



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

Análisis del efecto de la inoculación con bacterias asociadas a sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) en cultivos de interés agronómico

Tesis de Posgrado - Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Lic. Matilde Lanza

Tutor: Dr. Federico Battistoni

Co-tutora: Dra. Cecilia Taulé

Montevideo, Uruguay

2022

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1- Fertilización química en la agricultura	2
2- El cultivo de sorgo	2
2.1 <i>Sorgo dulce</i>	2
2.2 <i>Sorgo granífero</i>	3
3- El cultivo de maíz	3
4- Microbiota bacteriana asociada a plantas de interés agrícola	4
5- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	5
5.1 <i>Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal</i>	6
6- Bacterias endófitas.....	9
6.1 <i>Fuentes de la microbiota endofítica bacteriana</i>	10
7- Relevancia de los endófitos bacterianos en la agricultura	12
7.1 <i>Metabarcoding como aproximación para el estudio de las comunidades endofíticas bacterianas</i>	13
ANTECEDENTES.....	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO 1. Identificación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal a partir de una colección de cepas asociadas a plantas de sorgo dulce (cv. M81E).	18
ESTRATEGIA	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1.1 <i>Cepas bacterianas y semillas</i>	18
1.2 <i>Identificación de cepas seleccionadas de la colección</i>	19
1.3 <i>Estudio de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de cepas seleccionadas de la colección.</i>	21
RESULTADOS.....	23
1- Selección e identificación de cepas de la colección para su evaluación como inoculantes... ..	23
2- Evaluación de la respuesta de plantas sorgo a la inoculación bacteriana en condiciones in vitro.....	26
3- Evaluación de la respuesta de cultivos de interés agronómico a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.....	29

CAPÍTULO 2. Evaluación del efecto de la inoculación con la cepa <i>Rhizobium</i> sp. UYSB13, sobre la microbiota endofítica asociada a plantas de sorgo granífero cv. ACA 727	35
ESTRATEGIA	35
MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 <i>Diseño experimental</i>	35
2.2 <i>Extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S</i>	35
2.3 <i>Análisis bioinformático</i>	37
RESULTADOS.....	40
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	60
ANEXOS.....	61
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estequiometría de la reacción catalizada por el complejo nitrogenasa.....	8
Fig. 2. Principales rutas de colonización por bacterias endófitas.....	12
Fig. 3. Mecanismo de acción de los distintos tipos de oligonucleótidos bloqueadores.....	14
Fig. 4. Evaluación de la respuesta de plantas de sorgo dulce cv. ADV 2010 a la inoculación bacteriana en condiciones <i>in vitro</i>	27
Fig. 5. Primer ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones <i>in vitro</i>	27
Fig. 6. Segundo ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones <i>in vitro</i>	28
Fig. 7. Primer ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.....	30
Fig. 8. Segundo ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.....	31
Fig. 9. Primer ensayo de respuesta de plantas de maíz cv. NT426 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.....	32
Fig. 10. Visualización de las plantas de maíz a los 4 meses post inoculación en condiciones de invernáculo.....	33
Fig. 11. Segundo ensayo de respuesta de plantas de maíz cv. NT 426, a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.....	34
Fig. 12. Curvas de rarefacción.....	42
Fig. 13. Análisis de componentes principales de las muestras evaluadas identificadas a nivel de filo.....	43
Fig. 14. Índices de diversidad de Shannon y riqueza en los distintos tratamientos.....	44
Fig. 15. Abundancia relativa de los taxa presentes en las muestras.....	46
Fig. 16. Abundancia de los taxa que presentaron diferencias significativas en los tratamientos.....	47
Fig. 17. Árbol filogenético basado en el gen <i>ARNr 16S</i> inferido por el método de máxima verosimilitud y modelo de dos parámetros de Kimura.....	48
Fig. 18. Abundancias absolutas de ASVs del género <i>Rhizobium</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de desinfección de la superficie de las semillas a desinfectar	22
Tabla 2. Similitud de secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S con mayor homología con las cepas de la colección	24
Tabla 3. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de la región V4 del gen ARNr 16S, de muestras de semillas, raíces y tallos de plantas de sorgo granífero.....	41
Tabla 4. Alineamiento de las ASVs del género <i>Rhizobium</i> con la secuencia de ARNr 16S de la cepa <i>Rhizobium</i> sp. UYSB13 inoculada.....	48

ABREVIATURAS

ACC: 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato

AIA: Ácido indol-acético

ASV: Variante de secuencia de amplicón

BPCV: Bacteria promotora del crecimiento vegetal

FBN: Fijación biológica del nitrógeno

OTU: Unidad taxonómica operacional

PCA: Análisis de coordenadas principales

PCV: Promoción del crecimiento vegetal

RSI: Resistencia sistémica inducida

RESUMEN

Los sistemas productivos actuales se basan en la aplicación de grandes cantidades de agroquímicos (insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematicidas) para lograr el óptimo crecimiento, rendimiento y sanidad de los cultivos. Los mismos provocan graves problemas de sustentabilidad económica y ambiental, lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevas alternativas tecnológicas más sustentables en los sistemas productivos agrícolas. Para esto es necesario pensar a la planta como un holobionte (Holo=todo, Bionte=organismo), definido como la suma de todos los macro y microorganismos que viven asociados a ella. Particularmente algunas de las bacterias asociadas, proveen funciones y características específicas, influyendo en el crecimiento y estado de salud de la planta. Éstas se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y son una excelente alternativa al uso de fertilizantes químicos en la agricultura.

El presente trabajo tuvo como objetivo valorar una colección de probables bacterias endófitas asociadas a plantas de sorgo dulce, mediante la evaluación de la respuesta de cultivos de interés agronómico frente a la inoculación con aislamientos seleccionados de forma de aportar conocimiento para el desarrollo de bioinoculantes. La estrategia desarrollada consistió por un lado, en evaluar cepas de una colección de bacterias endófitas de sorgo dulce en cuanto a su capacidad de promover el crecimiento vegetal en variedades de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) cv. ADV 2010, sorgo granífero (*Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*) cv. ACA 727 y maíz (*Zea mays*) cv. NT 426 en condiciones *in vitro* y de invernáculo. Por otro lado, evaluar el efecto de la inoculación con la cepa promotora del crecimiento vegetal, *Rhizobium* sp. UYSB13, sobre la microbiota endofítica de plantas de sorgo granífero. Como resultado de la estrategia realizada se identificaron 4 cepas que promovieron el crecimiento en sorgo dulce únicamente en condiciones *in vitro*; así como 4 cepas promotoras del crecimiento de sorgo granífero y una de maíz, en condiciones de invernáculo. Finalmente, se determinó que al inocular la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 en plantas de sorgo granífero del cv ACA727 en condiciones *in vitro*, la misma se establece en los distintos tejidos de la planta y afecta la diversidad, abundancia y composición de la microbiota endofítica. En su conjunto los resultados obtenidos aportan información fundamental necesaria para el desarrollo de un bioinoculante basado en bacterias promotoras del crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

1- Fertilización química en la agricultura

La explotación de cultivos de relevancia agronómica para el país requiere de grandes dosis de fertilizantes químicos. El uso de este tipo de manejo para la mejora de la productividad, tiene efectos negativos asociados que afectan el complejo sistema de los ciclos biogeoquímicos (Perrott et al. 1992; Steinshamn et al. 2004). Aproximadamente el 50% del fertilizante químico aplicado se pierde del sistema suelo-planta mediante emisiones gaseosas, lixiviación, erosión y escurrimiento, lo que lleva a una degradación de los ecosistemas, contribuyendo al efecto invernadero y contaminando con nitrato y fósforo, las aguas superficiales y la napa freática (Rejesus and Hornbaker 1999). Por otra parte, y desde el punto de vista económico, la fertilización química es uno de los principales gastos de producción en la agricultura de países como el nuestro. En su conjunto las problemáticas anteriormente expuestas reflejan la necesidad del desarrollo de alternativas de producción más sustentables desde el punto de vista económico y ambiental, que reduzcan la dependencia de la fertilización química. En ese sentido, una alternativa biotecnológica es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), en los sistemas productivos agrícolas.

2- El cultivo de sorgo

El sorgo es un cultivo perteneciente a la familia *Poaceae* originario de las estepas y sabanas del África oriental, existiendo una gran diversidad de razas y variedades (Doggett 1970). La morfología de la planta consta de un tallo cilíndrico de hasta 4,5 metros que sirve de reserva por contener altas concentraciones de azúcares. Las hojas son lineales, lanceoladas y con márgenes ondulados y su flor, de forma variable entre las razas, se encuentra en la espiga. La planta se autopoliniza, ya que la espiga está compuesta por flores bisexuales. El grano es una cariósida esférica y oblonga, de color negro, rojizo o amarillento de alrededor de 4 mm de diámetro (Artschwager 1948). En Uruguay el sorgo se siembra entre los meses de setiembre a diciembre cumpliendo un ciclo de 4 meses hasta su cosecha.

2.1 Sorgo dulce

El sorgo dulce es un cultivo denominado multipropósito porque todos los componentes de la planta tienen valor económico y a partir de ellos es posible obtener varios productos tales como alimento humano y biocombustibles, siendo los subproductos generados aprovechables para producir energía y alimento animal (Almodares and Hadi 2009).

El área de cultivo de sorgo dulce en nuestro país ha sido fluctuante a lo largo de los años. En el período 2011- 2012 alcanzó un máximo de 88.200 hectáreas mientras que el registro más reciente indica que en el período 2017-2018 se sembraron unas 29.000 hectáreas (MGAP 2018). ALUR S.A., empresa encargada de la producción de los biocombustibles en nuestro país, ha empleado principalmente el cultivar M81E para su producción sustituyéndolo progresivamente por el híbrido ADV2010 (F. Hackembruch com. personal). Las diferencias entre estos cultivares radican principalmente en su rendimiento teórico de etanol. El cultivar ADV2010 tiene un rendimiento teórico de 5,37 l/ha mientras que el cultivar M81E tiene un rendimiento teórico de 5,19 l/ha (INIA and INASE 2014).

2.2 Sorgo granífero

El sorgo granífero, se utiliza como planta forrajera que sirve como alimento animal (Carter et al. 1989). En nuestro país, la superficie total sembrada con sorgo granífero (grano seco y húmedo) en la zafra 2020- 2021 fue de aproximadamente 68.6000 hectáreas (MGAP 2021). En la zafra 2020-2021 la producción total de grano se estimó en 233.000 toneladas, volumen 9% inferior al obtenido en la zafra anterior, debido a una reducción de los rendimientos de 10% en un valor de aproximadamente 3400 kg/ha (MGAP 2021).

El cultivar ACA 727 (Agroaca Uruguay S.A) produce en promedio un 19% de su peso fresco como materia seca para forraje. La materia seca obtenida de este cultivar contiene aproximadamente un 16% de proteína cruda, 7% de lignina y un 12% de cenizas resultando un cultivo nutritivo de rápida implantación y alta capacidad de rebrote (INIA and INASE 2020).

3- El cultivo de maíz

El maíz es un cultivo anual perteneciente a la familia *Poaceae*. Es una planta alta con un tallo fuerte y sólido. Presenta hojas grandes y estrechas las cuales tienen márgenes ondulados y están espaciadas alternativamente en lados opuestos del tallo. Las flores masculinas nacen en la panoja que termina en el eje principal del tallo, mientras que las inflorescencias femeninas son espigas con un eje engrosado, las cuales maduran para convertirse en mazorcas comestibles. Las variedades de maíz amarillo y blanco son las más populares como alimento, aunque hay variedades con granos rojos, azules, rosados y negros. Cada mazorca está encerrada por hojas modificadas llamadas cáscaras (Avery 1930). El maíz es un cultivo que en nuestro país se planta tanto en primavera y verano como en otoño e invierno pero su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 14 y 26°C.

El maíz, es también un cultivo multipropósito con potencialidad de producción de bioetanol a partir de su grano, el cual es utilizado también como alimento humano y animal. En nuestro país, este cultivo alcanza una alta producción de grano de 5.760 kg/ha (Ganduglia and Nieto Alemán 2009). En el período 2011- 2012 se alcanzó el mayor registro de área destinada a este cultivo con 123.900 hectáreas, mientras que el último registro hasta la fecha indica que en el período 2017-2018 se sembraron 71.200 hectáreas, obteniéndose un rendimiento productivo de grano de 4.340 kg/ha (MGAP 2018). Si bien esta materia prima posee un rendimiento de etanol de 1.983 l/ha, significativamente menor al de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), este cultivo se adapta mejor a las condiciones climáticas de nuestro país (Ganduglia and Nieto Alemán 2009).

El cultivar NT 426 (comercializado por la empresa Rusticana S.A.) pertenece al tipo Flint que presenta un grano grande y apto para la industria alimenticia por su menor cantidad de almidón (Ferraguti et al. 2010).

