Flagellar biosynthesis protein FliR	UYSB45.1873
		RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	UYSB45.2534, UYSB45.3099
		Flagellar motor rotation protein MotB	UYSB45.1193, UYSB45.3171
		Flagellum-specific ATP synthase FliI	UYSB45.1864
		Flagellar biosynthesis protein FlhA	UYSB45.1775, UYSB45.3170
		RNA polymerase sigma factor for flagellar operon	UYSB45.1836
		Flagellar basal-body rod modification protein FlgD	UYSB45.1050
	Motilidad flagelar		

Quimiotaxis

Tabla A5: Genes pertenecientes a MCPs encontrados en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45 y no asignados a ningún subsistema de RAST

Función	Número de gen
Methyl-accepting chemotaxis protein III (ribose and galactose chemoreceptor protein)	UYSB45.791
Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer	UYSB45.852
Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)	UYSB45.1196, UYSB45.1197, UYSB45.1198

Función	Número de gen
Methyl-accepting chemotaxis sensor protein STM3152	UYSB45.1393
Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)	UYSB45.1844
Methyl-accepting chemotaxis protein III (ribose and galactose chemoreceptor protein)	UYSB45.1875
Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein	UYSB45.2274, UYSB45.2348, UYSB45.2460, UYSB45.2771, UYSB45.2855, UYSB45.3200, UYSB45.3500, UYSB45.3705, UYSB45.3958, UYSB45.1314
Methyl-accepting chemotaxis protein	UYSB45.2682, UYSB45.3937

Tabla A6: Genes pertenecientes a la quimiotaxis bacteriana encontrados en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45 y no asignados a ningún subsistema de RAST

Función	Número de gen
Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase CheB (EC 3.1.1.61)	UYSB45.1200
Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components CheY	UYSB45.1201
Chemotaxis response - phosphatase CheZ	UYSB45.1202
Chemotaxis protein CheV (EC 2.7.3.-)	UYSB45.3704
O-antigen export system permease protein RfbD	UYSB45.2002

Formación de biopelículas

Tabla A7: Genes pertenecientes a la formación de biopelículas encontrados en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45 y no asignados a ningún subsistema de RAST

Función	Número de gen
Maltodextrin ABC transporter, permease protein MdxG	UYSB45.2696
Glucosamine ABC transport system, permease protein 1	UYSB45.2519
Cyclic-di-GMP-binding biofilm dispersal mediator protein	UYSB45.1034
Cellulose biosynthesis protein BcsG	UYSB45.4663
Cellulose biosynthesis protein BcsE	UYSB45.4665
Cellulose synthase, putative	UYSB45.4667
Cellulose synthase catalytic subunit [UDP-forming] (EC 2.4.1.12)	UYSB45.4668
Cellulose synthase operon protein C	UYSB45.4670
Cellulose synthase operon protein C	UYSB45.4675
Cellulose synthase catalytic subunit [UDP-forming] (EC 2.4.1.12)	UYSB45.4677
Cellulose biosynthesis protein BcsQ	UYSB45.4678
Cyclic di-GMP-binding protein BcsB	UYSB45.4669
Cyclic di-GMP-binding protein BcsB	UYSB45.4676
Biofilm regulator BssS	UYSB45.2911
beta-1,4-glucanase (cellulase) (EC 3.2.1.4)	UYSB45.4673

Sistema de dos componentes

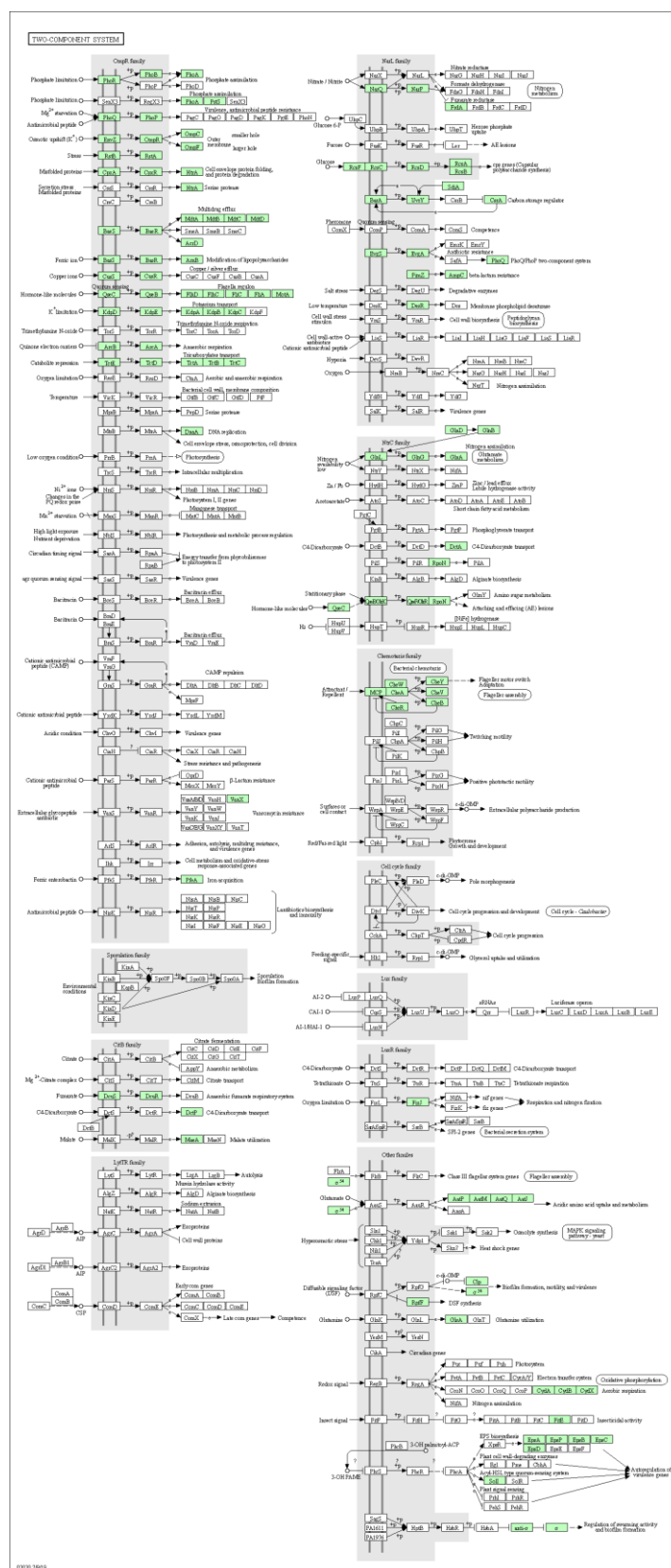


Figura I: Sistemas de 2 componentes. Los recuadros coloreados indican productos genéticos que se clasifican como ortólogos de KEGG (verde) o no (blanco) en el genoma de *Pantoea sp.* UYSB45. Imagen obtenida de la anotación realizada con el servicio web KAAS y el servicio KEGG

Tabla A8: Genes pertenecientes a los SDC encontrados en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Subsistema	Rol	Número del gen
High affinity phosphate transporter and control of PHO regulon	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB (SphR)	UYSB45.3646
	Phosphate transport system permease protein PstC (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.116, UYSB45.4459
	Phosphate transport ATP-binding protein PstB (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.114, UYSB45.4457
	Phosphate transport system permease protein PstA (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.115, UYSB45.4458
	Phosphate transport system regulatory protein PhoU	UYSB45.113
	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.117, UYSB45.3644
	Polyphosphate kinase (EC 2.7.4.1)	UYSB45.4460
	Phosphate regulon sensor protein PhoR (SphS) (EC 2.7.13.3)	UYSB45.3645

Tabla A9: Genes pertenecientes al *quorum sensing* encontrados en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Subsistema	Rol	Número del gen
Orphan regulatory proteins	Sensory histidine kinase QseC	UYSB45.152
	Two-component system response regulator QseB	UYSB45.153
	Sensory histidine kinase QseC	UYSB45.2942
	Two-component system response regulator QseB	UYSB45.2943
- none -	Class C beta-lactamase (EC 3.5.2.6)	UYSB45.1438
	Two-component transcriptional response regulator, LuxR family	UYSB45.732

Metabolismo del P

Tabla A10: Genes pertenecientes a los SDC encontrados en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Subsistema	Rol	Número del gen
Phosphate metabolism	NAD(P) transhydrogenase subunit beta (EC 1.6.1.2)	UYSB45.1383
	Phosphate transport system permease protein PstC (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.116, UYSB45.4459
	Phosphate transport system permease protein PstA (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.115, UYSB45.4458
	Exopolyphosphatase (EC 3.6.1.11)	UYSB45.4461
	Phosphate transport system regulatory protein PhoU	UYSB45.113
	NAD(P) transhydrogenase alpha subunit (EC 1.6.1.2)	UYSB45.1382
	Polyphosphate kinase (EC 2.7.4.1)	UYSB45.4460

Subsistema	Rol	Número del gen
	Low-affinity inorganic phosphate transporter	UYSB45.772, UYSB45.4303
	Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase	UYSB45.1823, UYSB45.3443, UYSB45.1823, UYSB45.3443
	Sodium-dependent phosphate transporter	UYSB45.355
	Phosphate regulon sensor protein PhoR (SphS) (EC 2.7.13.3)	UYSB45.3645
	Guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase (EC 3.6.1.40)	UYSB45.4653
	Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)	UYSB45.3955
	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB (SphR)	UYSB45.3646
	Phosphate transport ATP-binding protein PstB (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.114, UYSB45.4457
	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate- binding protein PstS (TC 3.A.1.7.1)	UYSB45.117, UYSB45.3644
	Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	UYSB45.1818
	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (EC 1.6.1.1)	UYSB45.6
	Guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase (EC 3.6.1.40)	UYSB45.4653
Polyphosphate	Polyphosphate kinase (EC 2.7.4.1)	UYSB45.4460
	Exopolyphosphatase (EC 3.6.1.11)	UYSB45.4461

Genes relacionados a la protección contra el estrés

Tabla A11: Genes pertenecientes a enzimas relacionadas a la protección contra el estrés en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Categoría	Subsistema	Rol	Número del gen
Stress Response	Oxidative stress	Superoxide dismutase [Cu-Zn] precursor (EC 1.15.1.1)	UYSB45.1271
	Oxidative stress	Superoxide dismutase [Mn] (EC 1.15.1.1)	UYSB45.29
	- none -	Catalase KatE (EC 1.11.1.6)	UYSB45.331
	- none -	Catalase-peroxidase KatG (EC 1.11.1.21)	UYSB45.589
	- none -	Manganese catalase (EC 1.11.1.6)	UYSB45.1149
	- none -	Catalase KatE (EC 1.11.1.6)	UYSB45.1499
	- none -	Catalase-like heme-binding protein	UYSB45.2532
	Glutathione: Redox cycle	Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) @ Thioredoxin peroxidase (EC 1.11.1.15)	UYSB45.1180
	Glutathione: Redox cycle	Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) @ Thioredoxin peroxidase (EC 1.11.1.15)	UYSB45.1233

Categoría	Subsistema	Rol	Número del gen
	Glutathione: Non-redox reactions	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	UYSB45.1283
	Glutathione: Non-redox reactions	Probable glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18), YfcF homolog	UYSB45.2151
	- none -	Multidrug efflux system AcrAB-TolC, inner-membrane proton/drug antiporter AcrB (RND type)	UYSB45.3571
	- none -	Multidrug efflux system AcrAB-TolC, membrane fusion component AcrA	UYSB45.3570

Genes relacionados a la PCV

Producción y regulación de fitohormonas

Tabla A12: Genes pertenecientes a la producción y regulación de fitohormonas en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Gen	Subsistema	Rol	Número del gen
<i>ipdC</i>	Pyruvate metabolism II: acetyl-CoA, acetogenesis from pyruvate	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1)	UYSB45.2258
<i>aldH</i>	Pyruvate metabolism II: acetyl-CoA, acetogenesis from pyruvate	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	UYSB45.195
<i>iaaH</i>	tRNA aminoacylation, Asp and Asn, tRNA aminoacylation, Glu and Gln	Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit A (EC 6.3.5.6) @ Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A (EC 6.3.5.7)	UYSB45.2562
<i>iaaM</i>	- none -	Phytoene desaturase (lycopene-forming) (EC 1.3.99.31)	UYSB45.2505
nitrilasa	- none -	Nitrilase (EC 3.5.5.7)	UYSB45.246
aminotransferasa	- none -	Putative aminotransferase	UYSB45.35
<i>acdS</i>	Adaptation to d-cysteine	D-cysteine desulfhydrase (EC 4.4.1.15)	UYSB45.1834