4- Microbiota bacteriana asociada a plantas de interés agrícola

Desde el punto de vista de la ecología microbiana, el estudio de la microbiota asociada a las plantas es relevante por su implicancia directa en la salud y el rendimiento de los cultivos (Turner et al. 2013). Se denomina microbiota al conjunto de microorganismos presentes en un determinado hábitat, mientras que el término microbioma se utiliza para hacer referencia al conjunto de genomas de las comunidades microbianas presentes en dicho hábitat (Gill et al. 2006; Turnbaugh et al. 2007).

El microbioma de un ser vivo está fuertemente influenciado por el genoma del hospedero y puede considerarse una extensión del mismo o comprenderse como un pangenoma junto al genoma del hospedero (Turner et al. 2013; Postler and Ghosh 2017). Las plantas alojan una enorme diversidad de bacterias que proveen funciones y características específicas influenciando el fenotipo final de la planta. En ese sentido, las plantas son consideradas como holobiontes o conjunto de especies co-evolucionadas, dado el rol fundamental del microbioma en la biología de la planta (ej. germinación, crecimiento, salud, tolerancia al estrés) (Berg and Raaijmakers 2018; Mareque et al. 2018; Sare et al. 2020).

Para conocer la contribución de la microbiota bacteriana en la salud vegetal, es crucial estudiar y comprender la estructura, la diversidad, los procesos metabólicos, la adaptabilidad, así como las características benéficas del microbioma asociado a los cultivos de interés. Particularmente, la microbiota endofítica y rizosférica, así como sus variaciones frente a distintas condiciones, son consideradas un factor clave para el crecimiento y la salud vegetal.

Se ha descrito que los microbiomas asociados con la filósfera, rizósfera y endósfera de una misma planta son diferentes, así como lo son aquellos que ocupan el mismo hábitat en plantas diferentes (Lundberg et al., 2012; Turner et al., 2013). Por otra parte, las plantas alojan una enorme diversidad de bacterias que proveen funciones y características específicas influenciando el fenotipo final de la misma (Mareque et al. 2018; Sare et al. 2020). A modo de ejemplo, las comunidades que colonizan la rizósfera y la endósfera contribuyen al crecimiento de la planta, la productividad, el secuestro de carbono y la fitorremediación ambiental (Berendsen et al. 2012; Lundberg et al. 2012).

La composición de las comunidades bacterianas asociadas a los tejidos vegetales, está comprendida por los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Bulgarelli et al. 2013). La estructura y la diversidad de las comunidades bacterianas endofíticas y del suelo son afectadas por diversos factores tales como el genotipo de la planta, las prácticas agronómicas (aplicación de fertilizantes o bioinoculantes) y las condiciones ambientales (Schwieger and Tebbe 2000; Antunes et al. 2009; Mareque et al. 2018; Carreño 2019). Por este motivo, cabe resaltar la importancia de entender la contribución de la microbiota bacteriana sobre la salud y el crecimiento vegetal, cuando se aplica un bioinoculante. En ese sentido, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han permitido una mayor comprensión de la relación entre las plantas, las comunidades microbianas y su función ecológica, área en constante desarrollo (Turner et al. 2013; Sare et al. 2020).

Existen distintas formas en las que se intenta hacer uso de la microbiota benéfica de las plantas, entre las que se encuentran el desarrollo de bioinoculantes y la incorporación de la microbiota de las plantas en los programas de mejoramiento genético de los cultivos. Hasta la fecha se conocen pocos ejemplos de programas de mejoramiento que hayan considerado la composición y las funciones del microbioma vegetal. Sin embargo, se ha demostrado que la ingeniería del microbioma es realmente factible (Adam et al. 2016). Se han propuesto y probado varias estrategias para redirigir la composición y actividad del microbioma de semillas de plantas autóctonas al cambiar la cantidad y la calidad de los exudados de las semillas o las características florales (Berg and Raaijmakers 2018). Varias empresas de biotecnología, bajo la hipótesis de que las bacterias endofitas impactan directamente en la salud de los cultivos, están considerando el abordaje de esta temática para el desarrollo de nuevas aplicaciones (Berg and Raaijmakers 2018).

5- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las BPCV son aquellas que se asocian a las plantas, estimulándolas para incrementar su crecimiento, su productividad y/o mejorando su estado sanitario.

Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés en el estudio de BPCV asociadas a diferentes cultivos agrónomicamente importantes como el arroz (*Oryza sativa*), el maíz, el trigo (*Triticum vulgare*), la caña de azúcar y el sorgo, con especial interés en las bacterias capaces de fijar biológicamente el N₂ atmosférico (diazótrofas) (Dobereiner 1997; James and Olivares 1998; James 2000; Weselowski et al. 2016). Diferentes BPCV han sido aisladas de la rizósfera y de los tejidos internos de las plantas pertenecientes a la familia *Poaceae* con un alto potencial biotecnológico (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006; Hardoim et al. 2015).

5.1 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Existen distintos mecanismos de acción conocidos por los cuales las BPCV favorecen el crecimiento de las plantas que pueden clasificarse como directos o indirectos. Es importante destacar que la promoción del crecimiento por las bacterias depende de la especificidad de la interacción planta-bacteria, en donde influye el genotipo de la planta, el tipo de suelo así como de las condiciones agroclimáticas (De los Santos et al. 2015). Esto resalta la importancia de realizar los estudios para cada caso bacteria-planta particular.

La promoción del crecimiento vegetal por las bacterias puede lograrse directamente mediante los siguientes mecanismos: 1- la producción de fitohormonas (auxinas, giberlinas, citoquininas) o enzimas que regulan sus niveles en la planta como la ACC desaminasa; 2- la fijación biológica del nitrógeno (FBN); 3- el incremento en la solubilización de minerales (ej. P, K, Fe); 4- la producción de sustancias fenólicas estimulantes de la germinación de semillas, la emergencia y el establecimiento de la plántula (Malfanova 2010). Por otra parte, la promoción indirecta del crecimiento incluye: el control biológico de fitopatógenos y la inducción de los mecanismos de defensa de la planta (Fuentes-Ramirez and Caballero-Mellado 2005; Lugtenberg et al. 2013; Amna et al. 2020).

5.1.1 Producción y modulación de fitohormonas

Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales implicadas en diversos procesos relacionados con el desarrollo de la planta como son la formación y elongación de las raíces laterales y adventicias, la dominancia apical, el tropismo y el crecimiento (Patten and Glick 1996; Govindasamy et al. 2017). La auxina más estudiada en lo que respecta a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PCV) es el ácido indol acético (AIA). Esta fitohormona controla procesos fisiológicos diversos como son la diferenciación de tejidos, alargamiento y división celular así como el fototropismo y gravitropismo (Vega-celedón et al. 2016). Existen seis vías de biosíntesis de AIA en bacterias, de las cuales cinco son dependientes de triptofano, aminoácido presente en los exudados radiculares de las plantas (Spaepen et al. 2007; Vega-celedón et al. 2016). Se ha

propuesto también que el AIA puede actuar como molécula de señalización en bacterias, pudiendo tener efectos en su fisiología, así como un efecto bioestimulante en las plantas (Spaepen et al. 2007).

Etileno

El etileno es una hormona que se produce en plantas durante la germinación, maduración de frutos, abscisión o senescencia de hojas y flores. Su producción también puede inducirse como respuesta a situaciones de estrés biótico o abiótico o heridas mecánicas, generando un desarrollo anormal de las raíces, lo cual como consecuencia, repercute negativamente en el crecimiento de toda la planta (Esquivel-cote et al. 2013). Ciertas bacterias son capaces de modular la concentración de etileno al producir la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Ésta enzima es la encargada de hidrolizar el ACC, precursor del etileno, produciendo amonio y α -cetobutirato (Mei and Flinn 2010).

5.1.2 Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera y es esencial para la vida. Las plantas no pueden hacer uso del nitrógeno atmosférico, sino que utilizan únicamente los iones nitrato NO_3^- o amonio NH_4^+ presentes en el suelo como fuente de N (Young 1992). Los microorganismos diazótrofos son aquellos capaces de reducir el nitrógeno atmosférico N_2 a amoníaco NH_3 , proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Lloret and Martínez-Romero 2005). La FBN es un proceso exclusivo de procariotas y es el único por el cual es posible adquirir el nitrógeno directamente de la atmósfera. Se estima que alrededor del 60% del nitrógeno incorporado al suelo se debe a este proceso (Fernández- Pascual et al. 2002). Los microorganismos diazótrofos presentan diferentes estrategias de vida y metabolismos que incluyen microorganismos: aerobios, anaerobios, autótrofos heterótrofos, metanótrofos, fijadores de vida libre y en simbiosis (Lloret and Martínez-Romero 2005).

La FBN es mediada por el complejo enzimático nitrogenasa la cual es inactivada por el oxígeno (Peters et al. 1995). Este complejo está formado por dos metaloenzimas: por un lado, una homodimérica conocida como proteína Fe, dinitrogenasa reductasa o componente II, que funciona como un dador de electrones ATP dependiente. Por otro lado, una ferro-molibdenoproteína (con excepción, esta proteína puede ser reemplazada por nitrogenasas alternativas con Va o Fe) o componente I, responsable de catalizar la reducción de una molécula de dinitrógeno y convertirlo en dos de amonio (Mus et al. 2018). Este proceso es dependiente de Mg-ATP y genera un gran gasto energético (Fig. 1) (Mus et al. 2018).

Los beneficios de este proceso se explotan en la agricultura con el fin de reducir y optimizar la aplicación de fertilizantes nitrogenados, permitiendo reducir costos en fertilizantes así como la contaminación ambiental (Vessey 2003; Lloret and Martínez-Romero 2005).

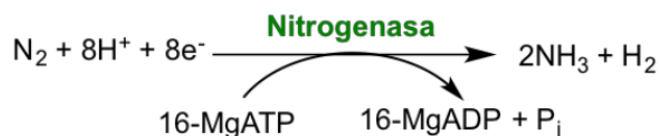


Fig. 1. Estequiometría de la reacción catalizada por el complejo nitrogenasa.

5.1.3 Solubilización de minerales

El fósforo (P) y el potasio (K), son dos de los macronutrientes esenciales para el crecimiento de los seres vivos. Sin embargo, la mayor proporción de estos minerales se encuentran formando depósitos insolubles (Hu et al. 2006). Estos reservorios insolubles pueden ser solubilizados por microorganismos y de esta forma volverse biodisponibles para el consumo de las plantas (Hu et al. 2006).

El P se encuentra formando complejos insolubles con cationes de calcio, aluminio y hierro mientras que la planta es capaz asimilarlo solamente bajo las formas H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} (Vance et al. 2003). Las bacterias solubilizadoras de fosfato operan en la rizósfera secretando ácidos orgánicos que solubilizan el P a las formas biodisponibles para las plantas. (Paredes-Mendoza and Espinosa-Victoria 2010; Richardson and Simpson 2011).

Por otra parte, más del 98% del K del suelo se encuentra en forma de silicatos. Existen microorganismos que liberan ácidos orgánicos capaces de romper la red cristalina de este compuesto liberándolo en su forma iónica K^+ o como ligando del ácido orgánico (Sugumaran and Janarthanam 2007).

El hierro (Fe), por su parte, es un micronutriente esencial para la vida que participa en importantes funciones para la célula (Aguado- Santacruz et al. 2012). La disponibilidad del hierro depende de diversos factores como el pH, el contenido de materia orgánica y arcilla del suelo, sin embargo generalmente los suelos agrícolas suelen ser deficientes en este elemento (Roca et al. 2007). El hierro puede estar presente en el suelo en sus estados de oxidación Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico) o formando sales con fosfatos, carbonatos, calcio y magnesio (Aguado- Santacruz et al. 2012). El Fe^{2+} es relativamente soluble, pero se oxida fácilmente a Fe^{3+} , que tiende a precipitarse. El Fe^{3+} es insoluble a pH neutro y básico, y por lo tanto no está disponible para las plantas en suelos alcalinos y calcáreos (Aguado- Santacruz et al. 2012). En ese sentido, algunas bacterias son capaces de

producir y liberar sideróforos, moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad para iones metálicos (Fe, Zn y Cu), que incrementan la disponibilidad de dichos micronutrientes (Rosconi et al. 2016). Esto ocurre debido a que los complejos Fe^{3+} - sideróforo bacteriano pueden ser reconocidos e internalizados por las plantas (Weyens et al. 2009).

5.1.4 Inducción de los mecanismos de defensa en las plantas

Ciertas bacterias desencadenan un fenómeno conocido como resistencia sistémica inducida (RSI) en las plantas. La RSI es efectiva contra diferentes tipos de patógenos y se induce por bacterias que no le generan síntomas de infección (van Loon et al. 1998; Kloepper and Ryu 2006). De esta forma las plantas pueden movilizar sus defensas rápida y efectivamente en presencia de un patógeno (Compant et al. 2005). Las características bacterianas inductoras de la RSI incluyen la presencia de flagelina, lipopolisacáridos, la producción de sideróforos, y la producción de compuestos orgánicos volátiles (Compant et al. 2005).

5.1.5 Control biológico de fitopatógenos

El biocontrol por parte de los microorganismos puede realizarse por competencia por los nutrientes (por ejemplo por producción de sideróforos), agua, luz o mediante la producción de sustancias bactericidas o fungicidas que inhiben el crecimiento del patógeno (Ryan et al. 2008; Reinhold-hurek and Hurek 2011).

6- Bacterias endófitas

Las plantas y las bacterias han co-evolucionado conviviendo en la rizósfera como epífitos o en el interior de las plantas como endófitos (Lloret and Martínez-Romero 2005).

Las bacterias endófitas son aquellas que colonizan activamente los tejidos internos de las plantas y establecen asociaciones sin causarle un daño aparente (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006; Hardoim et al. 2015). Dichas bacterias habitan los espacios intercelulares del córtex, endodermis y vasos del xilema; de raíces, tallos, hojas y órganos reproductivos vegetales (flores, frutas y semillas). Las bacterias endófitas son aisladas de los tejidos vegetales internos, esterilizados en su superficie de plantas sanas (Reinhold-Hurek and Hurek 1998). Para comprobar el estilo de vida endofítico, la bacteria aislada debe tener la habilidad de cumplir los postulados de Koch, debiendo ser capaz de reinfectar al huésped y persistir en él (Reinhold-Hurek and Hurek 1998; Rosenblueth and Martínez-Romero 2006). El término endófito verdadero hace referencia a bacterias que no solamente fueron aisladas de tejidos superficialmente estériles sino que además se tenga evidencia microscópica de su presencia dentro de los tejidos.

6.1 Fuentes de la microbiota endofítica bacteriana

La comunidad endofítica proviene de distintos orígenes, siendo los principales la semilla y el suelo. La microbiota de la semilla predomina en las etapas iniciales del desarrollo de la planta influyendo en la germinación y supervivencia de la plántula (Taulé et al. 2021). Por otro lado, en etapas más avanzadas del desarrollo de la planta, la microbiota proveniente del suelo es la principal fuente. Dicha microbiota interactúa con la previamente establecida en las etapas iniciales de desarrollo de la planta y en conjunto forman la microbiota endofítica resultante. Por su parte, las plantas tienen un rol activo permitiendo la colonización de aquellas bacterias con funciones que complementen su desarrollo o que tienen algún beneficio para la misma (ej diazótrofes) (Taulé et al. 2021).

6.1.1 La semilla como fuente de microbiota

La semilla representa una fuente de microbiota relevante en el desarrollo y germinación de la plántula al conferirle protección frente a estreses bióticos y abióticos (Abdullaeva et al. 2020). Se ha observado que la microbiota de semilla es crítica en la modulación de la microbiota radicular ya que estos microorganismos son capaces de colonizar muy eficientemente la rizósfera y el interior de la raíz, para luego transmitirse verticalmente a la siguiente generación (Berg and Raaijmakers 2018; Abdullaeva et al. 2020).

La composición de la microbiota endofítica de semilla es específica de la especie de planta, el suelo y está influenciada por factores ambientales (Berg and Raaijmakers 2018; Abdullaeva et al. 2020). En la microbiota de semilla confluyen bacterias provenientes de la microbiota de la semilla de la cual se originó la planta y la microbiota del suelo donde dicha planta creció (Nelson 2018). Hasta el momento se conoce que algunos microorganismos endófitos de raíz provenientes de la rizósfera pueden acceder a las flores contribuyendo a la microbiota endofítica de semilla mientras que otros endófitos de semilla pueden colonizar las plántulas emergentes y salir a la rizósfera (Nelson 2018).

6.1.2 Colonización endofítica desde el suelo

En la colonización de las plantas por las bacterias del suelo se definen tres etapas principales: (I) la colonización del rizoplasma, (II) la infección de la planta y (III) la colonización del córtex. Los pasos de colonización de la planta por las bacterias endófitas han sido descritos a partir de estudios que emplearon técnicas de visualización microscópica (Monteiro et al. 2008).

I- Colonización del rizoplasma

En una primera instancia, los endófitos bacterianos se mueven hacia las superficies de las raíces mediante flagelos guiados por respuestas quimiotácticas, atraídos por moléculas quimioatrayentes presentes en los exudados y mucílagos radiculares de las plantas (Verbon and Liberman 2016). Posteriormente las bacterias se adhieren a la superficie de la raíz. Esta adhesión es débil e inespecífica al inicio para luego tornarse irreversible. En este proceso se encuentran involucradas estructuras celulares tales como fimbrias, pilis y LPS (Dörr et al. 1998; Bertalan et al. 2009; Balsanelli et al. 2010). Luego de la adhesión se producen mecanismos de establecimiento de biopelículas sobre las superficies radiculares (Ramey et al. 2004). Las biopelículas son asociaciones de microorganismos secretores de una matriz extracelular que les permite la adhesión a superficies del ambiente. Las células que viven en dichas asociaciones son fisiológicamente diferentes a las de vida libre (Ramey et al. 2004).

En las superficies radiculares existen varios hábitats que atraen una gran diversidad de microorganismos (Compant et al. 2005). Los sitios radiculares que presentan mayor colonización bacteriana son aquellos que presentan una activa división celular y mayor exudación radicular, tales como la cofia de la raíz principal y la zona de emergencia de las raíces laterales o de los pelos radiculares (Compant et al. 2005).

II- Infección de la planta

Existen mecanismos activos y pasivos en la colonización bacteriana a partir de bacterias del suelo. Entre los mecanismos activos de infección, se encuentra el ingreso mediante la secreción de enzimas hidrolíticas de componentes de la pared vegetal (Malfanova et al. 2013). Particularmente las celulasas, tales como las endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta glucosidasas están involucradas en el proceso de infección mediante la degradación de la celulosa (Reinhold-hurek and Hurek 1998; Compant et al. 2005). En este sentido, se ha reportado en la cepa endófito *Azoarcus olearius* BH72, el rol principal de una celulasa del tipo endo-1,4-glucanasa en la colonización e infección de los tejidos de la planta de arroz (Reinhold-Hurek and Hurek 1998). También se ha reportado la implicancia de pectinasas bacterianas en el proceso de infección como enzimas fundamentales para la degradación de la pectina de la lámina intercelular (Reinhold-Hurek and Hurek 1998).

Dentro de los mecanismos pasivos de infección se encuentra el ingreso a través de rupturas que se forman en la zona de emergencia de las raíces laterales o en la zona de elongación y diferenciación de la raíz; así como en heridas, estomas o lenticelas (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006).

III Colonización del córtex

Dentro de los tejidos internos de la planta, los endófitos pueden permanecer en el sitio de infección o pueden acceder a los espacios intercelulares del córtex y luego al xilema. A través del xilema, las bacterias pueden ser transportadas sistémicamente hacia los tejidos aéreos y colonizar tallos, hojas, frutos y semillas (Fig.2) (Reinhold-Hurek et al. 2006; Gasser et al. 2011; Malfanova et al. 2013).

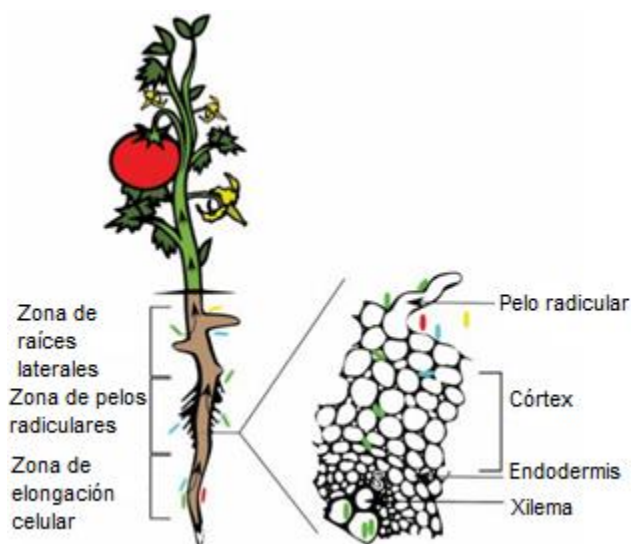


Fig. 2. Principales rutas de colonización por bacterias endófitas. En celeste y verde se representan las bacterias endófitas que permanecen en la zona de entrada y que se mueven hacia el espacio intercelular del córtex y los vasos del xilema respectivamente. En rojo y amarillo se representan las bacterias rizosféricas que no colonizan los tejidos internos de la planta (Malfanova et al. 2013).

7- Relevancia de los endófitos bacterianos en la agricultura

Diversos estudios se han desarrollado sobre la capacidad PCV de distintas bacterias endófitas en cultivos de interés agronómico como el maíz, arroz, trigo, caña de azúcar y el sorgo dulce entre otros (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006; Luo et al. 2012; Hardoim et al. 2015). Como resultado de los mismos, han sido desarrolladas diversas aplicaciones biotecnológicas en estos modelos, destacándose en Brasil la formulación de un inoculante para caña de azúcar, basado en un consorcio de 5 bacterias endófitas-diazótrofas (Martinez de Oliveira et al. 2006). Por otro lado, se ha demostrado el efecto PCV sobre plantas de sorgo dulce, por bacterias diazótrofas endófitas tales como *Azospirillum liposferum*, *A. amazoniense*, *Herbaspirillum seropedicae*, y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en condiciones de invernáculo y de campo (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006; Spaepen et al. 2007; Bertalan et al. 2009; Okon et al. 2015). Se destacan los resultados de las cepas del género *Azospirillum* para plantas de maíz, trigo, sorgo, y otros

cultivos forrajeros, que han llevado a su aplicación agronómica como bioinoculante en varios países (Okon and Labandera-Gonzalez 1994; Bashan and de-Bashan 2010).

En el país se han realizado esfuerzos en conocer parte de la microbiota con características PCV asociada a cultivos de interés nacional. En ese sentido se construyeron y caracterizaron colecciones de aislamientos bacterianos asociados a plantas de caña de, azúcar, sorgo dulce, canola, festuca, cáñamo entre otras (Taulé et al. 2012; Mareque et al. 2015; Taulé et al. 2015; de los Santos et al. 2016; Heijo et al. 2021). A partir de las mismas se han identificado diferentes cepas con potencial desarrollo como bioinoculantes.

7.1 Metabarcoding como aproximación para el estudio de las comunidades endofíticas bacterianas

La estrategia general de la técnica metabarcoding se basa en la obtención de ADN total de una muestra, seguido de la amplificación por PCR de una región del ADN bacteriano presente que resulte útil como marcador para evaluar la diversidad filogenética. En el caso de bacterias, los marcadores filogenéticos más utilizados son las regiones hipervariables del gen de ARNr 16S. Luego de la amplificación se verifica la presencia del amplicón por electroforesis en gel de agarosa, se realiza la purificación del ADN del gel y posteriormente la secuenciación masiva del ADN amplificado. Por último se debe realizar un análisis bioinformático de los datos obtenidos que permitan concluir sobre distintas preguntas biológicas planteadas según las muestras analizadas (Abdullaeva et al. 2020).

Los resultados obtenidos están influenciados por el tipo de muestra a analizar, el almacenamiento de las muestras previo a la extracción de ADN total, el método de extracción, la región hipervariable amplificada definida por el juego de cebadores utilizado, y la plataforma de secuenciación utilizada (Teng et al. 2018; Klaus Schlaeppli et al. 2019). La diversidad de secuencias dentro de una muestra compleja que puede detectarse por PCR se ve comprometida si se encuentran altas concentraciones de un tipo de ADN componente de dicha muestra ya que las secuencias menos concentradas a menudo no se amplifican porque la PCR favorece los tipos de ADN dominantes (Vestheim and Jarman 2008). Este es un problema particular en los trabajos donde se estudian bacterias endófitas, ya que el ADN extraído contiene baja proporción de ADN bacteriano en comparación con el ADN de la planta huésped que incluye el ADN mitocondrial y de cloroplastos. Estos organelos, de origen procariota, contienen secuencias homólogas a la del gen de ARNr 16S bacteriano (Beckers et al. 2016).

Existen distintos métodos para reducir la proporción de secuencias contaminantes. Dentro de los métodos de depleción pre amplificación existen la adaptación de los protocolos de extracción de ADN para reducir la co-extracción del ADN de los organelos o la separación del ADN del huésped y

el ADN microbiano por diferencias en la densidad de metilación CpG (Beckers et al. 2016). Dentro de los mecanismos de depleción durante la amplificación se encuentran el PCR *clamping*, que utiliza sondas de ácido nucleico con péptidos, peptide nucleic acid (PNA) u oligonucleótidos bloqueadores para reducir la amplificación de secuencias provenientes del hospedero (Beckers et al. 2016). En relación a los oligonucleótidos bloqueadores, se han evaluado diferentes tipos: los bloqueadores inhibidores de la hibridación (Fig.3a), los bloqueadores por detención de la elongación (Fig.3b) y los bloqueadores inhibidores de la elongación (Fig. 3c) (Vestheim and Jarman 2008).