Adquisición y metabolismo de Fe

Tabla A13: Genes pertenecientes a sideróforos, adquisición y metabolismo de Fe en el genoma de *Pantoea* sp. UYSB45

Subcategoría	Subsistema	Rol	Número del gen
Sideróforos		Enterobactin esterase	UYSB45.3129

Subcategoría	Subsistema	Rol	Número del gen
	Siderophore Enterobactin	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (EC 1.3.1.28) [enterobactin] siderophore	UYSB45.3119
		Ferric enterobactin transport system permease protein FepG (TC 3.A.1.14.2)	UYSB45.3126
		Ferric enterobactin-binding periplasmic protein FepB (TC 3.A.1.14.2)	UYSB45.3123
		Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC (TC 3.A.1.14.2)	UYSB45.3127
		2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (EC 2.7.7.58) [enterobactin] siderophore	UYSB45.3121
		TonB-dependent receptor; Outer membrane receptor for ferric enterobactin and colicins B, D	UYSB45.3130
		Enterobactin exporter EntS	UYSB45.3124
		Enterobactin synthetase component F, serine activating enzyme (EC 2.7.7.-)	UYSB45.3128
		Proofreading thioesterase in enterobactin biosynthesis EntH	UYSB45.3118
		Isochorismate synthase (EC 5.4.4.2) [enterobactin] siderophore	UYSB45.3122
		sochorismatase (EC 3.3.2.1) [enterobactin] siderophore / Apo-aryl carrier domain of EntB @ Isochorismatase (EC 3.3.2.1) of siderophore biosynthesis	UYSB45.3120
		Ferric enterobactin transport system permease protein FepD (TC 3.A.1.14.2)	UYSB45.3125
	Siderophore Aerobactin	Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA	UYSB45.3348
		Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), permease component FhuB	UYSB45.3351
		Iron-chelator utilization protein	UYSB45.3794
		Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), ATP-binding protein FhuC	UYSB45.3349
		Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), periplasmic substrate binding protein FhuD	UYSB45.3350
Adquisición y metabolismo de Fe	Heme, hemin uptake and utilization systems in GramPositives	Hemin transport protein HmuS	UYSB45.3799
		TonB-dependent hemin, ferrichrome receptor	UYSB45.3798
		Ferrous iron transport peroxidase EfeB	UYSB45.1825

Subcategoría	Subsistema	Rol	Número del gen
		Ferrous iron transport permease EfeU	UYSB45.1827
	Ferrous iron transporter EfeUOB, low-pH-induced	Ferrous iron transport periplasmic protein EfeO, contains peptidase-M75 domain and (frequently) cupredoxin-like domain	UYSB45.1826
		Periplasmic hemin-binding protein	UYSB45.3800
	Hemin transport system	ABC-type hemin transport system, ATPase component	UYSB45.3802
		Hemin ABC transporter, permease protein	UYSB45.3801
		Ferric reductase (1.6.99.14)	UYSB45.494
	Encapsulating protein for DyP-type peroxidase and ferritin-like protein oligomers	Predicted outer membrane lipoprotein YfeY	UYSB45.4401
		Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP), encapsulated subgroup	UYSB45.4400
		Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP), YfeX-like subgroup	UYSB45.4399
	Siderophore Enterobactin, Ton and Tol transport systems	TonB-dependent receptor; Outer membrane receptor for ferric enterobactin and colicins B, D	UYSB45.3130
	- none -	siderophore biosynthesis protein, putative/entD enterobactin synthetase component D (EC:6.3.2.14)	UYSB45.2102
	- none -	Probable tonB-dependent receptor yncD precursor	UYSB45.1344
	- none -	TonB-ExbBD energy transducing system, TonB subunit	UYSB45.1578
	- none -	TonB-dependent hemin, ferrichrome receptor	UYSB45.3798
	- none -	TonB-ExbBD energy transducing system, ExbB subunit	UYSB45.4120
	- none -	TonB-ExbBD energy transducing system, ExbD subunit	UYSB45.4121
	Oxidative stress	Ferric uptake regulation protein FUR	UYSB45.3431

Anexo III. Tablas suplementarias Capítulo IV

Tabla obtenido con el análisis de RNA-seq

Tabla A14: DEG en *S. bicolor* en los tratamientos T1, T3 y T4 organizados dentro de su categoría GO

Nodo	Categorías GO	Nro. de genes	Rol/Receptor
N1	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	34	LRR, RLK, WAK, lectin
	phosphorus metabolic process	32	LRR, RLK, WAK, lectin
	carbohydrate metabolic process	14	Chitinase;B-glucanase
	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	13	Chitinase;B-glucanase
	lipid metabolic process	11	Flavonoids
	transferase activity, transferring acyl groups	11	Flavonoids
	carbohydrate metabolic process	10	Chitinase
	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	8	Chitinase
	nucleic acid binding	7	DEAD-box
	defense response	5	Proteinas Pathogenesis related
	lipid metabolic process	5	Flavonoids
	response to oxidative stress	4	
	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	3	
	transferase activity, transferring sulfur-containing groups	1	Flavonoids
N2	nucleoside phosphate binding	56	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, NB-ARC/WRKY125, lectin
	nucleotide binding	56	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, lectin, NB-ARC/WRKY125
	anion binding	55	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, NB-ARC/WRKY125, lectin

Nodo	Categorías GO	Nro. de genes	Rol/Receptor
	macromolecule metabolic process	52	LRR, PSII
	organonitrogen compound metabolic process	51	Chitinase, LRR, PSII
	phosphate-containing compound metabolic process	32	LRR, RLK, WAK, lectin
	kinase activity	31	LRR, RLK, WAK, lectin
	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	31	LRR, RLK, WAK, lectin
	anion binding	30	LRR
	nucleoside phosphate binding	30	LRR
	nucleotide binding	30	LRR, WAK, lectin, DEAD-Box, NB-ARC
	cation binding	15	DEAD-box
	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	13	Chitinase;B-glucanase
	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	11	Flavonoids
	organic substance biosynthetic process	10	Flavonoids
	lipid biosynthetic process	9	Flavonoids
	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8	Chitinase
	lipid biosynthetic process	4	Flavonoids
	peroxidase activity	4	
	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	3	
	polysaccharide binding	3	WAK
	protein dimerization activity	3	NB-ARC/WRKY125
	protein metabolic process	45	LRR, RLK, WAK, lectin, PSII
	cellular macromolecule metabolic process	41	LRR, RLK, WAK, lectin, PSII, Chitinase
N3	macromolecule modification	33	LRR, RLK, WAK, lectin, PSII
	purine ribonucleoside triphosphate binding	31	LRR, RLK, WAK, lectin, DEAD-box
	metal ion binding	15	DEAD-box
N4	protein kinase activity	30	LRR, RLK, WAK, lectin
	O-methyltransferase activity	8	Flavonoids

Nodo Categorías GO	Nro. de genes	Rol/Receptor
photosynthetic electron transport chain	8	PSII
O-methyltransferase activity	4	Flavonoids
catechol oxidase activity	3	WAK
O-methyltransferase activity	2	Flavonoids
response to bacterium	2	Proteínas Pathogenesis related
response to fungus	2	Proteínas Pathogenesis related
glutamyl-tRNA reductase activity	1	Flavonoids
regulation of photosynthesis	1	PSII
response to bacterium	1	Proteínas Pathogenesis related
response to fungus	1	Proteínas Pathogenesis related
purine nucleotide binding	52	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, lectin, NB-ARC/WRKY125
ribonucleotide binding	52	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, lectin, NB-ARC/WRKY125
adenyl nucleotide binding	51	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, lectin
cellular protein metabolic process	35	LRR, RLK, WAK, lectin, PSII
protein modification process	33	LRR, RLK, WAK, lectin, PSII
phosphorylation	31	LRR, RLK, WAK, lectin
N5 purine nucleotide binding	27	LRR, RLK, WAK, lectin, DEAD-box, NB-ARC
ribonucleotide binding	27	LRR, RLK, WAK, lectin, DEAD-box, NB-ARC
adenyl nucleotide binding	26	LRR, RLK, WAK, lectin, DEAD-box, NB-ARC
phosphorylation	17	LRR, WAK, lectin
transition metal ion binding	14	DEAD-box
zinc ion binding	8	DEAD-box
defense response to other organism	2	Proteínas Pathogenesis related
NADP binding	2	Flavonoids
regulation of generation of precursor metabolites and energy	1	PSII

Nodo Categorías GO		Nro. de genes	Rol/Receptor
N6	purine ribonucleotide binding	52	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, lectin, NB-ARC/WRKY125
	adenyl ribonucleotide binding	51	LRR, RLK, NBS-LRR, WAK, CC-NBS-LRR, NB-ARC, lectin, NB-ARC/WRKY125
	ATP binding	30	LRR, RLK, WAK, lectin
	protein phosphorylation	30	LRR, RLK, WAK, lectin
	purine ribonucleotide binding	27	LRR, WAK, NB-ARC, lectin, DEAD-box
	adenyl ribonucleotide binding	26	LRR, WAK, NB-ARC, lectin, DEAD-box
	ATP binding	24	LRR, WAK, lectin, DEAD-box
	ADP binding	21	LRR, NBS-LRR, CC-NBS-LRR, NB-ARC, NB-ARC/WRKY125
	defense response to bacterium	2	Proteínas Pathogenesis related
	defense response to fungus	2	Proteínas Pathogenesis related
	regulation of photosynthesis, light reaction	1	PSII

Tabla A15: Valores de DEG seleccionados en *S. bicolor* en los tratamientos T1, T3 y T4 en los nodos 1, 3 y 4.

Nodo	Gen	TPM			Rol/Receptor
		T1	T3	T4	
1	Sobic.002G023300.1	66.60	448.49	17.59	pathogenesis-related gene 1
1	Sobic.002G168300.3	4.69806	10.7134	3.327	NB-ARC domain-containing disease resistance protein/WRKY125
1	Sobic.002G249200.1	3.02	15.47	3.61	Auxin efflux carrier family protein
1	Sobic.003G172966.1	5807.06	9149.13	7.90	photosystem II reaction center protein G
1	Sobic.003G248100.3	12.96	21.79	6.11	MAP kinase 20
1	Sobic.005G047700.2	4.06	9.31	3.16	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G053200.3	9.40	13.80	4.48	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G053800.1	9.08	15.61	3.53	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G092600.1	4.42	9.71	2.94	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G094001.2	12.43	18.67	4.90	LRR and NB-ARC domains-containing disease/resistance protein

Nodo	Gen	TPM			Rol/Receptor
		T1	T3	T4	
1	Sobic.005G115900.2	10.56	23.65	1.72	HCP-like superfamily protein with MYND-type zinc finger
1	Sobic.005G118800.1	9.38	14.06	3.12	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G133200.2	3.27	4.51	0.87	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G154300.1	7.88	12.21	3.74	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
1	Sobic.005G169400.1	229.93	362.47	77.04	pathogenesis-related 4
1	Sobic.005G218201.6	2.33	12.23	2.15	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G218400.1	11.78	24.75	6.65	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
1	Sobic.005G218700.1	11.41	24.71	6.09	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
1	Sobic.006G191600.1	14.59	20.22	6.82	oxidative stress 3
1	Sobic.006G235300.1	7.06	17.68	4.07	stress enhanced protein 2
1	Sobic.008G026200.1	34.76	47.30	14.58	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
1	Sobic.008G182300.1	2.37	18.07	1.05	osmotin 34
1	Sobic.008G182400.1	8.91	17.28	3.69	osmotin 34
1	Sobic.008G182500.1	8.62	30.69	4.94	osmotin 34
1	Sobic.008G182600.1	4.21	12.72	0.95	osmotin 34
1	Sobic.008G182700.1	134.68	517.21	40.54	osmotin 34
1	Sobic.008G182800.1	215.98	855.84	61.52	osmotin 34
1	Sobic.008G182900.1	25.20	65.55	7.22	osmotin 34
1	Sobic.009G028500.6	0.00	19.68	0.04	zinc finger (CCCH-type) family protein
1	Sobic.009G082200.1	14.57	24.53	8.35	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase)10
3	Sobic.001G291000.1	0.80	0.04	5.88	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
3	Sobic.002G370500.2	11.65	10.30	62.21	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
3	Sobic.002G392100.1	2.57	3.59	23.16	Peroxidase superfamily protein
3	Sobic.003G042200.4	0.08	0.00	3.37	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
3	Sobic.003G140600.1	4.16	1.88	27.75	Peroxidase superfamily protein
3	Sobic.003G140700.2	11.67	5.63	54.72	Peroxidase superfamily protein
3	Sobic.003G205600.1	1.10	0.78	6.56	Leucine-rich repeat (LRR) family protein