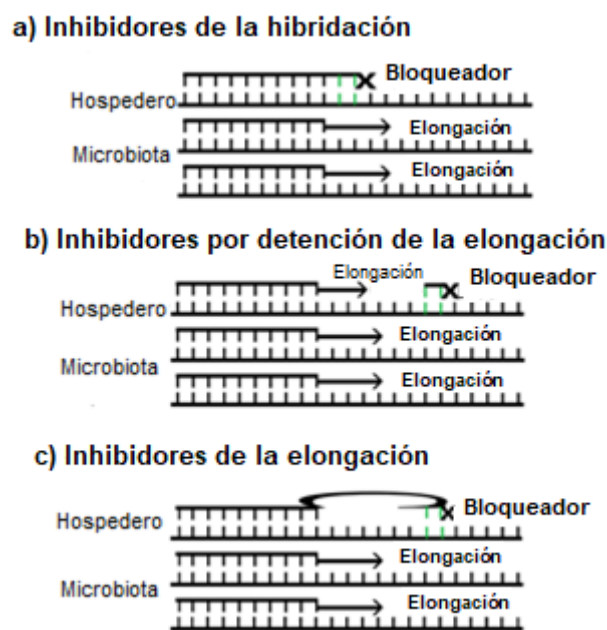


Fig. 3. Mecanismo de acción de los distintos tipos de oligonucleótidos bloqueadores. Bloqueo de la amplificación no objetivo, sólo se amplifican las secuencias objetivo utilizando cebadores universales. El bloqueador puede ser un oligonucleótido de ADN modificado que no inicia la amplificación o una sonda. A) Inhibidores de la hibridación. B) Inhibidores por detención de la elongación. C) Inhibidores de la elongación. (Modificado de Vestheim and Jarman 2008).

ANTECEDENTES

El laboratorio de Interacción Planta- Microorganismo del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del IIBCE cuenta con una colección de 291 bacterias aisladas a partir de los tejidos internos (semillas, raíces y tallos), de plantas de sorgo dulce cv. M81E. Dicha colección fue construida y caracterizada *in vitro* identificándose 114 aislamientos que poseían características PCV, tales como, la capacidad de solubilizar fosfatos, de fijar el nitrógeno atmosférico, de producir la fitohormona ácido indol-acético, de producir sideróforos; así como de poseer la enzima ACC desaminasa (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021). Asimismo, se detectaron diversos mecanismos involucrados en la interacción planta bacteria tales como la producción de hemicelulasas, celulasas, proteasas y enzimas ligninolíticas (Heijo 2015; Mareque et al. 2015). Estos trabajos mostraron una amplia variedad de aislamientos, con diferentes características lo que le da a la colección un gran potencial biotecnológico.

Teniendo en cuenta esta caracterización, en trabajos previos se seleccionaron aislamientos para ser evaluados como inoculantes de plantas de sorgo dulce en los cultivares M81E y ADV2010. Se ensayaron 44 aislamientos en condiciones *in vitro* y 12 en condiciones de invernáculo (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021). Los resultados mostraron que las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13, *Pantoea* sp. UYSB45, *Enterobacter* sp. UYSB89, *Bacillus* sp. UYSB119 y *Kosakonia* sp. UYSB139, son PCV de los cultivares M81E y ADV2010 en condiciones de invernáculo. También se estudió el efecto combinado de la fertilización química nitrogenada y la inoculación de dos cepas PCV en plantas de sorgo dulce de ambos cultivares, en condiciones de invernáculo (Heijo et al. 2021). Mediante esta aproximación se pudo demostrar que la inoculación con las cepas *Enterobacter* sp. UYSB89 y *Kosakonia* sp. UYSB139 en combinación con una fertilización nitrogenada de 75 kg N/ha (la mitad de la dosis utilizada en condiciones de campo), mejora el crecimiento de plantas de sorgo dulce en comparación con plantas fertilizadas con 75 y 150 kg N/ha (Heijo et al. 2021). Estos resultados indican que se podría evaluar reducir a la mitad la concentración de fertilizante químico nitrogenado agregado en combinación con la inoculación en plantas de sorgo del cultivar ADV2010, sin comprometer la productividad del cultivo.

Por otro lado, con la finalidad de ahondar en el conocimiento de la interacción de diferentes aislamientos PCV con plantas de sorgo dulce, se describió el modelo de infección y colonización de plantas de sorgo dulce cv. M81E, por las cepas *Enterobacter* sp. UYSB89, *Bacillus* sp. UYSB119 y *Kosakonia* sp. UYSB139. Esto fue realizado mediante una aproximación microscópica y de biología molecular, definiéndose a los mismos como endófitos verdaderos (Heijo 2015, 2019).

Por último, se estudió el efecto de la fertilización química nitrogenada sobre la estructura y diversidad de la microbioma endofítico total y diazotrófico asociado a plantas de sorgo dulce cv.

M81E. El análisis de dichas comunidades se realizó en base a los genes ARNr 16S y *nifH* respectivamente, mediante las técnicas DGGE y qPCR. Los resultados obtenidos mostraron que la comunidad endofítica se estructura según el órgano de la planta, y en cada órgano de acuerdo a la fertilización química, mientras que la comunidad endofítica-diazótrofa se estructura según la fertilización química aplicada en campo (Mareque et al. 2018).

Si bien se han ensayado la respuesta de sorgo dulce frente a la inoculación con varias cepas de la colección (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021), es necesario realizar un mayor esfuerzo en la evaluación de la capacidad PCV por parte de un mayor número de cepas y extenderlo a nuevos cultivos para continuar explorando su potencial como bioinoculantes.

HIPÓTESIS

La inoculación de plantas de interés agronómico con cepas bacterianas aisladas de plantas de sorgo dulce, afecta la microbiota endofítica de dichas plantas y provoca una promoción del crecimiento vegetal.

OBJETIVO GENERAL

Valorizar una colección de probables endófitos bacterianos asociados a sorgo dulce mediante la evaluación de su efecto al inocularse en cultivos de interés agronómico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Seleccionar e identificar aislamientos de la colección de bacterias asociadas a plantas de sorgo dulce.
- 2- Evaluar la respuesta de plantas de sorgo dulce y sorgo granífero a la inoculación bacteriana en condiciones *in vitro*.
- 3- Evaluar la respuesta de plantas de sorgo dulce, sorgo granífero y maíz a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.
- 4- Evaluar el efecto de la inoculación con una BPCV seleccionada sobre la microbiota endofítica de plantas de sorgo granífero.

CAPÍTULO 1. Identificación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal a partir de una colección de cepas asociadas a plantas de sorgo dulce (cv. M81E).

ESTRATEGIA

En este trabajo se buscó valorizar una colección de bacterias asociadas a plantas de sorgo dulce del cultivar M81E disponible en el laboratorio (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021). La valorización de la colección se basó en la búsqueda de cepas con potencial de promover el crecimiento vegetal en plantas de interés agronómico como el sorgo dulce, el sorgo granífero y el maíz. La colección fue previamente caracterizada *in vitro* identificándose diversos mecanismos PCV, pero se desconoce la identidad a nivel de género de algunas cepas de interés. En este capítulo se realizó por un lado, la identificación y tipificación genómica de cepas de la colección seleccionadas de acuerdo a sus características PCV identificadas *in vitro*. Por otro lado, cepas seleccionadas fueron evaluadas como inoculantes en ensayos en condiciones *in vitro* y de invernáculo, en los cultivos mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Cepas bacterianas y semillas

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo provienen de una colección de probables endófitos asociados a los tejidos de raíces, tallos y semillas de plantas de sorgo dulce del cultivar comercial M81E (Anexo 1). Las bacterias fueron aisladas en distintos medios de cultivo de forma de obtener una colección con una gran diversidad bacteriana (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021).

Las semillas de sorgo utilizadas en esta tesis, corresponden al cultivar de sorgo dulce ADV 2010, provisto por la empresa ALUR S.A y al cultivar comercial de sorgo granífero ACA 727. El cultivar ADV 2010 fue desarrollado por la empresa Advanta Semillas (<http://www.advantaseeds.com.ar/>), a partir de la hibridación de las variedades *S. bicolor* y *S. saccharatum*. Este cultivar presenta un elevado contenido de azúcares solubles y rendimiento estimado de etanol, entre otras características positivas de interés industrial (INIA and INASE 2014; INIA 2015). Por su parte, el cultivar ACA 727 fue desarrollado por la Asociación de Cooperativas Argentinas, Cooperativa Limitada (<https://www.acacoop.com.ar/>), a partir de la hibridación de las variedades *S. bicolor* y *S.*

sudanense. Este cultivar comercial es muy utilizado en nuestro país como planta forrajera para pastoreo del ganado (INIA and INASE 2020).

En lo que respecta al cultivo de maíz, se utilizaron semillas del cultivar comercial NT 426. Este cultivar es un híbrido producido por el criadero Rusticana (<http://www.rusticanaseed.com.ar/es/>) muy utilizado en nuestro país por su alto rendimiento de producción de grano (INTA 2010).

1.2 Identificación de cepas seleccionadas de la colección

1.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de lisado de colonia

Para esto, una colonia de la cepa de interés crecida en placas de Petri con medio sólido TSA, fue suspendida en 100 µl de agua miliQ estéril. La suspensión obtenida se centrifugó por 2 min a 15600 g, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, el pellet se suspendió en 100 µl de NaOH 0,05 M incubándose primero por 4 minutos a 100°C, seguido de 2 minutos en hielo. A continuación, a la suspensión se le agregaron 900 µl de agua miliQ estéril, centrifugándose por 2 minutos a 15600 g. Finalmente, 700 µl de la capa superior del sobrenadante se conservaron a -20°C, para utilizarlos como suspensión de trabajo (Taulé et al. 2012; Mareque et al. 2015; de los Santos et al. 2016).

1.2.2 Amplificación de gen ARNr 16S

Para la reacción de PCR se utilizaron los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl con 25 µl de Master Mix 2x (Thermo Scientific DreamTaq Green PCR), 1 µl de cada cebador 20 µM, 2 µl de BSA 0,1% (p/v), 4 µl de lisado bacteriano y 17 µl de agua ultrapura. El programa de amplificación consistió en: un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C y 90 segundos a 72°C y un ciclo de elongación final de 7 minutos a 72°C (Taulé et al. 2012; Mareque et al. 2015; de los Santos et al. 2016). Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción sin lisado bacteriano. El correcto tamaño de los amplicones obtenidos se corroboró por electroforesis en gel de agarosa 0,9% (p/v) en buffer TAE. Para su visualización, se utilizó el agente intercalante Goodview (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.) en una proporción de 1 µl cada 50 µl de agarosa, utilizando como referencia el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus (Thermo Scientific). El gel se corrió a 90V y se visualizó en transiluminador UV.

1.2.3 Secuenciación de los amplicones del gen ARNr 16S e identificación de la secuencia

Los productos de amplificación se enviaron a Macrogen Inc. Korea para su purificación y secuenciación utilizando el cebador 1492R. Finalmente las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Tool (BLAST).

1.3 Estudio de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de cepas seleccionadas de la colección.

1.3.1 Evaluación de la respuesta de los cultivos, a la inoculación con bacterias nativas, en condiciones in vitro

Se seleccionaron cepas bacterianas según sus características PCV *in vitro* y su identidad a nivel de género, las cuales fueron inoculadas a plántulas de sorgo de los cultivares ADV 2010 y ACA727.

Para esto, en primera instancia, semillas del cultivo a ensayar se desinfectaron en su superficie siguiendo los protocolos descritos en la tabla 1. El control de desinfección se realizó pasando la superficie de dos semillas por una placa de Petri con medio TSA, la cual fue incubada por 48h a 30°C. Las semillas tratadas, se incubaron en placas con agar 0,8%, a 30°C hasta su germinación. Posteriormente las plántulas se transfirieron a tubos conteniendo 15 ml de medio de cultivo Jensen (Vincent 1970), con bolas de polipropileno estéril como soporte. Cada plántula se inoculó con 100 µl de una suspensión bacteriana conteniendo 10^7 células de la cepa bacteriana a estudiar en NaCl 0,9% (p/v). El inóculo primario provino de cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche a 30°C en medio líquido TSB. Como control negativo se incluyeron plantas con 100 µl de NaCl 0,9% (p/v), y como control positivo para el caso en el cual se evaluaron cepas diazótrofes, plantas fertilizadas con KNO_3 a una concentración final en el tubo de 0,05% (p/v). Asimismo, se incluyó un tratamiento con la cepa *Azospirillum brasilense* sp7, reportada en la bibliografía como promotora del cultivo a ensayar (cepa de referencia) (Sarig et al. 1990), o la cepa *Pantoea* sp. UYSB45, reportada como PCV del cultivar M81E (Mareque et al. 2015). Las plantas se mantuvieron en cuarto de plantas a 26°C con un fotoperíodo 16/8 horas de luz/ oscuridad (Mareque et al. 2015). Se emplearon 10 réplicas por cada tratamiento, al mes de inoculadas, las plantas fueron cosechadas, midiéndose su altura, y peso seco total. Para esto último, las mismas se secaron en una estufa a 60°C hasta alcanzar un peso constante, y posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Shimadzu AUX 220).

El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa Infostat versión 2017. De existir diferencias significativas entre los tratamientos, se compararon las medias aplicando el test de Fisher en caso de obtener datos paramétricos o el test de Kruskal- Wallis en caso de obtener datos no paramétricos.

Tabla 1. Protocolo de desinfección de la superficie de las semillas a estudiar

Cultivo	Etanol	Hipoclorito	Referencia
Sorgo	70% (v/v) 5 min	4% (v/v) 15 min	(Mareque et al. 2015)
Maíz	70% (v/v) 5 min	5% (v/v) 5 min	(Beracochea 2011)

1.3.2 Evaluación de la respuesta de los cultivos a la inoculación con bacterias nativas, en condiciones de invernáculo

Las cepas que promovieron el crecimiento de las plantas en alguno de los parámetros medidos, se seleccionaron para realizar ensayos de inoculación de plantas en condiciones de invernáculo.

En primera instancia las semillas de sorgo y maíz se esterilizaron y germinaron como fue descrito anteriormente (Tabla 1). Posteriormente las plántulas se sembraron en macetas de 1,5 kg conteniendo como sustrato tierra no estéril y arena estéril (relación 1:1). Al comienzo del ensayo se sembraron 10 semillas por maceta y luego de su germinación se ralearon dejando una por maceta. Una semana después, las plántulas se inocularon en la base del tallo con 1×10^7 células/plántula, de cada cepa bacteriana seleccionada, realizando una re-inoculación luego de un mes.

Como control negativo se utilizó un tratamiento no inoculado, ni fertilizado; mientras que como control positivo, se empleó un tratamiento sin inoculación bacteriana al que se le adicionó una solución de urea equivalente a 150 kg N/ha. El diseño experimental fue al azar, con 10 réplicas biológicas por tratamiento. Las plantas se mantuvieron por un mes en cuarto de plantas a una temperatura de 26°C con un fotoperíodo de 16/8h luz/oscuridad, trasladándose al invernáculo con el mismo fotoperíodo luego de la segunda inoculación.

Para el ensayo en plantas de maíz se incluyeron cepas que mostraron ser PCV de sorgo dulce cv. ADV 2010 en condiciones *in vitro* y las cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Rhizobium* sp. UYSO24, reportadas previamente como PCV de plantas de maíz en ensayos *in vitro* (Anexo 1) (Lanza 2018).

Los ensayos se cosecharon a los 4 meses y se midieron las variables biométricas altura de la planta y diámetro del tallo, así como peso seco de la parte aérea y radicular. El conjunto de datos fue analizado estadísticamente mediante el test de ANAVA, utilizando el programa Infostat versión 2017 como se describió previamente (punto 1.3.1).

Los tratamientos donde se observó alguna cepa PCV, se repitieron en un segundo ensayo para confirmar los efectos observados.

RESULTADOS

1- Selección e identificación de cepas de la colección para su evaluación como inoculantes

Se partió de una colección de 291 cepas bacterianas asociadas a los tejidos internos de plantas de sorgo dulce del cultivar M81E, la cual fue caracterizada *in vitro* en búsqueda de características de PCV (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021). A partir de la misma se seleccionó un conjunto de cepas basado en sus características PCV y posibles mecanismos de infección priorizando seleccionar bacterias diazótrofes en función de la presencia del gen *nifH*. Todas las cepas seleccionadas poseen al menos un mecanismo PCV (Anexo1). En primera instancia se identificaron mediante secuenciación del gen ARNr 16S, 30 cepas a nivel de género. Luego, para evaluar su posible efecto PCV en plantas de sorgo de los cultivares ADV 2010 y/o ACA 727 en condiciones *in vitro* se seleccionaron 62 cepas (11 fueron identificadas en este trabajo y 51 ya estaban identificadas previamente) (Anexo 1) (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021). Las cepas que promovieron el crecimiento de sorgo de los cultivares ADV 2010 y/o ACA 727 en condiciones *in vitro* fueron seleccionadas para ensayos en condiciones de invernáculo en dichos cultivos y en maíz del cultivar NT 426.

1.1 Identificación de cepas seleccionadas mediante secuenciación del gen ARNr 16S

Con el objetivo de conocer la diversidad de géneros presentes y seleccionar un grupo de cepas para realizar estudios posteriores, se realizó la amplificación por PCR, secuenciación de un fragmento de aproximadamente 1500 pb del gen codificante para la subunidad 16S del ARNr e identificación a nivel de género por comparación con la base de datos.

Se seleccionaron 30 cepas sin identificar aún, a las cuales se le pudo asignar la identidad a nivel de género (tabla 2).

Tabla 2. Similitud de secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S con mayor homología con las cepas de la colección

Cepa	Secuencia con mayor homología	Nro. acceso NCBI *	Cobertura (%)	e-value	Id máx (%)
UYSB10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JYW51	MN173478.1	100	0.0	99,7
UYSB14	<i>Ralstonia</i> sp. UYSB01	KJ532081.1	100	0.0	99,7
UYSB16	<i>Bacillus niacini</i> strain CD17	MK618616.1	100	0.0	99,2
UYSB30	<i>Pantoea ananatis</i> strain RB200	MG574390.1	99	0.0	99,7
UYSB31	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> JCM 13963	LC507991.1	100	0.0	100
UYSB39	<i>Pantoea dispersa</i> strain LMG 2603	NR_116755.1	98	0.0	99,2
UYSB54	<i>Cellulomonas</i> sp. strain K2NRKBY004	MK106264.1	100	0.0	100
UYSB60	<i>Staphylococcus condimentii</i> strain F-2	LR134360.1	100	0.0	100
UYSB62	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain DCo1	MK560013.1	100	0.0	100
UYSB64	<i>Cellulomonas</i> sp. strain K2NRKBY004	MK106264.1	100	0.0	100
UYSB66	<i>Citrobacter</i> sp. strain TC164	MK459532.1	100	0.0	100
UYSB67	<i>Kluyvera</i> sp. strain PYRL4	MF458863.1	100	0.0	100
UYSB70	<i>Enterobacter</i> sp. strain hlb08	MK612130.1	100	0.0	100
UYSB71	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 4/1-2	CP023839.1	100	0.0	100
UYSB74	<i>Enterobacter</i> sp. strain hlb08	MK612130.1	100	0.0	100
UYSB75	<i>Enterobacter</i> sp. strain hlb08	MK612130.1	100	0.0	99.8
UYSB77	<i>Enterobacter</i> sp. strain hlb08	MK612130.1	100	0.0	100
UYSB79	<i>Enterobacter</i> sp. strain hlb08	MK612130.1	100	0.0	100
UYSB85	<i>Enterobacter</i> sp. strain ERR 604	MF442346.1	100	0.0	100
UYSB86	<i>Kosakonia oryzae</i> strain ZL01	MG214500.1	100	0.0	100
UYSB87	<i>Kosakonia oryzae</i> strain ZL01	MG214500.1	100	0.0	100

UYSB88	<i>Enterobacter</i> sp. strain PB-1121-E	MK208589.1	100	0.0	100
UYSB91	<i>Enterobacter</i> sp. strain hlb08	MK612130.1	100	0.0	100
UYSB92	<i>Kosakonia oryzae</i> strain MML5308	MF687459.1	100	0.0	99.9
UYSB93	<i>Acinetobacter ursingii</i> M3	AP018824.1	100	0.0	99,5
UYSB97	<i>Kosakonia oryzae</i>	MF109030.1	100	0.0	100
UYSB98	<i>Klebsiella quasivariicola</i> strain HBUAS53417	MK402204.1	100	0.0	100
UYSB100	<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656	CP018016.1	100	0.0	99.9
UYSB151	<i>Pantoea</i> sp. strain MSZFNJa	MK578283.1	100	0.0	99,8
UYSB152	<i>Pantoea stewartii</i> strain JZ29	KY194238.1	100	0.0	100

*Número de acceso en la base de datos del NCBI de la secuencia con mayor homología

Dentro de las 30 cepas seleccionadas se identificaron 8 cepas del género *Enterobacter*, 5 del género *Kosakonia*, 4 del género *Pantoea* y 2 del género *Cellulomonas*. También se identificaron cepas pertenecientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, y *Acinetobacter* (tabla 2).

A su vez, se identificaron cepas pertenecientes a géneros reportados como patógenos humanos, entre ellas las cepas UYSB60 y UYSB62 pertenecientes al género *Staphylococcus* y las cepas UYSB98 y UYSB71 del género *Klebsiella*. Las mismas no fueron seleccionadas para los futuros ensayos (tabla 2).

2- Evaluación de la respuesta de plantas de sorgo a la inoculación bacteriana en condiciones *in vitro*

Con el fin de evaluar la capacidad PCV de cepas seleccionadas de la colección, se realizaron ensayos de respuestas a la inoculación en plantas de sorgo cv. ADV 2010 y cv. ACA 727 en condiciones *in vitro*. Las cepas fueron seleccionadas según la presencia de al menos una característica PCV y su identidad a nivel de género, buscando incluir una amplia diversidad (Anexo 1). Para esto se realizaron seis ensayos independientes donde se incluyeron las cepas en tandas, con el cv. ADV2010 y dos ensayos con el cv. ACA727, evaluándose un total de 62 cepas. En primera instancia se evaluaron 58 cepas en sorgo dulce del cultivar ADV 2010. Luego se evaluó en el cultivar de sorgo granífero ACA 727 5 cepas que promovieron el crecimiento del cultivar ADV 2010 identificadas en este trabajo y 4 cepas PCV del cultivar ADV 2010 identificadas anteriormente (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021) (Anexo 1).

En los seis ensayos independientes realizados en plantas de sorgo dulce cv. ADV 2010, el control positivo se diferenció significativamente del control negativo. Sin embargo, solo en un ensayo se identificaron 5 cepas que promovieron el crecimiento de plantas en las condiciones evaluadas (Fig 4 y Anexo 2). En ese sentido se identificaron a las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12, *Paenibacillus* sp. UYSB19, *Agrobacterium* sp. UYSB23, *Pseudomonas* sp. UYSB32 y *Stenotrophomonas* sp. UYSB33 como PCV en los parámetros peso seco y altura excepto la cepa *Pseudomonas* sp. UYSB32 que promovió el crecimiento únicamente en el peso seco (Fig. 4). En estos ensayos se evaluaron también tratamientos donde se inocularon cepas reportadas previamente como PCV de plantas de sorgo dulce tales como *Azospirillum brasilense* sp7 y *Pantoea* sp. UYSB45 (Anexo 1). Los resultados mostraron que en ninguno de los ensayos realizados, las cepas utilizadas como referencia promovieron el crecimiento en las condiciones ensayadas.

Por otra parte, al evaluarse el efecto de la inoculación bacteriana en plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 en las mismas condiciones, se observaron diferencias significativas entre los controles, pero no se observaron diferencias entre el control negativo y la cepa de referencia (Fig. 5). En este caso los resultados mostraron que las cepas *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Kosakonia* sp. UYSB89 fueron PCV en el parámetro altura (Fig. 5). En un segundo ensayo que solo incluyó la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13, se confirmaron los resultados para dicha cepa. La cepa *Kosakonia* sp. UYSB89 no fue ensayada para confirmar su resultado (Fig. 6).

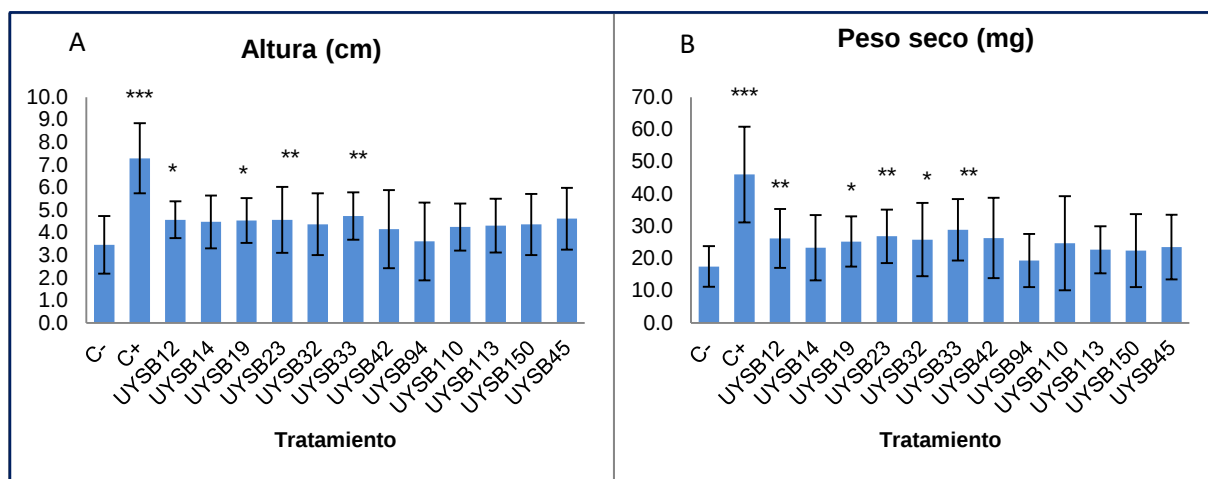


Fig. 4. Evaluación de la respuesta de plantas de sorgo dulce cv. ADV 2010 a la inoculación bacteriana en condiciones *in vitro*. Se muestran los resultados del único ensayo donde se identificaron cepas PCV. C+: control positivo. C-: control negativo. UYSB45: cepa de referencia *Pantoea* sp. UYSB45. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor<0,01. **: p-valor< 0,05 *: p-valor<0,1 (Test de Kruskal Wallis).