Nodo	Gen	TPM			Rol/Receptor
		T1	T3	T4	
3	Sobic.004G039400.2	4.96	3.18	22.22	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase, putative, expressed
3	Sobic.004G039400.3	0.69	1.43	24.26	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase, putative, expressed
3	Sobic.005G206000.1	15.59	6.38	56.83	Disease resistance-responsive family protein
3	Sobic.009G186500.1	7.27	10.85	52.08	Peroxidase superfamily protein
4	Sobic.001G215900.2	5.45	4.55	0.00	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 2
4	Sobic.001G231300.1	744.05	830.19	1.32	photosystem II reaction center protein N
4	Sobic.001G276500.1	2640.62	2510.20	6.21	photosystem II reaction center protein C
4	Sobic.001G299900.1	607.74	532.17	2.89	photosystem II reaction center protein C
4	Sobic.001G401200.1	495.45	324.14	98.74	PYR1-like 6
4	Sobic.002G013400.1	4.72	3.85	0.86	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
4	Sobic.002G104400.1	8.68	10.81	2.89	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
4	Sobic.002G288600.1	665.84	691.02	0.24	photosystem II reaction center protein N
4	Sobic.002G288700.1	19182.84	15220.73	17.68	photosystem II reaction center protein J
4	Sobic.003G117850.1	107.23	110.90	0.09	Chloroplast Ycf2;ATPase, AAA type, core
4	Sobic.003G168800.1	5567.31	5014.05	8.39	photosystem II reaction center protein H
4	Sobic.003G168900.1	1748.08	1499.47	6.48	photosystem II reaction center protein N
4	Sobic.003G169000.1	12694.73	9303.64	19.78	photosystem II reaction center protein T
4	Sobic.003G169100.1	5710.52	4893.91	13.98	photosystem II reaction center protein B
4	Sobic.003G171950.1	1280.17	1221.06	3.12	photosystem II reaction center protein H
4	Sobic.003G172200.1	2147.19	1785.04	5.27	photosystem II reaction center protein B
4	Sobic.003G172300.1	3674.76	2355.23	7.84	photosystem II reaction center protein B
4	Sobic.003G395800.1	2090.15	2031.99	4.22	photosystem II reaction center protein C
4	Sobic.005G019600.5	14.26	14.54	4.93	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
4	Sobic.005G101800.2	16.39	13.99	4.98	Disease resistance-responsive family protein
4	Sobic.005G117400.2	16.47	20.12	5.81	WRKY DNA-binding protein 75
4	Sobic.005G169200.1	323.79	390.09	49.36	pathogenesis-related 4
4	Sobic.005G169300.1	14.19	15.28	1.44	pathogenesis-related 4

Nodo	Gen	TPM			Rol/Receptor
		T1	T3	T4	
4	Sobic.005G224900.1	20.58	16.72	3.75	chitinase A
4	Sobic.007G098500.2	78.07	77.03	20.30	auxin transport protein (BIG)
4	Sobic.007G107850.1	141.13	113.11	2.15	PDI-like 1-2
4	Sobic.007G145801.1	3528.22	1989.93	8.97	photosystem II reaction center protein K precursor
4	Sobic.007G145901.1	159.93	130.47	0.44	photosystem II reaction center protein C
4	Sobic.008G120266.1	74.43	69.10	0.00	Photosystem I, PsaA/PsaB protein
4	Sobic.009G123100.1	3137.59	2865.12	8.57	photosystem II reaction center protein I
4	Sobic.010G139200.1	493.81	500.57	0.34	photosystem II reaction center protein B
4	Sobic.010G171600.3	10.00	14.49	0.00	MAPK/ERK kinase kinase 1

TPM: Transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads. 0 ausencia del gen en el tratamiento correspondiente. Tratamientos: T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce

Tabla A16: Valores de DEG seleccionados en *S. bicolor* en los tratamientos T1, T3 y T4 en los nodos 5 y 6.

Nodo	Gen	TPM			Rol/Receptor
		T1	T3	T4	
5	Sobic.001G400700.1	542.33	272.81	77.66	PYR1-like 6
5	Sobic.001G400800.1	552.30	189.54	94.67	PYR1-like 6
5	Sobic.001G400900.1	582.99	334.20	167.74	PYR1-like 6
5	Sobic.001G401000.1	374.12	203.79	107.41	PYR1-like 12
5	Sobic.001G401100.1	286.72	122.03	39.26	PYR1-like 6
5	Sobic.001G482000.1	3.77	0.56	0.00	flavin-dependent monooxygenase 1
5	Sobic.002G195400.1	41.25	5.75	13.68	elicitor-activated gene 3-1
5	Sobic.003G082000.1	35.01	13.86	6.54	HSP20-like chaperones superfamily protein
5	Sobic.004G083600.1	5.62	0.81	0.95	HSP20-like chaperones superfamily protein
5	Sobic.004G167100.2	22.79	0.25	0.00	RAR1, disease resistance protein
5	Sobic.005G092000.3	5.02	2.86	1.51	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
5	Sobic.005G099000.1	295.74	89.00	77.89	chitinase A
5	Sobic.005G101600.2	204.08	82.92	51.14	Disease resistance-responsive family protein
5	Sobic.005G101700.1	123.01	52.19	31.94	Disease resistance-responsive family protein
5	Sobic.005G136300.1	76.86	17.38	5.83	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.005G136450.1	10.79	2.20	0.88	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.005G136600.1	7.73	1.03	0.47	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.005G137000.1	71.61	16.41	9.05	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.005G137100.1	25.65	2.16	3.06	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.005G137200.1	35.10	8.74	4.18	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.005G137300.1	44.44	15.50	13.70	Chalcone and stilbene synthase family protein
5	Sobic.007G109800.1	12.69	1.05	3.06	Seed maturation protein
5	Sobic.007G210700.4	4.23	1.97	0.00	ETHYLENE-INSENSITIVE3-like 3
5	Sobic.008G010500.1	30.83	7.44	5.25	Peroxidase superfamily protein
5	Sobic.008G189900.3	8.88	4.23	1.67	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
5	Sobic.009G215700.1	90.37	2.83	23.52	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein

Nodo	Gen	TPM			Rol/Receptor
		T1	T3	T4	
5	Sobic.009G231800.2	6.95	2.35	0.00	Auxin-responsive factor AUX/IAA-related
6	Sobic.002G392000.1	6.92	2.69	20.34	Peroxidase superfamily protein
6	Sobic.002G416500.1	23.98	5.28	55.96	Peroxidase superfamily protein
6	Sobic.003G140700.4	2.66	0.00	7.17	Peroxidase superfamily protein
6	Sobic.003G415600.2	4.72	0.00	17.62	plant defensin 1.5
6	Sobic.004G185100.2	4.74	0.42	9.34	flavodoxin-like quinone reductase 1
6	Sobic.006G167800.4	10.79	0.00	15.29	ethylene responsive element binding factor 1
6	Sobic.006G198800.1	114.28	46.67	277.79	MLP-like protein 423

TPM: Transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads. 0 ausencia del gen en el tratamiento correspondiente. Tratamientos: T1: *P. dispersa* UYSB45 - plantas de sorgo dulce. T3: *H. rubrisubalbicans* M1 - plantas de sorgo dulce y T4: Plantas de sorgo dulce

Tabla A17: genes encontrados solamente en *P. dispersa* UYSB45 endófito (T1)

Gen	Rol	Subsistema
cellular response to stress		
UYSB45.1087	Transcription-repair coupling factor	isu;Cell division-ribosomal stress proteins cluster isu;Transcription factors bacterial
UYSB45.1127	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Periplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
UYSB45.1288	Endonuclease III (EC 4.2.99.18)	isu;Control of cell elongation - division cycle in Bacilli
UYSB45.1539	Carbon starvation protein A	isu;Two-component sensor regulator linked to Carbon Starvation Protein A isu;Carbon Starvation
UYSB45.1604	Exodeoxyribonuclease III (EC 3.1.11.2)	isu;DNA repair, bacterial
UYSB45.1697	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB (EC 3.6.4.12)	- none -
UYSB45.1698	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA (EC 3.6.4.12)	- none -
UYSB45.1699	Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC (EC 3.1.22.4)	- none -
UYSB45.1711	Error-prone, lesion bypass DNA polymerase V (UmuC)	icw(1);DNA repair, bacterial UmuCD system
UYSB45.1886	Very-short-patch mismatch repair endonuclease (G-T specific)	icw(1);DNA repair, bacterial
UYSB45.1973	Exodeoxyribonuclease I (EC 3.1.11.1)	- none -
UYSB45.2077	Endonuclease IV (EC 3.1.21.2)	isu;DNA repair, bacterial
UYSB45.2870	UV damage repair endonuclease	- none -
UYSB45.3149	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase DeaD (= CshA) (EC 3.6.4.13)	- none -
UYSB45.3227	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Cytoplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -

Gen	Rol	Subsistema
UYSB45.327	Excinuclease ABC subunit A	isu;DNA repair, UvrABC system
UYSB45.3297	Mutator MutT protein (7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase) (EC 3.6.1.-)	- none -
UYSB45.3414	Endonuclease VIII	icw(3);EC699-706
UYSB45.343	SOS-response repressor and protease LexA (EC 3.4.21.88)	idu(1);DNA repair, bacterial UmuCD system idu(1);DNA repair, bacterial
UYSB45.348	PsiE protein	- none -
UYSB45.3561	Recombination protein RecR	isu;DNA processing cluster isu;DNA repair, bacterial RecFOR pathway
UYSB45.3581	DNA base-flipping protein	- none -
UYSB45.3760	DNA repair protein RadA	isu;Proteolysis in bacteria, ATP-dependent isu;DNA repair, bacterial
UYSB45.3871	Single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	- none -
UYSB45.3914	Exodeoxyribonuclease V beta chain (EC 3.1.11.5)	isu;DNA repair, bacterial RecBCD pathway
UYSB45.3915	Exodeoxyribonuclease V alpha chain (EC 3.1.11.5)	isu;CBSS-269801.1.peg.2186 icw(1);DNA repair, bacterial RecBCD pathway
UYSB45.3924	DNA mismatch repair protein MutL	isu;DNA repair, bacterial MutL-MutS system
UYSB45.4246	Ribosome-associated heat shock protein implicated in the recycling of the 50S subunit (S4 paralog)	isu;DNA replication cluster 1 isu;Cell division-ribosomal stress proteins cluster
UYSB45.4384	DNA ligase (NAD(+)) (EC 6.5.1.2)	- none -
UYSB45.4526	DNA recombination and repair protein RecO	icw(1);Glycyl-tRNA synthetase containing cluster isu;DNA repair, bacterial RecFOR pathway icw(3);CBSS-176299.4.peg.1292
UYSB45.4539	Uracil-DNA glycosylase, family 1 (EC 3.2.2.27)	- none -
UYSB45.4542	DNA repair protein RecN	isu;DNA repair, bacterial
UYSB45.461	DNA mismatch repair protein MutS	isu;DNA repair system including RecA, MutS and a hypothetical protein isu;DNA repair, bacterial MutL-MutS system
UYSB45.4620	ATP-dependent DNA helicase RecQ	isu;DNA repair, bacterial RecFOR pathway
UYSB45.467	RecA protein	isu;DNA repair, bacterial UmuCD system isu;DNA repair system including RecA, MutS and a hypothetical protein isu;DNA repair, bacterial RecFOR pathway isu;RecA and RecX isu;DNA repair, bacterial