A- Altura del tallo. B- Peso seco total.

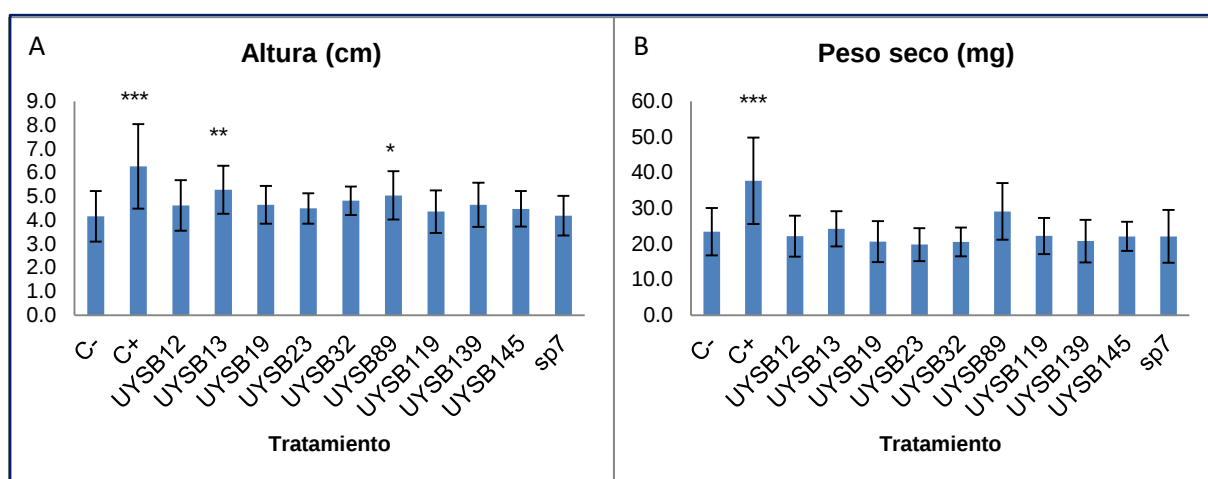


Fig. 5. Primer ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones *in vitro*. C+: control positivo. C-: control negativo. sp7: cepa de referencia *Azospirillum brasilense* sp7. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor<0,01. **: p-valor< 0,05 *: p-valor<0,1 Variables transformadas como log(altura) y Ln(peso seco). A- Altura del tallo.

B- Peso seco total.

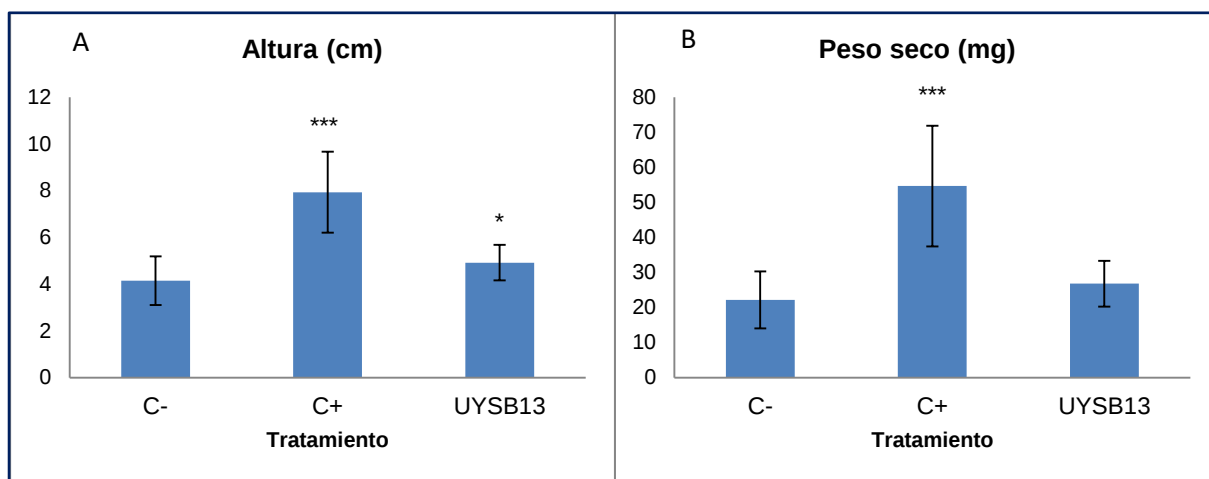


Fig. 6. Segundo ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones *in vitro*. C+: control positivo. C-: control negativo. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor<0,01. **: p-valor< 0,05 *: p-valor<0,1. A- Altura del tallo. B- Peso seco total.

3- Evaluación de la respuesta de cultivos de interés agronómico a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo

Para esto se realizaron ensayos de PCV en condiciones de invernáculo con plantas de sorgo dulce cv. ADV 2010, sorgo granífero cv. ACA 727 y maíz cv. NT 426. Los tratamientos inoculados fueron las cepas seleccionadas por promover el crecimiento de sorgo dulce en condiciones *in vitro* (sección 2). Los resultados obtenidos en estos ensayos, así como la caracterización de las cepas ensayadas, se resumen en la tabla Anexo 1.

3.1. Evaluación de la respuesta de plantas de sorgo dulce cv. ADV 2010 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo

En estas condiciones, los tratamientos control positivo y control negativo, mostraron diferencias significativas, en las variables biométricas peso seco aéreo y radicular. Ninguna de las cepas ensayadas: *Rhizobium* sp. UYSB12, *Paenibacillus* sp. UYSB19, *Agrobacterium* sp. UYSB23, *Pseudomonas* sp. UYSB32 y *Stenotrophomonas* sp. UYSB33, promovió el crecimiento de la planta en las variables biométricas evaluadas (Anexo 3).

3.2. Evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo

En este caso, se realizaron dos ensayos independientes. En el primer ensayo, los resultados mostraron que la inoculación con las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Rhizobium* sp. UYSB13 aumentó significativamente el peso seco radicular de las plantas con respecto al control negativo ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente) (Fig. 7). En este ensayo el control negativo no se diferenció del positivo ni de la cepa de referencia *Azospirillum brasilense* sp7.

En el segundo ensayo, se evaluaron únicamente las cepas UYSB12 y UYSB13 que fueron PCV en el primer ensayo (Fig. 7). En este caso se obtuvieron diferencias significativas en la altura de las plantas ($p < 0,01$ y $p < 0,05$), en los tratamientos inoculados con las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Rhizobium* sp. UYSB13 respectivamente y el control positivo no se diferenció del control negativo (Fig. 8).

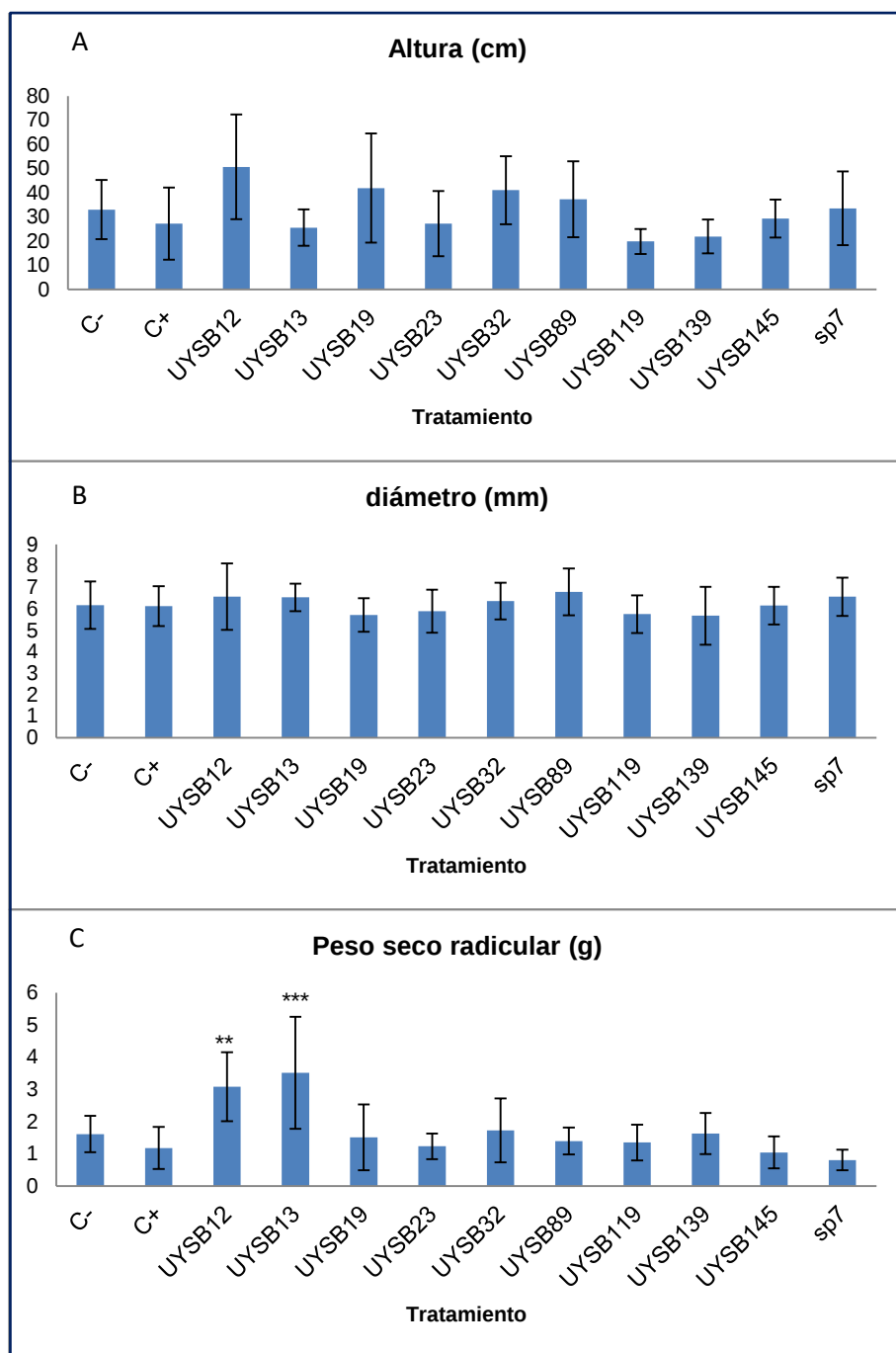


Fig. 7. Primer ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo. Se muestran solo las variables en donde se obtuvieron diferencias significativas. C+: control positivo. C-: control negativo. sp7: cepa de referencia *Azospirillum brasilense* sp7. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor <0,01; **: p-valor < 0,05; *: p-valor <0,1. A- Altura de las plantas. B- Diámetro del tallo. C- Peso seco radicular. El peso seco aéreo no se muestra por no presentar diferencias significativas entre los tratamientos.

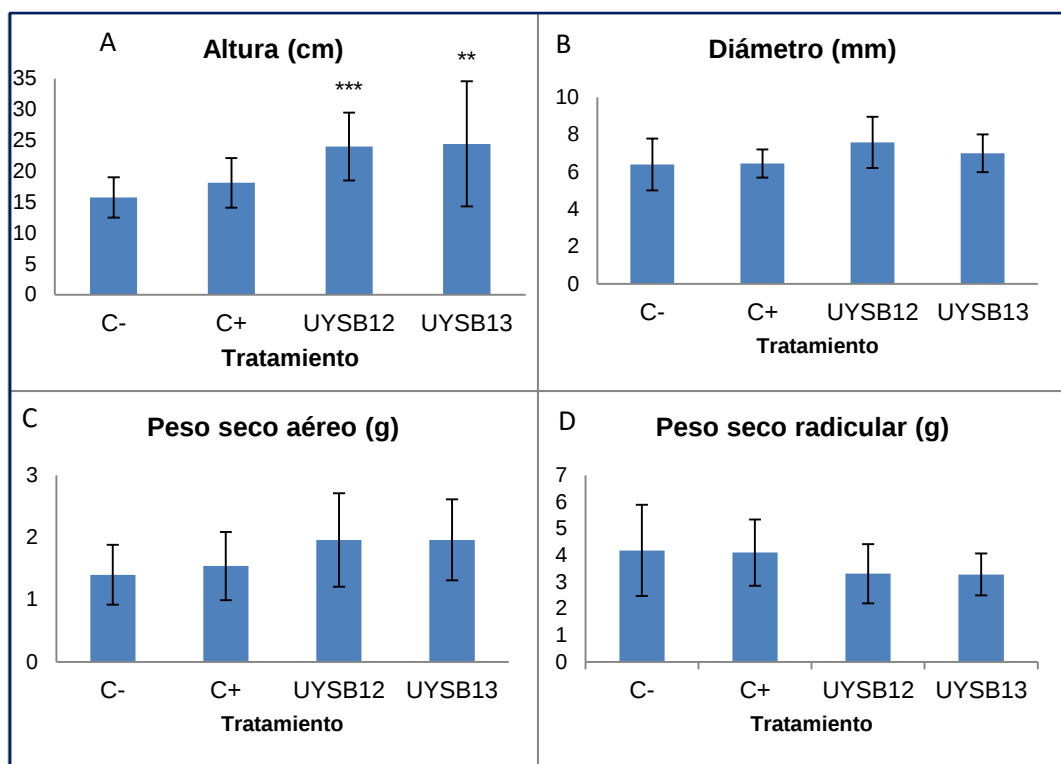


Fig. 8. Segundo ensayo de evaluación de la respuesta de plantas de sorgo granífero cv. ACA 727 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo. C+: control positivo. C-: control negativo. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor <0,01; **: p-valor < 0,05; *: p-valor <0,1. A- Altura del tallo. B- diámetro del tallo. C- Peso seco aéreo. D- Peso seco radicular.