Gen	Rol	Subsistema
UYSB45.4743	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (EC 3.2.2.23)	- none -
UYSB45.4768	ATP-dependent DNA helicase RecG (EC 3.6.4.12)	- none -
UYSB45.580	DNA polymerase IV (EC 2.7.7.7)	isu;DNA repair, bacterial
UYSB45.647	Putative SOS response-associated peptidase YedK	- none -
UYSB45.71	DNA-3-methyladenine glycosylase (EC 3.2.2.20)	isu;CBSS-326442.4.peg.1852
UYSB45.726	Methylphosphotriester-DNA--protein-cysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.n11) / DNA-3-methyladenine glycosylase II (EC 3.2.2.21)	- none -
UYSB45.727	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase (EC 2.1.1.63)	isu;DNA repair, bacterial isu;CBSS-393124.3.peg.2657
UYSB45.755	Excinuclease ABC subunit B	isu;DNA repair, UvrABC system
UYSB45.952	Cell division inhibitor	icw(2);CBSS-83333.1.peg.946 isu;Persister Cells
UYSB45.99	DNA recombination and repair protein RecF	isu;DNA repair, bacterial RecFOR pathway icw(3);DNA replication cluster 1
nitrogen compound metabolic process		
UYSB45.1231	Integration host factor alpha subunit	isu;DNA structural proteins, bacterial
UYSB45.133	N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.157)	isu;UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-phosphate Biosynthesis isu;UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-phosphate Biosynthesis
UYSB45.1603	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10)	isu;One-carbon metabolism by tetrahydropterines isu;5-FCL-like protein
UYSB45.1793	Peptide chain release factor N(5)-glutamine methyltransferase (EC 2.1.1.297)	- none -
UYSB45.1975	Gamma-glutamyl-putrescine synthetase (EC 6.3.1.11)	isu;Putrescine utilization pathways
UYSB45.2368	Aspartate racemase (EC 5.1.1.13)	idu(1);Glutamine, Glutamate, Aspartate and Asparagine Biosynthesis

Gen	Rol	Subsistema
UYSB45.3195	Peptidoglycan D,D-transpeptidase MrdA (EC 3.4.16.4)	- none -
UYSB45.3534	CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	isu;tRNA aminoacylation, Cys isu;Conserved gene cluster possibly involved in RNA metabolism
UYSB45.3557	Adenylate kinase (EC 2.7.4.3)	icw(1);Purine conversions
UYSB45.3627	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase (EC 3.5.4.26) / 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase (EC 1.1.1.193)	icw(4);Riboflavin synthesis cluster icw(4);Riboflavin synthesis cluster isu;Riboflavin, FMN and FAD metabolism icw(1);Riboflavin, FMN and FAD metabolism
UYSB45.3647	Exonuclease SbcD	isu;DNA repair, bacterial icw(1);Rad50-Mre11 DNA repair cluster
UYSB45.3914	Exodeoxyribonuclease V beta chain (EC 3.1.11.5)	isu;DNA repair, bacterial RecBCD pathway
UYSB45.3916	N-acetylglutamate synthase (EC 2.3.1.1)	isu;Arginine Biosynthesis -- gjo isu;Arginine Biosynthesis extended
UYSB45.4086	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase (EC 4.1.99.12)	isu;Riboflavin synthesis cluster isu;Riboflavin, FMN and FAD metabolism isu;riboflavin to FAD
UYSB45.4150	Uncharacterized protein YrdD	- none -
UYSB45.4387	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	isu;Cysteine Biosynthesis isu;Methionine Biosynthesis
UYSB45.4403	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (EC 3.5.1.28)	idu(3);Murein Hydrolases idu(3);Recycling of Peptidoglycan Amino Acids
UYSB45.444	Precorrin-2 oxidase (EC 1.3.1.76) @ Sirohydrochlorin ferrochelataze activity of CysG (EC 4.99.1.4) / Uroporphyrinogen-III methyltransferase (EC 2.1.1.107)	idu(2);Dissimilatory nitrite reductase idu(1);Heme and Siroheme Biosynthesis idu(2);Heme and Siroheme Biosynthesis
UYSB45.4450	Exported zinc metalloprotease YfgC precursor	- none -
UYSB45.4764	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8)	isu;Purine conversions isu;CBSS-323097.3.peg.2594
peptide transport		
UYSB45.4603	Twin-arginine translocation protein TatA	icw(1);Cluster-based Subsystem Grouping Hypotheticals - perhaps Proteosome Related icw(1);Twin-arginine translocation system

Gen	Rol	Subsistema
peptidoglycan biosynthetic process		
UYSB45.133	N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1- phosphate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.157)	isu;UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-phosphate Biosynthesis isu;UDP-N-acetylmuramate from Fructose-6-phosphate Biosynthesis
UYSB45.3195	Peptidoglycan D,D-transpeptidase MrdA (EC 3.4.16.4)	- none -
phosphate-containing compound metabolic process		
UYSB45.1240	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2)	isu;Pyruvate metabolism I: anaplerotic reactions, PEP
UYSB45.1603	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10)	isu;One-carbon metabolism by tetrahydropterines isu;5-FCL-like protein
UYSB45.3301	GMP reductase (EC 1.7.1.7)	isu;Purine conversions
UYSB45.3377	Lipid-A-disaccharide synthase (EC 2.4.1.182)	icw(1);Llipid A biosynthesis cluster
UYSB45.4265	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.5.3)	isu;Respiratory dehydrogenases 1 icw(1);Glycerol and Glycerol-3-phosphate Uptake and Utilization isu;Glycerolipid and Glycerophospholipid Metabolism in Bacteria
UYSB45.4390	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase of PTS system (EC 2.7.3.9)	- none -
UYSB45.4764	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8)	isu;Purine conversions isu;CBSS-323097.3.peg.2594
phosphorus metabolic process		
UYSB45.1240	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2)	- none -
UYSB45.133	N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1- phosphate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.157)	- none -
UYSB45.1603	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10)	- none -
UYSB45.3377	Lipid-A-disaccharide synthase (EC 2.4.1.182)	- none -

Gen	Rol	Subsistema
UYSB45.4265	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.5.3)	- none -
UYSB45.4390	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase of PTS system (EC 2.7.3.9)	- none -
UYSB45.4764	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8)	- none -
response to abiotic stimulus		
UYSB45.1127	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Periplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
UYSB45.1157	Probable two-component-system connector protein YcgZ	Probably a connector protein for RcsB/C regulation of biofilm formation, providing additional signal input into the two-component signaling pathway. Partially antagonizes the activities of YmgA and AriR, proteins that, via the Rcs phosphorelay, promote the synthesis of colanic acid, an exopolysaccharide and matrix component
UYSB45.3149	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase DeaD (= CshA) (EC 3.6.4.13)	- none -
UYSB45.3227	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Cytoplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
UYSB45.4757	Lipid A biosynthesis palmitoleoyltransferase (EC 2.3.1.242)	- none -
UYSB45.491	ClpB protein	isu;Proteolysis in bacteria, ATP-dependent isu;USS-DB-7 isu;Protein chaperones isu;Type VI secretion systems
response to stimulus		
UYSB45.1127	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Periplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
UYSB45.3914	Exodeoxyribonuclease V beta chain (EC 3.1.11.5)	isu;DNA repair, bacterial RecBCD pathway
UYSB45.3924	DNA mismatch repair protein MutL	isu;DNA repair, bacterial MutL-MutS system
UYSB45.952	Cell division inhibitor	icw(2);CBSS-83333.1.peg.946 isu;Persister Cells

Gen	Rol	Subsistema
response to stress		
UYSB45.1127	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Periplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
UYSB45.3914	Exodeoxyribonuclease V beta chain (EC 3.1.11.5)	isu;DNA repair, bacterial RecBCD pathway
UYSB45.3924	DNA mismatch repair protein MutL	isu;DNA repair, bacterial MutL-MutS system
UYSB45.4757	Lipid A biosynthesis palmitoleoyltransferase (EC 2.3.1.242)	- none -
UYSB45.952	Cell division inhibitor	icw(2);CBSS-83333.1.peg.946 isu;Persister Cells
cellular response to chemical stress, cellular response to chemical stimulus and cellular response to osmotic stress		
UYSB45.1127	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Periplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
UYSB45.3227	Trehalase (EC 3.2.1.28) @ Cytoplasmic trehalase (EC 3.2.1.28)	- none -
nucleoside binding		
UYSB45.3927	Ribosome LSU-associated GTP-binding protein HfIX	- none -

Tabla A18: Genes de interés encontrados en T3, se muestra en 1 de las categorías encontradas

Gen	Rol	Nombre del gen
phosphorus metabolic process		
LJNOHPGE_03163	Chemotaxis protein CheA	cheA
nitrogen compound metabolic process		
LJNOHPGE_01113	Cellulose synthase catalytic subunit [UDP-forming]	bcsA
LJNOHPGE_01114	Cyclic di-GMP-binding protein	bcsB
chemotaxis		
LJNOHPGE_00594	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	cheB_2

Gen	Rol	Nombre del gen
LJNOHPGE_01930	Chemoreceptor glutamine deamidase CheD	cheD
LJNOHPGE_01931	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	cheB_6
LJNOHPGE_03052	Chemotaxis protein CheW	cheW
LJNOHPGE_03082	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	cheB_9
LJNOHPGE_03163	Chemotaxis protein CheA	cheA
locomotion		
LJNOHPGE_00594	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	cheB_2
LJNOHPGE_01856	Chemotaxis protein CheV	cheV
LJNOHPGE_01930	Chemoreceptor glutamine deamidase CheD	cheD
LJNOHPGE_01931	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	cheB_6
LJNOHPGE_03052	Chemotaxis protein CheW	cheW
LJNOHPGE_03082	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	cheB_9
LJNOHPGE_03163	Chemotaxis protein CheA	cheA
LJNOHPGE_01942	Flagellar basal body rod protein FlgB	flgB
LJNOHPGE_01945	Flagellar hook protein FlgE	flgE
LJNOHPGE_01947	Flagellar basal-body rod protein FlgG	flgG
LJNOHPGE_01948	Flagellar L-ring protein	flgH
LJNOHPGE_01949	Flagellar P-ring protein	flgI
LJNOHPGE_01952	Flagellar hook-associated protein 3	flgL
LJNOHPGE_01957	Flagellar motor switch protein FliN	fliN
LJNOHPGE_01958	Flagellar motor switch protein FliM	fliM
LJNOHPGE_01962	Flagellum-specific ATP synthase	fliI
LJNOHPGE_01963	Flagellar assembly protein FliH	fliH
LJNOHPGE_01964	Flagellar motor switch protein FliG	fliG
LJNOHPGE_01965	Flagellar M-ring protein	fliF
LJNOHPGE_01966	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	fliE
LJNOHPGE_01974	Flagellin 1	fliC1

Bibliografía

1. Baedke J, Fábregas-Tejeda A, Nieves Delgado A. 2020. The holobiont concept before Margulis. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 334:149–155.
2. Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* 206:1196–1206.
3. Turner TR, James EK, Poole PS. 2013. The plant microbiome. *Genome Biol* 14:1–10.
4. Haney CH, Samuel BS, Bush J, Ausubel FM. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat plants* 1:1–9.
5. Kroll S, Agler MT, Kemen E. 2017. Genomic dissection of host–microbe and microbe–microbe interactions for advanced plant breeding. *Curr Opin Plant Biol* 36:71–78.
6. Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim ST, Weigel D, Kemen EM. 2016. Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLoS Biol* 14:1–31.
7. Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. 2012. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91–95.
8. Lundberg D, Lebeis S, Herrera Paredes S, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, Glavina del Rio T, Edgar R, Eickhorst T, Ley R, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl J. 2012. Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature* 488:86–90.
9. Guerrero R, Margulis L, Berlanga M. 2013. Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. *Int Microbiol* 16:133–143.
10. Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moënne-Loccoz Y. 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci* 22:583–595.
11. Hardoim PR, Overbeek LS Van, Berg G, Pirttilä M, Compant S, Campisano A, Döring M, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293–320.
12. Hacquard S. 2016. Disentangling the factors shaping microbiota composition across the

- plant holobiont. *New Phytol* 209:454–457.
13. Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res* 19:29–37.
 14. Pinski A, Betekhtin A, Hupert-Kocurek K, Mur LAJ, Hasterok R. 2019. Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *Int J Mol Sci* 20.
 15. Liu Y, Zuo S, Xu L, Zou Y, Song W. 2012. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Arch Microbiol* 194:1001–1012.
 16. Hardoim PR, Hardoim CCP, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2012. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS One* 7:e30438.
 17. Verma SK, White JF. 2018. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.). *J Appl Microbiol* 124:764–778.
 18. Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Asaf S, Lee JJ. 2018. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front Plant Sci* 9:1–10.
 19. Shakya M, Gottel N, Castro H, Yang ZK, Gunter L, Labbé J, Muchero W, Bonito G, Vilgalys R, Tuskan G, Podar M, Schadt CW. 2013. A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees. *PLoS One* 8.
 20. Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V, Jeffery LD. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E911–E920.
 21. Ryan RPR, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett* 278:1–9.
 22. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol plant-microbe Interact* 19:827–837.
 23. Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD Van. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16:463–71.
 24. Saikkonen K, Wali PR, Helander M. 2010. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One* 5:1–6.
 25. White JF, Kingsley KL, Zhang Q, Verma R, Obi N, Dvinskikh S, Elmore MT, Verma SK,