3.3 Evaluación de la respuesta de plantas de maíz cv. NT 426, a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo.

El análisis de los resultados mostró que el control positivo se diferenció del negativo en las variables peso seco aéreo, radicular y diámetro del tallo (Fig. 9). En cuanto a los tratamientos evaluados, se observó que la cepa *Paenibacillus* sp. UYSB19 fue PCV en el diámetro ($p=0,03$), peso seco radicular ($p < 0,05$) y aéreo ($p < 0,01$). Por su parte la cepa *Pseudomonas* sp. UYSB32 fue PCV en la variable peso seco aéreo ($p < 0,1$), mientras que las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 fueron PCV en el diámetro del tallo ($p < 0,1$) (Figs. 10 y 11). La variable altura no fue informativa en este caso ya que no se observó un efecto de PCV en el control positivo, ni en ninguna de las cepas inoculadas.

En el segundo ensayo, se evaluaron las cepas que promovieron el crecimiento en el primer ensayo. En este caso solamente se pudo confirmar el efecto PCV por parte de la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 (Fig. 11).

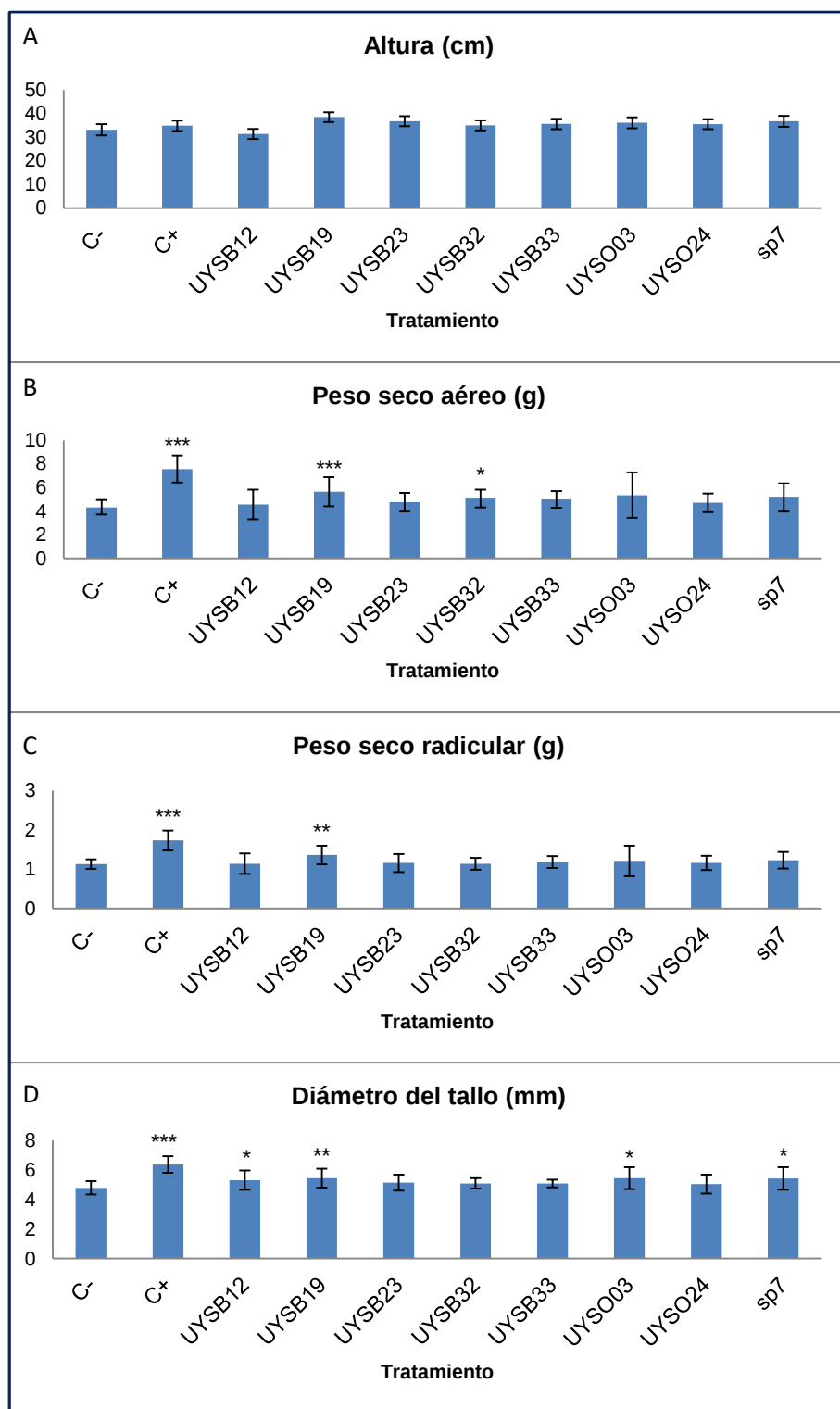


Fig. 9. Primer ensayo de respuesta de plantas de maíz cv. NT426 a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo (primer ensayo). C+: control positivo. C-: control negativo. sp7: cepa de referencia *Azospirillum brasilense* sp7. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor <0,01. **: p-valor < 0,05 *: p-valor <0,1. A- Altura del tallo. B- diámetro del tallo. C- Peso seco aéreo. D- Peso seco radicular.

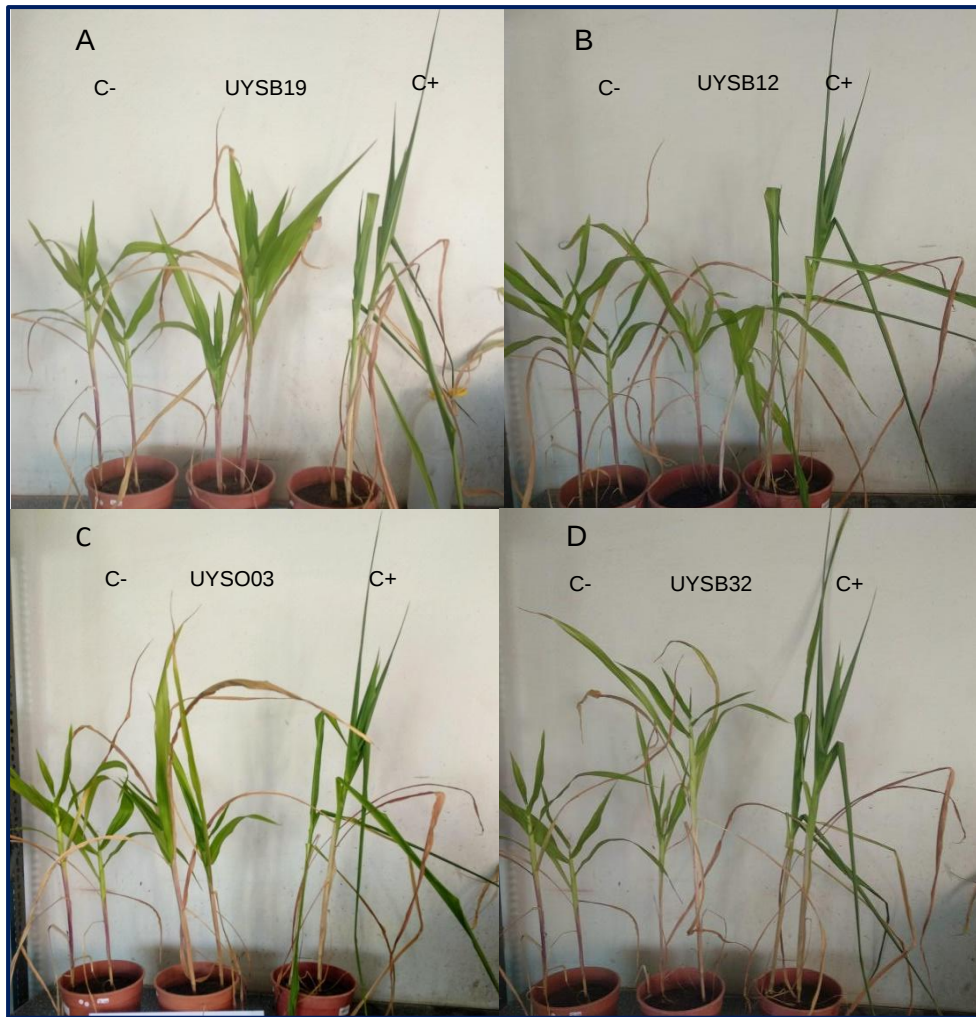


Fig. 10. Visualización de las plantas de maíz a los 4 meses post inoculación en condiciones de invernáculo. Plantas inoculadas con A: *Paenibacillus* sp.UYSB19, B: *Rhizobium* sp.UYSB12, C: *Acinetobacter* sp.UYSO03 y D: *Pseudomonas* sp. UYSB32. En todas las imágenes se muestran los tratamientos control: C+: control positivo. C-: control negativo.

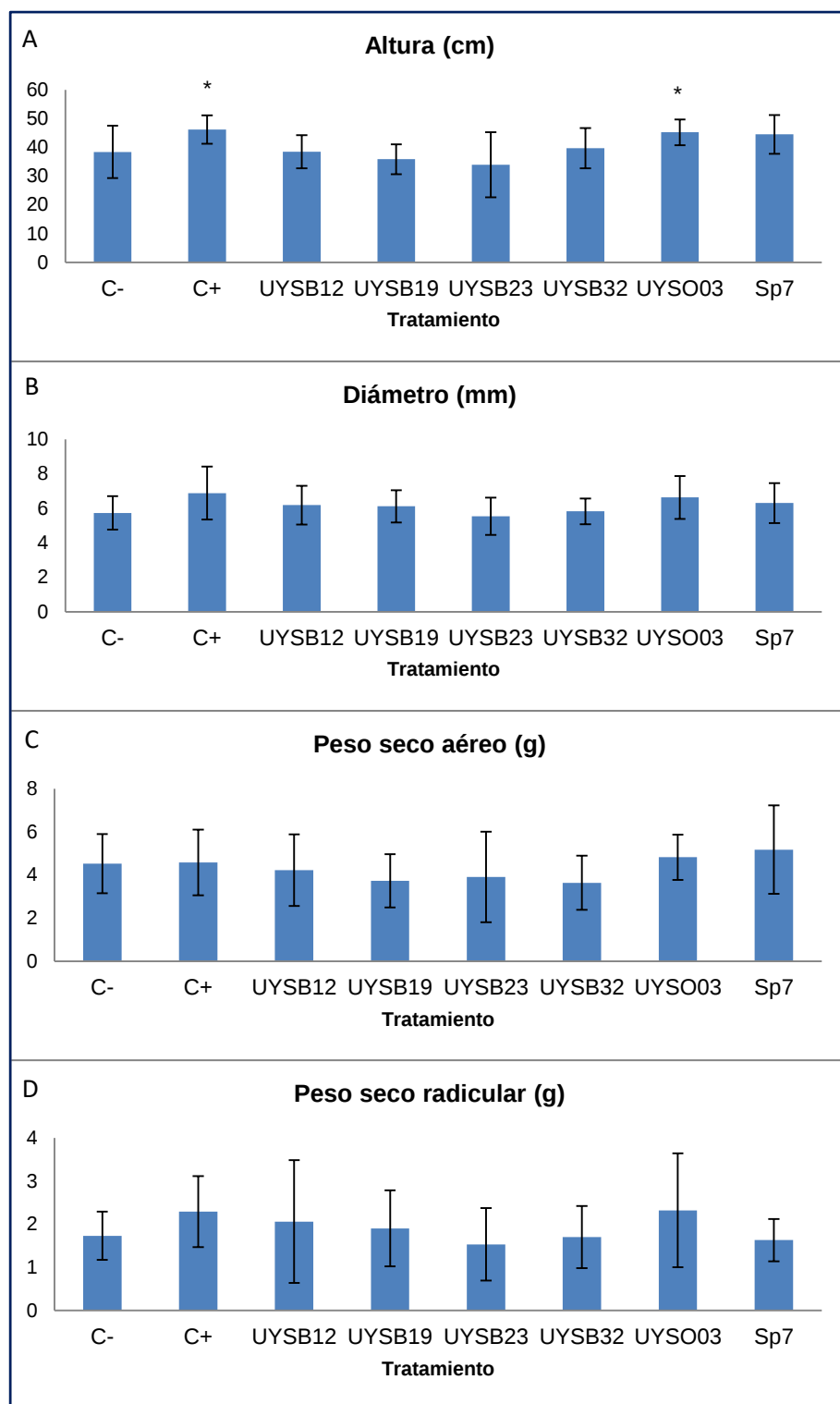


Fig. 11. Segundo ensayo de respuesta de plantas de maíz cv. NT 426, a la inoculación bacteriana en condiciones de invernáculo. C+: control positivo. C-: control negativo. sp7: cepa de referencia *Azospirillum brasilense* sp7. ***: Diferencias significativas con respecto al C- con un p-valor <0,01. **: p-valor < 0,05 *: p-valor <0,1. A- Altura del tallo. B- diámetro del tallo. C- Peso seco aéreo. D- Peso seco radicular.