- Gond SK, Kowalski KP. 2019. Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Manag Sci* 75:2558–2565.
26. Badri D V., Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642–650.
 27. Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, Schenk PM. 2017. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front Microbiol* 8:2552.
 28. Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankievicz VC, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA. 2016. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ Microbiol* 18:2343–2356.
 29. Scharf BE, Hynes MF, Alexandre GM. 2016. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant Mol Biol* 90:549–559.
 30. Buschart A, Sachs S, Chen X, Herglotz J, Krause A, Reinhold-Hurek B. 2012. Flagella Mediate Endophytic Competence Rather Than Act as MAMPS in Rice– *Azoarcus* sp. Strain BH72 Interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:191–199.
 31. Barak JD, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowski AO. 2005. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl Environ Microbiol* 71:5685 LP – 5691.
 32. Yi Y, de Jong A, Frenzel E, Kuipers OP. 2017. Comparative transcriptomics of *Bacillus mycoides* root exudates reveals different genetic adaptation of endophytic and soil isolates. *Front Microbiol* 8:1–14.
 33. Dos Santos MF, Muniz de Padua VL, Nogueira EDM, Silva Hemerlyd A, Barbosa Domont G. 2010. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73:917–931.
 34. Kandel SL, Joubert PM, Doty SL. 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5:9–11.
 35. Balsanelli E, Serrato R V., de Baura VA, Sasaki G, Yates MG, Rigo LU, Pedrosa FO, de Souza EM, Monteiro RA. 2010. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environ Microbiol* 12:2233–2244.
 36. Tadra-Sfeir MZ, Souza EM, Faoro H, Müller-Santos M, Baura V a, Tuleski TR, Rigo LU, Yates MG, Wassem R, Pedrosa FO, Monteiro R a. 2011. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Appl Environ*

- Microbiol 77:2180–3.
37. James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PPM, Olivares FL, Ladha JK. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol plant-microbe Interact* 15:894–906.
 38. Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S-W, Weon H-Y, Lakshminarasimhan C. 2008. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microb Ecol* 55:21–37.
 39. Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka E. 2005. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth- Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71:1685–1693.
 40. Ji X, Lu G, Gai Y, Zheng C, Mu Z. 2008. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microb Ecol* 65:565–573.
 41. Ji X, Lu G, Gai Y, Gao H, Lu B, Kong L, Mu Z. 2010. Colonization of *Morus alba* L. by the plant-growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC Microbiol* 10:243.
 42. James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JJ, Dobereiner J. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45:757–766.
 43. Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T. 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol plant-microbe Interact* 19:181–188.
 44. Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM. 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol Ecol* 45:39–47.
 45. Bacon CW HD. 2006. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility, p. 155–194. *In* Gnanamanickam, S (ed.), *Plant-associated bacteria*. Springer, The Netherlands.
 46. Sattelmacher B. 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol* 22:167–192.
 47. James EK, Olivares FL, de Oliveira A L, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM. 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter*

- diazotrophicus under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52:747–760.
48. Suzuki T, Shimizu M, Meguro A, Hasegawa S, Nishimura T, Kunoh H. 2005. Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. *Actinomycetologica* 19:7–12.
 49. Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A. 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol Plant Microbe Interact* 26:937–45.
 50. Press CM, Loper JE, Kloepper JW. 2001. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* 91:593–598.
 51. Green ER, Mecsas J. 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Virulence Mech Bact Pathog* 4:213–239.
 52. Schmidt M, Balsanelli E, Faoro H, Cruz LM, Wassem R, de Baura VA, Weiss V, Yates MG, Madeira HMF, Pereira-Ferrari L, Fungaro MHP, de Paula FM, Pereira LFP, Vieira LGE, Olivares FL, Pedrosa FO, de Souza EM, Monteiro RA. 2012. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. *BMC Microbiol* 12:98.
 53. Shidore T, Dinse T, Ohrlein J, Becker A, Reinhold-Hurek B. 2012. Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Environ Microbiol* 14:2775–2787.
 54. Tosi M, Kovalski Mitter E, Gaiero J, Dunfield KE. 2020. It takes three to tango: the importance of microbes, host plant and soil management to elucidate manipulation strategies for the plant microbiome. *Can J Microbiol* 66:1–68.
 55. Segonzac C, Zipfel C. 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14:54–61.
 56. Zhang R, Murat F, Pont C, Langin T, Salse J. 2014. Paleo-evolutionary plasticity of plant disease resistance genes. *BMC Genomics* 15:187.
 57. Yang X, Wang J. 2015. Genome-wide analysis of NBS-LRR genes in sorghum genome revealed several events contributing to NBS-LRR gene evolution in grass species. *Evol Bioinforma* 12:9–21.
 58. Han SW, Jung HW. 2013. Molecular sensors for plant immunity; pattern recognition receptors and race-specific resistance proteins. *J Plant Biol* 56:357–366.

59. Pangesti N, Reichelt M, van de Mortel JE, Kapsomenou E, Gershenzon J, van Loon JJA, Dicke M, Pineda A. 2016. Jasmonic Acid and Ethylene Signaling Pathways Regulate Glucosinolate Levels in Plants During Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance Against a Leaf-Chewing Herbivore. *J Chem Ecol* 42:1212–1225.
60. Benhamou N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 1:233–240.
61. Constantin ME, de Lamo FJ, Vlieger B V., Rep M, Takken FLW. 2019. Endophyte-Mediated Resistance in Tomato to *Fusarium oxysporum* Is Independent of ET, JA, and SA. *Front Plant Sci* 10:1–14.
62. Rodriguez M V., Tano J, Ansaldi N, Carrau A, Srebot MS, Ferreira V, Martínez ML, Cortadi AA, Siri MI, Orellano EG. 2019. Anatomical and Biochemical Changes Induced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Stand Up for *Arabidopsis thaliana* Seedlings From *Ralstonia solanacearum* Infection. *Front Plant Sci* 10:1–20.
63. Samain E, van Tuinen D, Jeandet P, Aussenac T, Selim S. 2017. Biological control of septoria leaf blotch and growth promotion in wheat by *Paenibacillus* sp. strain B2 and *Curtobacterium plantarum* strain EDS. *Biol Control* 114:87–96.
64. Finkel OM, Castrillo G, Paredes SH, González IS, Dangl JL. 2017. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* 38:155–163.
65. Busby PE, Soman C, Wagner MR, Friesen ML, Kremer J, Bennett A, Morsy M, Eisen JA, Leach JE, Dangl JL. 2017. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS Biol* 15:e2001793.
66. Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J. 2005. Bacterial biofertilizers, p. 143–172. *In* Siddiqui, ZA (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
67. Adesemoye AO, Kloepper JW. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1–12.
68. Lloret L, Martínez-Romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev Latinoam Microbiol* 47:43–60.
69. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:107–149.
70. Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J. 2009. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and*

- Soil 321:513–535.
71. Schalk IJ, Hannauer M, Braud A. 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* 13:2844–2854.
 72. Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. 2020. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 18:152–163.
 73. Compant S, Clement C, Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669–678.
 74. Gyaneshwar P, James EKEK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-hurek B, Ladha JK. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 183:2634–2645.
 75. Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R a, Ulrich A, Hallmann J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 51:215–29.
 76. Li C-H, Zhao M-W, Tang C-M, Li S-P. 2009. Population dynamics and identification of endophytic bacteria antagonistic toward plant-pathogenic fungi in cotton root. *Microb Ecol* 59:344–356.
 77. Yang J-H, Liu H-X, Zhu G-M, Pan Y-L, 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.
 78. Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556.
 79. Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395–412.
 80. Patten C, Glick B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Micorbiology* 42:207–220.
 81. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–48.
 82. Pliego C, Kamilova F, Lugtenberg B. 2011. Plant Growth-Promoting Bacteria: Fundamentals and Exploitation, p. 295–343. *In* Maheshwari, DK (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 83. Spaepen S, Das F, Luyten E, Michiels J, Vanderleyden J. 2009. Indole-3-acetic acid-

- regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS Microbiol Lett* 291:195–200.
84. Pliego C, Kamilova F, Lugtenberg B. 2011. Plant Growth-Promoting Bacteria: Fundamentals and Exploitation, p. 295–343. *In* Maheshwari, DK (ed.), *Bacteria in Agrobiological Crop Ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 85. Glick BRB, Cheng Z, Czarny J, Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329–339.
 86. Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G. 2013. Plant Growth Promotion by Microbes, p. 561. *In* Bruijn, FJ de (ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Vol 2 First Edit. John Wiley and Sons, Inc.
 87. Imam J, Singh PK, Shukla P. 2016. Plant microbe interactions in post genomic era: Perspectives and applications. *Front Microbiol* 7:1–15.
 88. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* 64:807–838.
 89. Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6548–6553.
 90. Anguita-Maeso M, Olivares-García C, Haro C, Imperial J, Navas-Cortés JA, Landa BB. 2020. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of the Olive Xylem Microbiota: Effect of Sap Extraction Methods. *Front Plant Sci* 10:1–14.
 91. King E, Wallner A, Rimbault I, Barrachina C, Klonowska A, Moulin L, Czernic P. 2019. Monitoring of Rice Transcriptional Responses to Contrasted Colonizing Patterns of Phytobeneficial *Burkholderia* s.l. Reveals a Temporal Shift in JA Systemic Response. *Front Plant Sci* 10:1141.
 92. Coutinho BG, Licastro D, Mendonça-Previato L, Cámara M, Venturi V. 2015. Plant-Influenced Gene Expression in the Rice Endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Mol Plant Microbe Interact* 28:10–21.
 93. Sheibani-Tezerji R, Rattei T, Sessitsch A, Trognitz F, Mitter B. 2015. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia hyodromans* PSjn indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio* 6:1–11.
 94. Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Yeoh YK, Donose BC, Webb RI, Parsons J, Liao W, Sagulenko E, Lakshmanan P, Hugenholtz P, Schmidt S, Ragan MA. 2016. Crosstalk

- between sugarcane and a plant-growth promoting *Burkholderia* species. *Sci Rep* 6:37389.
95. Bordiec S, Paquis S, Lacroix H, Dhondt S, Ait Barka E, Kauffmann S, Jeandet P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clément C, Baillieul F, Dorey S. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *J Exp Bot* 62:595–603.
 96. Rekha K, Kumar RM, Ilango K, Rex A, Usha B. 2018. Transcriptome profiling of rice roots in early response to *Bacillus subtilis* (RR4) colonization. *Botany* 96:749–765.
 97. Brusamarello-Santos LCC, Alberton D, Valdameri G, Camilios-Neto D, Covre R, Lopes K de P, Zibetti Tadra-Sfeir M, Faoro H, Adele Monteiro R, Barbosa-Silva A, John Broughton W, Oliveira Pedrosa F, Wassem R, Souza EM de. 2019. Modulation of defence and iron homeostasis genes in rice roots by the diazotrophic endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Sci Rep* 9:1–15.
 98. Stringlis IA, Proietti S, Hickman R, Van Verk MC, Zamioudis C, Pieterse CMJ. 2018. Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *Plant J* 93:166–180.
 99. Pankievicz VCS, Camilios-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passeti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM. 2016. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Mol Biol* 90:589–603.
 100. Roux B, Rodde N, Jardinaud M-F, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrère S, Sallet E, Courcelle E, Moreau S, Debellé F, Capela D, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Bruand C, Gamas P. 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* 77:817–837.
 101. Camilos-Neto D, Bonato P, Wassem R, Tadra-Sfeir MZ, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Donatti L, Faoro H, Weiss VA, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM. 2014. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC Genomics* 15:1–13.
 102. Nobori T, Velásquez AC, Wu J, Kvitko BH, Kremer JM, Wang Y, He SY, Tsuda K. 2018.

- Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proc Natl Acad Sci* 115:E3055–E3064.
103. Liao ZX, Ni Z, Wei XL, Chen L, Li JY, Yu YH, Jiang W, Jiang B Le, He YQ, Huang S. 2019. Dual RNA-seq of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* infecting rice reveals novel insights into bacterial-plant interaction. *PLoS One* 14:1–16.
 104. Tuleski TR, Kimball J, Do Amaral FP, Pereira TP, Tadra-Sfeir MZ, De Oliveira Pedrosa F, De Souza EM, Balint-Kurti P, Monteiro RA, Stacey G. 2020. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* as a phytopathogenic model to study the immune system of *Sorghum bicolor*. *Mol Plant-Microbe Interact* 33:235–246.
 105. Espindula E, Sperb ER, Bach E, Passaglia LMP. 2019. The combined analysis as the best strategy for dual RNA-seq mapping. *Genet Mol Biol* 42.
 106. Kaul S, Sharma T, K. Dhar M. 2016. “Omics” Tools for Better Understanding the Plant–Endophyte Interactions. *Front Plant Sci* 7:1–9.
 107. Fabiano E, Arias A. 1990. Identification of inoculant strains and naturalized populations of *Rhizobium leguminosarum* bvtrifolii using complementary methodologies. *World J Microbiol Biotechnol* 6:121–126.
 108. Monza J, Fabiano E, Arias A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol Biochem* 24:241–247.
 109. Platero R a, Jaureguy M, Battistoni FJ, Fabiano ER. 2003. Mutations in sit B and sit D genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* 218:65–70.
 110. Platero R, Peixoto L, Brian MRO. 2004. Fur Is Involved in Manganese-Dependent Regulation of mntA (sitA) Expression in *Sinorhizobium meliloti* Fur Is Involved in Manganese-Dependent Regulation of mntA (sitA) Expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Society*.
 111. Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, Frioni L, Battistoni F, Fabiano E. 2012. New Betaproteobacterial *Rhizobium* Strains Able To Efficiently Nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Appl Enviromental Microbiol* 78:1692–1700.
 112. Battistoni F, Platero R, Noya F, Arias A, Fabiano E. 2002. Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* strains as inocula of alfalfa. *Soil Biol Biochem* 34:593–597.

113. Platero R, James EK, Rios C, Iriarte A, Sandes L, Zabaleta M, Battistoni F, Fabiano E. 2016. Novel Cupriavidus Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan Mimosa Species. Appl Environ Microbiol 82:3150–3164.
114. Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis VM, Sicardi M, Battistoni F. 2012. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (Saccharum officinarum L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. Plant Soil 356:35–49.
115. Rosconi F, Davyt D, Martínez V, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Zane H, Butler A, de Souza EM, Fabiano E. 2013. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte Herbaspirillum seropedicae. Environ Microbiol 15:916–27.
116. Mareque C, Taulé C, Beracochea M, Battistoni F. 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (Sorghum bicolor (L) Moench). Ann Microbiol 65:1057–1067.
117. Mareque C, da Silva TF, Vollú RE, Beracochea M, Seldin L, Battistoni F. 2018. The endophytic bacterial microbiota associated with sweet sorghum (Sorghum bicolor), is modulated by the chemical N-fertilization applied in the field. Int J Genomics 2018.
118. de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, Beracochea M, Battistoni F. 2016. Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (Festuca arundinacea) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. Ann Microbiol 66:329–342.
119. Doggett H. 1970. Sorghum. 403. Trop Agric Longman Sci Tech.
120. Woods J 2000. ISS and S for BM the P for E and EP in SZ. 2000. Integrating Sweet Sorghum and Sugarcane for Bioenergy: Modelling the Potential for Electricity and Ethanol Production in SE Zimbabwe. PhD Thesis: King's College London.
121. Viator H, Alison M, Gravois K, Han K, Harrell D, Hogan A, Pittman W, Salassi M, Whatley J. 2009. Sweet sorghum for biofuel production in Louisiana. LA Agric 53:16–17.
122. Siri-Prieto G, Ernst O, Martinez-Haedo M, Albano S. 2008. Productividad del sorgo dulce para la producción de etanol según variedad, época de siembra y población en el noroeste uruguayo.
123. Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM.

2012. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil* 356:175–196.
124. Baldani VLD, Baldani JI, Olivares FL, Dobereiner J. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 13:65–73.
125. Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Dobereiner J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol Fertil Soils* 21:197–200.
126. James EK, Olivares FL, Baldani JI, Dobereiner J. 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J Exp Bot* 48:785–797.
127. Broadhead DM, Freeman KC, Zummo N. 1981. ‘M81E’ A New Variety of Sweet Sorghum.
128. 2015. Resultados experimentales de la evaluación sorgo para silo y sorgo dulce para nacional de cultivares de producción de etanol. Editado por Evaluación de Cultivares Impreso por Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología INIA La Estanzuela.
129. Bashan Y, Luz E. 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth — A Critical Assessment *Advances in Agronomy*, 1st ed. Elsevier Inc.
130. InfoStat. 2008. InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
131. Wang HX, Geng ZL, Zeng Y, Shen YM. 2008. Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction. *Environ Microbiol* 10:2684–2691.
132. Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Monrozier LJ. 2001. Comparison of *nifH* Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Appl Environ Microbiol* 67:2255–2262.
133. Bulgari D, Casati P, Quaglino F, Bianco P a. 2014. Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process. *BMC Microbiol* 14:198.
134. Pellizzaro Pereira T, Plucani Do Amaral F, Dall’Asta P, Angonesi Brod FC, Maisonnave Arisi AC. 2014. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. *Mol Biotechnol* 56:660–670.

135. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278:261–269.
136. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, Stoye J, Harmsen D. 2012. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One* 7:e41606.
137. Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev I V, Lyons E, Maher C a, Martis M, Narechania A, Otillar RP, Penning BW, Salamov A a, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer KFX, Messing J, Rokhsar DS. 2009. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457:551–556.
138. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359.
139. Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. 2014. Data Analysis for 16S Microbial Profiling from Different Benchtop Sequencing Platforms. *J Microbiol Methods* 107:30–37.
140. Heijo G, Taulé C, Mareque C, Stefanello A, Souza EM, Battistoni F. 2021. Interaction among endophytic bacteria, sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars and chemical nitrogen fertilization. *FEMS Microbiol Ecol* 97.
141. Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT. 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One* 3:e2702.
142. Drogue B, Sanguin H, Chamam A, Mozar M, Llauro C, Panaud O, Prigent-Combaret C, Picault N, Wisniewski-Dyé F. 2014. Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during *Azospirillum*-rice cooperation. *Front Plant Sci* 5:1–14.
143. Sasaki K, Ikeda S, Ohkubo T, Kisara C, Sato T, Minamisawa K. 2013. Effects of plant genotype and nitrogen level on bacterial communities in rice shoots and roots. *Microbes Environ* 28:391–395.
144. Campisano A, Antonielli L, Pancher M, Yousaf S, Pindo M, Pertot I. 2014. Bacterial Endophytic Communities in the Grapevine Depend on Pest Management. *PLoS One* 9.

145. da Silva TF, Vollú RE, Marques JM, Salles JF, Seldin L. 2017. The bacterial community associated with rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) leaves responds to anthracnose symptoms. *Plant Soil* 414:69–79.
146. Fischer D, Pfitzner B, Schmid M, Simões-Araújo JL, Reis VM, Pereira W, Ormeño-Orrillo E, Hai B, & AH& MS& EM-R, Hartmann JIB& A. 2012. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Soil* 356:83–99.
147. 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, Reinhold-Hurek B. 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant Microbe Interact* 25:28–36.
148. Mareque C. 2014. Caracterización de la población endófitas bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce. Tesis de Mestría. PEDECIBA BIOLOGÍA. Montevideo, Uruguay.
149. Maropola MKA, Ramond J-B, Trindade M. 2015. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *J Microbiol Methods* 112:104–117.
150. Wemheuer F, Wemheuer B, Kretzschmar D, Pfeiffer B, Herzog S, Daniel R, Vidal S. 2016. Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species. *Lett Appl Microbiol* 62:323–329.
151. Wemheuer F, Kaiser K, Karlovsky P, Daniel R, Vidal S, Wemheuer B. 2017. Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. *Sci Rep* 7:40914.
152. Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD Van. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16:463–471.
153. Carvalhais LC, Dennis PG, Fan B, Fedoseyenko D, Kierul K, Becker A, von Wiren N, Borriss R. 2013. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLoS One* 8:e68555.
154. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:827–837.
155. Ramond J-B, Tshabuse F, Bopda CW, Cowan D a., Tuffin MI. 2013. Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities

- associated with arable sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Plant Soil* 372:265–278.
156. Pedersen WL, Chakrabarty K, Klucas R V., Vidaver AK. 1978. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with roots of winter wheat and sorghum in Nebraska. *Appl Environ Microbiol* 35:129–135.
 157. Coelho MRR, de Vos M, Carneiro NP, Marriel IE, Paiva E, Seldin L. 2008. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol Lett* 279:15–22.
 158. Rodríguez-Blanco A, Sicardi M, Frioni L. 2015. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). *Biol Fertil Soils* 51:391–402.
 159. Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ Microbiol* 5:1009–1015.
 160. Martínez-García E, de Lorenzo V. 2011. Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 13:2702–2716.
 161. de Lorenzo V, Timmis KN. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol*.
 162. Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, De Las Heras A, Páez-Espino AD, Durante-Rodríguez G, Kim J, Nikel PI, Platero R, De Lorenzo V. 2012. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41:666–675.
 163. Taulé C. 2018. Descifrando las bases moleculares de la interacción entre las cepas endófitas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 y plantas de caña de azúcar.
 164. Maria Cecilia Callejas. 2011. Caracterización ecofisiológica de matas microbianas dominadas por Cianobacterias en suelos de la isla Rey Jorge , Antártida Marítima.
 165. Josey DP, Beynon JL, Johnston AWB, Beringer JE. 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J Appl Bacteriol* 46:343–350.
 166. Rashid MH, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming,

- swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4885–4890.
167. Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
 168. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120.
 169. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A V, Sirotkin A V, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012/04/16. 19:455–477.
 170. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
 171. Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT. 2009. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics* 25:2071–2073.
 172. Bosi E, Donati B, Galardini M, Brunetti S, Sagot M-F, Lió P, Crescenzi P, Fani R, Fondi M. 2015. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics* 31:2443–2451.
 173. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206-14.
 174. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35:W182-5.
 175. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen AL V., Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran HK, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar G V., McArthur AG. 2020. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517–D525.
 176. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81–91.

177. Konstantinidis KT, Tiedje JM. 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* 187:6258–6264.
178. Richter M, Rosselló-Móra R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci* 106:19126 LP – 19131.
179. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32:929–931.
180. Segata N, Börnigen D, Morgan X, Huttenhower C. 2013. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nat Commun* 4.
181. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47:256–259.
182. Tatusov RL. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28:33–36.
183. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor.
184. Martínez-García E, de Lorenzo V. 2012. Transposon-based and plasmid-based genetic tools for editing genomes of Gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol* 813:267–283.
185. Sandes Bufano L. 2020. Bases moleculares de la interacción *Cupriavidus* – *Mimosa* : una aproximación proteómica.
186. Horton RM, Cai Z, Ho SN, Pease LR. 1990. Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8:528–535.
187. Minamisawa K, Ogawa KI, Fukuhara H, Koga J. 1996. Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. *Plant Cell Physiol* 37:449–453.
188. Palacios OA, Gomez-Anduro G, Bashan Y, de-Bashan LE. 2016. Tryptophan, thiamine and indole-3-acetic acid exchange between *Chlorella sorokiniana* and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Ecol* 92:1–11.
189. Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 47–56.
190. Arnow BYLE. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *Comp A J Comp Educ* 531–537.
191. Dimkpa C. 2016. Microbial siderophores: Production, detection and application in

- agriculture and environment. *Endocytobiosis Cell Res* 27:7–16.
192. Lynch D, Brien JO, Welch T, Clarke P, O Cuiv P, Crosa JH, Connell MO, Ócui P, Cuív PO, O'Connell M. 2001. Genetic Organization of the Region Encoding Regulation, Biosynthesis, and Transport of Rhizobactin 1021, a Siderophore Produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 183:2576–2585.
 193. Kim D, Kim WY, Lee SY, Lee SY, Yun H, Shin SY, Lee J, Hong Y, Won Y, Kim SJ, Lee YS, Ahn SM. 2013. Revising a Personal Genome by Comparing and Combining Data from Two Different Sequencing Platforms. *PLoS One*.
 194. Li M, Hazelbauer GL. 2004. Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J Bacteriol* 186:3687–3694.
 195. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R. 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 121:309–319.
 196. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183–215.
 197. Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E, Borland S, Drogue B, Prigent-Combaret C, Rouy Z, Barbe V, Herrera AM, González V, Mavingui P. 2012. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes (Basel)* 3:576–602.
 198. Honma M, Shimomura T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* 42:1825–1831.
 199. Vaseva II, Qudeimat E, Potuschak T, Du Y, Genschik P, Vandenbussche F, Van Der Straeten D. 2018. The plant hormone ethylene restricts *Arabidopsis* growth via the epidermis. *Proc Natl Acad Sci* 115:E4130 LP-E4139.
 200. Glick BR. 2020. *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* Second Edi. Springer, Cham, Springer Nature Switzerland AG 2015, 2020.
 201. Kobayashi H, Kawasaki K, Takeishi K, Noda H. 2011. Symbiont of the stink bug *Plautia stali* synthesizes rough-type lipopolysaccharide. *Microbiol Res* 167:48–54.
 202. Midha S, Bansal K, Sharma S, Kumar N, Patil PP, Chaudhry V, Patil PB. 2016. Genomic resource of rice seed associated bacteria. *Front Microbiol* 6:1–8.
 203. Gkorezis P, Van Hamme JD, Bottos EM, Thijs S, Balseiro-Romero M, Monterroso C, Kidd

- PS, Rineau F, Weyens N, Vangronsveld J. 2016. Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* GB1, a plant-growth-promoting hydrocarbonoclastic root endophyte, isolated at a diesel fuel phytoremediation site planted with *Populus*. *Genome Announc* 4:2015–2016.
204. Gan HY, Gan HM, Savka MA, Triassi AJ, Wheatley MS, Smart LB, Fabio ES, Hudson AO. 2014. Whole-genome sequences of 13 endophytic bacteria isolated from shrub willow (*Salix*) grown in Geneva, New York. *Genome Announc* 2:13–14.
 205. Tran PN, Tan NEH, Lee YP, Gan HM, Polter SJ, Dailey LK, Hudson AO, Savka MA. 2015. Whole-Genome Sequence and Classification of 11 Endophytic Bacteria from Poison Ivy (*Toxicodendron radicans*). *Genome Announc* 3:15–16.
 206. Tambong JT. 2019. Taxogenomics and systematics of the genus *Pantoea*. *Front Microbiol* 10:1–13.
 207. Gavini F, Mergaert J, Bej A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, Ley JDE. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen . nov . as *Pantoea agglomerans* comb . nov . and Description of *Pantoea dispersa* sp . nov . *Int J* 337–345.
 208. Mercado-Blanco J, Lugtenberg B. 2014. Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Curr Biotechnol* 3:60–75.
 209. Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G. 2004. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 186:6595–6604.
 210. Croes CL, Moens S, van Bastelaere E, Vanderleyden J, Michiels KW. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *Microbiology* 139:2261–2269.
 211. Barak JD, Jahn CE, Gibson DL, Charkowski AO. 2007. The Role of Cellulose and O-Antigen Capsule in the Colonization of Plants by *Salmonella enterica*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1083–1091.
 212. Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, Russo DM, Zorreguieta A, Downie JA. 2008. Glucomannan-Mediated Attachment of *Rhizobium leguminosarum* to Pea Root Hairs Is Required for Competitive Nodule Infection. *J Bacteriol* 190:4706 LP – 4715.
 213. Monteiro RA, Balsanelli E, Tuleski T, Faoro H, Cruz LM, Wassem R, de Baura VA, Tadra-Sfeir MZ, Weiss V, Darocha WD, Muller-Santos M, Chubatsu LS, Huergo LF, Pedrosa FO,

- de Souza EM. 2012. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 80:441–451.
214. 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, Reinhold-Hurek B. 2012. Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:28–36.
 215. Broxton CN, Culotta VC. 2016. SOD Enzymes and Microbial Pathogens: Surviving the Oxidative Storm of Infection. *PLoS Pathog* 12:8–13.
 216. Bernal P, Llamas MA, Filloux A. 2018. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environ Microbiol* 20:1–15.
 217. Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR. 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:85–125.
 218. Zhang P, Jin T, Sahu SK, Xu J, Shi Q, Liu H, Wang Y. 2019. The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules* 24:1–14.
 219. Imperlini E, Bianco C, Lonardo E, Camerini S, Cermola M, Moschetti G, Defez R. 2009. Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:727–738.
 220. Nascimento FX, Rossi MJ, Soares CRFS, McConkey BJ, Glick BR. 2014. New insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance. *PLoS One* 9.
 221. Barona-Gómez F, Wong U, Giannakopoulos AE, Derrick PJ, Challis GL. 2004. Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J Am Chem Soc* 126:16282–16283.
 222. Challis GL. 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* 6:601–611.
 223. Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, Friedrich F, Hurek T, Krause L, Linke B, McHardy AC, Sarkar A, Schneiker S, Syed AA, Thauer R,

- Vorhölter F-J, Weidner S, Pühler A, Reinhold-Hurek B, Kaiser O, Goesmann A. 2006. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat Biotechnol* 24:1385–91.
224. Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, Madeira HMF, Nodari RO, Osaku CA, Petzl-Erler ML, Terenzi H, Vieira LGE, Steffens MBR, Weiss VA, Pereira LFP, Almeida MIM, Alves LR, Marin A, Araujo LM, Balsanelli E, Baura VA, Chubatsu LS, Faoro H, Favetti A, Friedermann G, Glienke C, Karp S, Kava-Cordeiro V, Raittz RT, Ramos HJO, Ribeiro EMSF, Rigo LU, Rocha SN, Schwab S, Silva AG, Souza EM, Tadra-Sfeir MZ, Torres RA, Dabul ANG, Soares MAM, Gasques LS, Gimenes CCT, Valle JS, Ciferri RR, Correa LC, Murace NK, Pamphile JA, Patussi EV, Prioli AJ, Prioli SMA, Rocha CLMSC, Arantes OMN, Furlaneto MC, Godoy LP, Oliveira CEC, Satori D, Vilas-Boas LA, Watanabe MAE, Dambros BP, Guerra MP, Mathioni SM, Santos KL, Steindel M, Vernal J, Barcellos FG, Campo RJ, Chueire LMO, Nicolás MF, Pereira-Ferrari L, da Conceição Silva JL, Gioppo NMR, Margarido VP, Menck-Soares MA, Pinto FGS, de Simão RCG, Takahashi EK, Yates MG, Souza EM. 2011. Genome of *herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet* 7:1–10.
225. Schwab S. 2006. Identificacao e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amonio. Tese de Doutor en Bioquímica. Universidade Federal de Paraná.
226. Bloemberg G V., Wijfjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1170–1176.
227. Vincent JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacterial. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Blackwell Scientific.
228. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*.
229. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012/06/22. 40:e115–e115.

230. Qu W, Zhou Y, Zhang Y, Lu Y, Wang X, Zhao D, Yang Y, Zhang C. 2012. MFEprimer-2.0: a fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. *Nucleic Acids Res* 2012/06/11. 40:W205–W208.
231. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
232. Brader G, Compant S, Vescio K, Mitter B, Trognitz F, Ma LJ, Sessitsch A. 2017. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol* 55:61–83.
233. Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33:1–16.
234. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 19:827–837.
235. Mercado-Blanco J, Prieto P. 2012. Bacterial endophytes and root hairs. *Plant Soil* 361:301–306.
236. Reinhold-Hurek B, Hurek T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14:435–443.
237. 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 Environmental Microbiol* 67:5285–5293.
238. Patel JK, Madaan S, Archana G. 2018. Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops. *Microbiol Res* 215:36–45.
239. Sultana U, Desai S, Reddy G. 2016. Successful colonization of roots and Plant growth promotion of sorghum (*Sorghum bicolor* L .) by seed treatment with *Pseudomonas putida* and *Azotobacter chroococcum*. *World J Microbiol* 3:43–49.
240. Bloemberg G V, O’Toole GA, Lugtenberg BJ, Kolter R. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 63:4543–4551.
241. Tombolini R, Unge A, Davey ME, de Bruijn FJ, Jansson JK. 1997. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 22:17–28.

242. Tombolini R, van der Gaag DJ, Gerhardson B, Jansson JK. 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl Environ Microbiol* 65:3674–3680.
243. Ruppel S, Ruhlmann J, Merbach W. 2006. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. *Plant Soil* 1286:21–35.
244. Battistoni F. 2015. INFORME FINAL DEL PROYECTO FSE 5911: Estudio de la respuesta de las variedades de *Sorghum bicolor* (L) Monech cultivadas en Uruguay a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
245. Jiang L, Jeong JC, Lee JS, Park JM, Yang JW, Lee MH, Choi SH, Kim CY, Kim DH, Kim SW, Lee J. 2019. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. *Sci Rep* 9:1–13.
246. Ashajyothi M, Kumar A, Sheoran N, Ganesan P, Gogoi R, Subbaiyan GK, Bhattacharya R. 2020. Black pepper (*Piper nigrum* L.) associated endophytic *Pseudomonas putida* BP25 alters root phenotype and induces defense in rice (*Oryza sativa* L.) against blast disease incited by *Magnaporthe oryzae*. *Biol Control* 143:104181.
247. Fujishige NA, Kapadia NN, De Hoff PL, Hirsch AM. 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56:195–206.
248. Lin ML, Staba EJ. 1961. Peppermint and spearmint tissue cultures. I. Callus formation and submerged culture. *Lloydia*.
249. Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*.
250. Heijo G. 2019. Promoción del crecimiento vegetal por bacterias endófitas diazótrofes asociadas a plantas de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*).
251. Jiang H, Lei R, Ding S-W, Zhu S. 2014. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics* 15:182.
252. Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863–864.
253. McCormick RF, Truong SK, Sreedasyam A, Jenkins J, Shu S, Sims D, Kennedy M, Amirebrahimi M, Weers BD, McKinley B, Mattison A, Morishige DT, Grimwood J, Schmutz J, Mullet JE. 2018. The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome

- organization. *Plant J* 93:338–354.
254. Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 11:1650–1667.
 255. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
 256. Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S-Y, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240.
 257. Klopfenstein D V, Zhang L, Pedersen BS, Ramírez F, Warwick Vesztrocy A, Naldi A, Mungall CJ, Yunes JM, Botvinnik O, Weigel M, Dampier W, Dessimoz C, Flick P, Tang H. 2018. GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses. *Sci Rep* 8:10872.
 258. Wehrens R, Buydens L. 2007. Self- and Super-organizing Maps in R: The kohonen Package. *J Stat Softw* 21:1–19.
 259. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. 2019. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front Microbiol* 10.
 260. Tuleski TR, Baura VA de, Donatti L, Pedrosa F de O, Souza EM de, Monteiro RA. 2019. Cellulose production increases sorghum colonization and the pathogenic potential of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. *Sci Rep* 9:1–10.
 261. Brader G, Compant S, Vescio K, Mitter B, Trognitz F, Ma LJ, Sessitsch A. 2017. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol* 55:61–83.
 262. Wolf T, Kämmer P, Brunke S, Linde J. 2018. Two's company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 42:7–12.
 263. Guo L, Yu H, Wang B, Vescio K, Delulio GA, Yang H, Berg A, Zhang L, Edel-Hermann V, Steinberg C, Kistler HC, Ma L-J. 2021. Metatranscriptomic Comparison of Endophytic and Pathogenic *Fusarium* –*Arabidopsis* Interactions Reveals Plant Transcriptional Plasticity . *Mol Plant-Microbe Interact* XX:1–13.
 264. Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankievicz VC, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza

- EM, Dixon R, Monteiro RA. 2016. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ Microbiol* 18:2343–2356.
265. Taulé C, Vaz-Jauri P, Battistoni F. 2021. Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. *World J Microbiol Biotechnol* 37:1–9.
 266. Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. 1999. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet* 22:281–285.
 267. D’haeseleer P, Liang S, Somogyi R. 2000. Genetic network inference: from co-expression clustering to reverse engineering. *Bioinformatics* 16:707–726.
 268. Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, Xie Q. 2009. Dual function of *Arabidopsis* ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res* 19:1279–1290.
 269. Hardoim PR, de Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Bellieny-Rabelo D, Rojas CA, Venancio TM, Ferreira PCG, Hemerly AS. 2019. Genome-wide transcriptome profiling provides insights into the responses of maize (*Zea mays* L.) to diazotrophic bacteria. *Plant Soil*.
 270. Anil Kumar S, Hima Kumari P, Shravan Kumar G, Mohanalatha C, Kavi Kishor PB. 2015. Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. *Front Plant Sci* 6:163.
 271. Matthes A, Schmidt-Gattung S, Köhler D, Forner J, Wildum S, Raabe M, Urlaub H, Binder S. 2007. Two DEAD-box proteins may be part of RNA-dependent high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Physiol* 145:1637–1646.
 272. Kobayashi K, Otegui MS, Krishnakumar S, Mindrinos M, Zambryski P. 2007. INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT2 Encodes a Putative DEVH Box RNA Helicase Involved in Plasmodesmata Function during *Arabidopsis* Embryogenesis. *Plant Cell* 19:1885–1897.
 273. Li D, Liu H, Zhang H, Wang X, Song F. 2008. OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *J Exp Bot* 59:2133–2146.
 274. Ashraf M, Harris PJC. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51:163–190.
 275. Kamber T, Buchmann JP, Pothier JF, Smits THM, Wicker T, Duffy B. 2016. Fire blight disease reactome: RNA-seq transcriptional profile of apple host plant defense responses to *Erwinia amylovora* pathogen infection. *Sci Rep* 6:1–12.
 276. Samaniego-Gómez BY, Garruña R, Tun-Suárez JM, Kantun-Can J, Reyes-Ramírez A,

- Cervantes-Díaz L. 2016. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chil J Agric Res* 76:409–416.
277. Sarosh BR, Danielsson J, Meijer J. 2009. Transcript profiling of oilseed rape (*Brassica napus*) primed for biocontrol differentiate genes involved in microbial interactions with beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* from pathogenic *Botrytis cinerea*. *Plant Mol Biol* 70:31–45.
 278. Pang Z, Chen J, Wang T, Gao C, Li Z, Guo L, Xu J, Cheng Y. 2021. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Front Plant Sci* 12.
 279. Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev* 10:397–412.
 280. Miotto-Vilanova L, Courteaux B, Padilla R, Rabenoelina F, Jacquard C, Clément C, Comte G, Lavire C, Barka EA, Kerzaon I, Sanchez L. 2019. Impact of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN on grapevine phenolic metabolism. *Int J Mol Sci* 20.
 281. Apostol I, Heinsteins PF, Low PS. 1989. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells : Role in Defense and Signal Transduction. *Plant Physiol* 90:109–116.
 282. Alberton D, Muller-Santos M, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Cordeiro FA, Yates MG, De Oliveira Pedrosa F, De Souza EM. 2013. Comparative proteomics analysis of the rice roots colonized by *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 reveals induction of the methionine recycling in the plant host. *J Proteome Res* 12:4757–4768.
 283. Alberton D, Valdameri G, Moure VR, Monteiro RA, Pedrosa F de O, Müller-Santos M, de Souza EM. 2020. What Did We Learn From Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Grass Associations Studies Through Proteomic and Metabolomic Approaches? *Front Sustain Food Syst* 4:1–17.
 284. Jose J, Ghantasala S, Choudhury SR. 2020. Arabidopsis transmembrane receptor-like kinases (RLKS): A bridge between extracellular signal and intracellular regulatory machinery. *Int J Mol Sci* 21:1–29.
 285. Moffett P, Farnham G, Peart J, Baulcombe D. 2002. Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J* 21:4511–4519.
 286. Kadota Y, Shirasu K, Guerois R. 2010. NLR sensors meet at the SGT1–HSP90 crossroad. *Trends Biochem Sci* 35:199–207.
 287. Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR. 2015. Priming for Enhanced

- Defense. *Annu Rev Phytopathol* 53:97–119.
288. Chen X, Marszałkowska M, Reinhold-hurek B. 2020. Jasmonic Acid , Not Salicyclic Acid Restricts Endophytic Root Colonization of Rice. *Front Plant Sci* 10:1–15.
 289. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347–375.
 290. Lebeis SL, Paredes SH, Lundberg DS, Breakfield N, Gehring J, McDonald M, Malfatti S, Del Rio TG, Jones CD, Tringe SG. 2015. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science* (80-) 349:860–864.
 291. Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. 2009. Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. *Science* (80-) 323:95–101.
 292. Chen H, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H, Cui H, Cai R, Zuo J, Tang X, Li X, Guo H, Zhou J-M. 2009. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:2527–2540.
 293. Pessoa DDV, Dos-Santos CM, Vidal MS, Baldani JJ, Tadra-Sfeir MZ, de Souza EM, Simoes-Araujo JL. 2021. Herbaspirillum seropedicae strain HRC54 expression profile in response to sugarcane apoplastic fluid. *3 Biotech* 11:1–13.
 294. Iwadate Y, Kato JJ. 2017. Involvement of the ytfK gene from the PHoB regulon in stationary-phase H₂O₂ stress tolerance in escherichia coli. *Microbiol (United Kingdom)* 163:1912–1923.
 295. Gaballa A, Abeyasinghe PD, Urich G, Matthijs S, Greve H De, Cornelis P, Koedam N. 1997. Trehalose induces antagonism towards Pythium debaryanum in Pseudomonas fluorescens ATCC 17400. *Appl Environ Microbiol* 63:4340–4345.
 296. Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz G. 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the Escherichia coli response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 183:4562–4570.
 297. Pankievicz VCS, Camilios-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passetti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM. 2016. RNA-seq transcriptional profiling of Herbaspirillum seropedicae colonizing wheat (Triticum aestivum) roots. *Plant Mol Biol* 90:589–603.
 298. Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. 1999. Abiotic surface sensing and

- biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:5993–6002.
299. Taghavi S, Wu X, Ouyang L, Zhang YB, Stadler A, McCorkle S, Zhu W, Maslov S, Van Der Lelie D. 2015. Transcriptional responses to sucrose mimic the plant-associated life style of the plant growth promoting endophyte *Enterobacter* sp. 638. *PLoS One* 10:1–22.
 300. Ali S, Duan J, Charles TC, Glick BR. 2014. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J Theor Biol* 343:193–198.
 301. Taghavi S, Van Der Lelie D, Hoffman A, Zhang Y, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet* 6:e1000943.
 302. Burse A, Weingart H, Ullrich MS. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:43–54.
 303. Pavanelo DB, Houle S, Matter LB, Dozois CM, Horn F. 2018. The Periplasmic Trehalase Affects Type 1 Fimbria Production and Virulence of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strain MT78. *Infect Immun* 86:e00241-18.
 304. Vílchez JI, García-Fontana C, Román-Naranjo D, González-López J, Manzanera M. 2016. Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms. *Front Microbiol* 7:1–11.
 305. Orellana R, Chaput G, Markillie LM, Mitchell H, Gaffrey M, Orr G, DeAngelis KM. 2017. Multi-time series RNA-seq analysis of *Enterobacter lignolyticus* SCF1 during growth in lignin-amended medium. *PLoS One* 12:1–21.
 306. Reis VM, Olivares FL, de Oliveira ALM, dos Reis Junior FB, Baldani JI, Dobereiner J. 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil* 206:205–211.
 307. Maayer P De, Chan WY, Venter SN, Toth IK, Birch PRJ, Joubert F, Coutinho T. 2010. Genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. *J Bacteriol* 192:2936–2937.
 308. Palmer M, Steenkamp ET, Coetzee MPA, Chan WY, van Zyl E, De Maayer P, Coutinho TA, Blom J, Smits THM, Duffy B, Venter SN. 2017. Phylogenomic resolution of the bacterial genus *Pantoea* and its relationship with *Erwinia* and *Tatumella*. *Antonie van*

- Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol 110:1287–1309.
309. Choi O, Lim JY, Seo YS, Hwang I, Kim J. 2012. Complete genome sequence of the rice pathogen *Pantoea ananatis* strain PA13. J Bacteriol 194:531–531.
310. Wang X, Yang F, von Bodman SB. 2012. The genetic and structural basis of two distinct terminal side branch residues in stewartan and amylovoran exopolysaccharides and their potential role in host adaptation. Mol Microbiol 83:195–207.
311. Medrano EG, Bell AA. 2012. Genome sequence of *pantoea* sp. Strain sc 1, an opportunistic cotton pathogen. J Bacteriol 194:3019–3013.
312. Brown SD, Utturkar SM, Klingeman DM, Johnson CM, Martin SL, Land ML, Lu T-YS, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier D a. 2012. Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. J Bacteriol 194:5991–3.
313. De Maayer P, Chan WY, Rezzonico F, Bühlmann A, Venter SN, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Smits THM, Duffy B, Coutinho TA. 2012. Complete genome sequence of clinical isolate *pantoea ananatis* LMG 5342. J Bacteriol 194:1615–1616.
314. Tecon R, Leveau JHJ. 2012. The mechanics of bacterial cluster formation on plant leaf surfaces as revealed by bioreporter technology. Environ Microbiol 14:1325–1332.
315. Khatri I, Kaur S, Devi U, Kumar N, Sharma D, Subramanian S, Saini AK. 2013. Draft Genome Sequence of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pantoea* sp. Strain AS-PWVM4. Genome Announc 1:1–2.
316. Smith DDN, Kirzinger MWB, Stavrínides J. 2013. Draft genome sequence of the antibiotic-producing epiphytic isolate *Pantoea ananatis* BRT175. Genome Announc 1:13–14.
317. Smith DDN, Kirzinger MWB, Stavrínides J. 2013. Draft genome sequence of the antibiotic-producing cystic fibrosis isolate *Pantoea agglomerans* Tx10. Genome Announc 1:13–14.
318. Walterson AM, Smith DDN, Stavrínides J. 2014. Identification of a *Pantoea* biosynthetic cluster that directs the synthesis of an antimicrobial natural product. PLoS One 9:1–12.
319. Suleimanova AD, Beinhauer A, Valeeva LR, Chastukhina IB, Balaban NP, Shakirov E V., Greiner R, Sharipova MR. 2015. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. Appl Environ Microbiol 81:6790–6799.

320. Town J, Links M, Dumonceaux TJ. 2016. High-quality draft genome sequences of *Pantoea agglomerans* isolates exhibiting antagonistic interactions with wheat seed-associated fungi. *Genome Announc* 4:3–4.
321. Palmer M, de Maayer P, Poulsen M, Steenkamp ET, van Zyl E, Coutinho TA, Venter SN. 2016. Draft genome sequences of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea vagans* isolates associated with termites. *Stand Genomic Sci*.
322. Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, Snitkin ES, Clark TA, Luong K, Song Y, Tsai Y-C, Boitano M, Dayal J, Brooks SY, Schmidt B, Young AC, Thomas JW, Bouffard GG, Blakesley RW, Mullikin JC, Korlach J, Henderson DK, Frank KM, Palmore TN, Segre JA. 2014. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Sci Transl Med* 6:254ra126-254ra126.
323. Tan WS, Chang CY, Yin WF, Chan KG. 2015. Understanding the quorum-sensing bacterium *Pantoea stewartii* strain M009 with whole-genome sequencing analysis. *Genome Announc* 3:10–11.
324. Mohamad NI, Tan WS, Chang CY, Tee KK, Yin WF, Chan KG. 2015. Analysis of quorum-sensing *Pantoea stewartii* strain M073a through whole-genome sequencing. *Genome Announc* 3:2014–2015.
325. Wan X, Hou S, Phan N, Moss SM, Donachie SP. 2015. Draft genome sequence of *Pantoea anthophila* strain 11-2 from. *Genome Announc* 3:10–11.
326. Higuera G, González-Escalona N, Véliz C, Vera F, Romero J. 2015. Draft genome sequences of four *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains associated with walnut blight in Chile. *Genome Announc* 3:1–2.
327. Smits THM, Rezzonico F, Blom J, Goesmann A, Abelli A, Morelli RK, Vanneste JL, Duffy B. 2015. Draft genome sequence of the commercial biocontrol strain *Pantoea agglomerans* P10c. *Genome Announc* 3:3–4.
328. Lata P, Govindarajan SS, Qi F, Li JL, Maurya SK, Sahoo MK. 2017. De novo wholegenome sequence of *Pantoea latae* strain AS1, isolated from *Zamia floridana* rhizosphere in central Florida, USA. *Genome Announc* 5:1–2.