CAPÍTULO 2. Evaluación del efecto de la inoculación con la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13, sobre la microbiota endofítica asociada a plantas de sorgo granífero cv. ACA 727

ESTRATEGIA

En este capítulo se estudió la respuesta de la microbiota endofítica bacteriana de raíces y parte aérea de plantas de sorgo granífero, al ser inoculadas con una cepa la PCV *Rhizobium* sp. UYSB13. Asimismo se estudió la microbiota presente en las semillas para conocer aquellos endófitos bacterianos que ya estaban presentes desde su germinación. Para esto, se utilizó la aproximación de secuenciación masiva del gen *ARNr 16S*. Esta aproximación implicó como pasos metodológicos la extracción del ADN total de los tejidos vegetales en estudio, la amplificación por PCR de una región del gen *ARNr 16S*, la secuenciación masiva del producto de PCR y el análisis bioinformático de los datos. El análisis se enfocó en estudiar la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas y evaluar la presencia del inóculo en los tratamientos inoculados.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

Semillas de sorgo granífero cv. ACA 727 se desinfectaron en su superficie, germinaron, traspasaron a tubo, se inocularon con la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 y se incubaron durante un mes como se describió en el punto 1.3.1. Los tratamientos evaluados fueron: raíces y parte aérea de plantas sin inocular y de plantas inoculadas. También se incluyó el análisis de secuenciación de los endófitos presentes en la semilla. Se utilizaron tres réplicas de cada condición (control e inoculadas), las cuales incluyeron un *pool* de 12 plantas.

Al momento de la cosecha, las plantas fueron cortadas con bisturí estéril para separar las raíces de la parte aérea y luego desinfectadas en su superficie al igual que las semillas (punto 1.3.1). Se homogeneizó en un mortero estéril aproximadamente 1g de material vegetal (raíces, tejido aéreo o semillas) por cada una de las muestras y se realizó la extracción de ADN a partir del macerado.

2.2 Extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S

A cada muestra se le realizó una extracción de ADN total utilizando el kit comercial PowerSoil DNA Isolation kit (Mobo). El ADN se cuantificó por nanodrop y su calidad se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa como se describió en el punto 1.2.2.

A continuación se amplificó la región hipervariable V4 del gen *ARNr 16S* de cada muestra de ADN extraído, utilizando los cebadores 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'), y 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') (Claesson et al. 2009). Al cebador 520F se le adicionó en el extremo 5', un código de barras característico para cada muestra amplificada seguido de la secuencia adaptadora para realizar las reacciones de secuenciación en la plataforma Ion Torrent del IIBCE. Se incluyó en la reacción de PCR oligonucleótidos bloqueadores de la amplificación del ADN mitocondrial y de cloroplastos. Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos bloqueadores: I- para el ADN mitocondrial (5'-AAACCAATTCACCTGAGT-3') (Abdullaeva et al. 2020) y II- para ADN de cloroplastos (5'-GGCTCAACCCTGGACAG-3') (Vergine et al. 2020), ambos modificados con un espaciador C3 en el extremo 3' de las secuencias para inhibir la elongación de las secuencias provenientes de los organelos. Previamente, utilizando el programa Multiple Primer Analyzer de Thermo Fisher Scientific se corroboró que no se formaran dímeros entre los cebadores y los bloqueadores. También se corroboró el correcto bloqueo de las secuencias de los bloqueadores. Para esto utilizando la secuencia de ADN mitocondrial y de cloroplastos de sorgo de la base de datos del NCBI, se evaluó la ubicación de las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados para amplificar el gen *ARNr 16S* y de los bloqueadores correspondientes. A partir de este análisis se confirmó que los bloqueadores se encuentran en una región comprendida entre la amplificada por los cebadores.

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl conteniendo 12,5 µl de Ranger Mix 2x (Bioline), 0,5 µl de cada cebador 10 µM, 4 µl de cada bloqueador 10 µM, 50 ng de ADN y agua ultrapura csp 25 µl (Lavergne et al. 2019; Vergine et al. 2020).

El programa de amplificación consistió en 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, 30 segundos a 55°C, y 90 segundos a 72°C seguido por 10 minutos a 72°C (Lavergne et al. 2019; Vergine et al. 2020).

La integridad de los amplicones se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1,8% (p/v) en buffer TAE como se describió en el punto 1.2.2. El gel se corrió por 3 h a 65 V y se visualizó en un transiluminador UV. El tamaño del amplicón se confirmó mediante su comparación con el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus (Thermo Scientific). Una vez visualizada la banda de aproximadamente 300 pb, se cortó el gel para su extracción con el kit Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) (Lavergne et al. 2019). La preparación de las librerías y la secuenciación de los amplicones fue realizada por la Plataforma de Secuenciación del IIBCE con el kit NEB #E6270L Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent, NEBNext utilizando el sistema Ion Torrent Personal Genome Machine (Milani et al. 2013) de la Plataforma Genómica del IIBCE.

2.3 Análisis bioinformático

Los datos de cada muestra, contenidos en un archivo FASTQ se analizaron con el programa QIIME2 (Caporaso et al. 2010). En primer lugar con el *plugin* Cutadapt se clasificaron las secuencias correspondientes a cada muestra a través de su código de barras característico (Martin 2011). Luego con el algoritmo “Dada2 denoise-single”, se generaron las Variantes de secuencia de amplicón (ASVs por su sigla en inglés) y se eliminaron las quimeras. Con el objetivo de tener secuencias de largo uniforme y buena calidad (mínima de 25, en la escala de calidad Phred), se utilizaron los parámetros de corte de las secuencias p-trim-left de 15 (se eliminaron las 15 bases hacia el extremo 5´) y p-trunc-len de 220 (se eliminaron las bases hacia el extremo 3´ de la base número 220) obteniendo lecturas de 205 pb. En este paso se obtuvieron por un lado la tabla con las secuencias representativas de cada ASV (tabla de secuencias) y por otro, la tabla de ASVs con la abundancia relativa en cada muestra (tabla de ASVs).

Posteriormente, se realizó la asignación taxonómica utilizando la base de datos entrenada Silva 138.1 (Quast et al. 2012) empleando el método Naive Bayes. Con el algoritmo “feature-classifier” utilizando la tabla de secuencias, se obtuvo una tabla con la asignación taxonómica de cada secuencia representativa (tabla de asignación taxonómica). Luego se removieron de las tablas de ASVs y de secuencias, aquellas correspondientes a mitocondrias y cloroplastos. Para esto se utilizaron las herramientas de filtro “qiime taxa filter-table” y “qiime taxa filter-seqs” respectivamente excluyendo las palabras “mitochondria” y “chloroplast” a partir de la tabla de asignación taxonómica generada previamente y la tabla de ASVs o de la tabla de secuencias, obteniendo en este paso la tabla de ASVs filtrada y la tabla de secuencias filtrada.

2.3.1 Curvas de rarefacción

Con el objetivo de controlar el error asociado a tener muestras con diferente número de lecturas, se construyeron las curvas de rarefacción graficando diversidad vs profundidad de secuenciación. Para ello se seleccionó la muestra con menor número de lecturas (442 lecturas), la cual fue definida como la profundidad del muestreo. Con esta aproximación se asume que una mayor profundidad de secuenciación no aportará información adicional a la diversidad de las muestras y poder normalizar las muestras a un mismo número de lecturas (Zaheer et al. 2018).

Para determinar la diversidad de cada muestra, se realizó la construcción de un árbol filogenético con las secuencias de las ASVs. Para esto, con el algoritmo MAFFT se comenzó por generar un alineamiento múltiple de la totalidad de las secuencias representativas de las ASVs filtradas y luego se realizó el enmascaramiento de las regiones poco informativas con el algoritmo MASK. Las secuencias alineadas y enmascaradas se utilizaron para crear un árbol filogenético sin raíz con el

algoritmo FASTREE. A continuación, se calculó la raíz de dicho árbol con el algoritmo midpoint-root. Finalmente con el algoritmo “diversity alpha-rarefaction” y utilizando la tabla de ASVs filtrada (sin las ASVs que se asignaron a los organelos vegetales) y el árbol filogenético con raíz generado en el paso anterior, se crearon las curvas de rarefacción definiendo una profundidad (p-max-depth) de 442 lecturas. Luego se visualizó el gráfico y se corroboró que todas las muestras alcanzaron la asíntota en la diversidad a 442 lecturas. Con dicha información se calcularon las abundancias normalizadas de cada muestra (tabla de ASVs normalizada).

2.3.2 Análisis de las comunidades bacterianas

Utilizando la tabla de ASVs normalizada y analizada en los niveles taxonómicos: filo, familia y género, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCA por su sigla en inglés) y se estudiaron los índices de diversidad de Shannon y la riqueza, con el programa Past versión 4.04 (Hammer et al. 2001). Seguidamente se evaluó si existían diferencias en las abundancias de los distintos taxa. Para ello se aplicó un análisis de varianzas al número de lecturas normalizadas de cada taxón identificado en cada tratamiento y de existir diferencias significativas las abundancias se compararon con el test de Kruskal- Wallis utilizando el programa Infostat versión 2017.

2.3.3 Estudio del género *Rhizobium*

Se buscó conocer si en las muestras de raíces y parte aérea se identificaba la bacteria inoculada *Rhizobium* sp. UYSB13, así como también si en las semillas ya se encontraba presente dicha cepa. Para esto, se seleccionaron del set de datos, las ASVs asociadas al género *Rhizobium* o *Agrobacterium* (género que se ha decidido reclasificar como *Rhizobium* para varias de sus especies). Para ello se filtró la tabla de asignación taxonómica de cada ASV por las palabras clave “Rhizo” y “Agrob” y se seleccionaron aquellas ASVs que fueran clasificadas idealmente a nivel de género como *Rhizobium* o como *Agrobacterium*. También se incluyeron ASVs de la familia *Rhizobiaceae* o del orden *Rhizobiales* cuya identificación no alcanzó el nivel de género. A continuación, utilizando la herramienta que permite alinear dos o más secuencias en la base de datos del NCBI, se analizó la cobertura e identidad entre las ASVs seleccionadas y la secuencia del gen *ARNr 16S* de la cepa inoculada.

Por otra parte, se realizó un árbol filogenético de las secuencias de las ASVs seleccionadas y las cepas tipo más emparentadas. Para esto, las ASVs fueron alineadas contra las secuencias de la base de datos EZBcloud (Yoon et al. 2017), seleccionándose las secuencias de *ARNr 16S* de las cepas tipo que compartían un porcentaje de identidad mayor o igual a 98,65% con las ASVs seleccionadas. Las secuencias se alinearon con el algoritmo Clustal W y a partir de su alineación se generó el árbol filogenético utilizando el programa MEGA versión 11 (Kumar et al. 2016). Para

crear la filogenia se usó el algoritmo máxima verosimilitud y el modelo Kimura 2 parámetros con delección pareada al 95% y un valor de bootstrap de 1000. Como grupo externo, se incluyó la secuencia de ARNr 16S de la cepa tipo *Streptomyces albus* NBRC 13014.

RESULTADOS

1- Estudio de la microbiota endofítica asociada a plantas de sorgo y su variación frente a la inoculación con la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13

El efecto de la inoculación con la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 sobre la microbiota endofítica asociada a las raíces y partes aéreas de plantas de sorgo cv. ACA 727, fue evaluado mediante el análisis de las comunidades bacterianas a partir de la secuenciación masiva del gen *ARNr 16S*. Para esto se montó un ensayo donde plantas fueron inoculadas y crecidas durante un mes, momento en que fueron cosechadas, extrayéndose el ADN total de raíces y tallos de los diferentes tratamientos, así como de semillas. A las mismas se le amplificó 282 pb de la región V4 del gen *ARNr 16S*, secuenciándose los productos obtenidos con la tecnología Ion Torrent. La cantidad de lecturas obtenidas para cada muestra se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de la región V4 del gen *ARNr 16S*, de muestras de semillas, raíces y tallos de plantas de sorgo granífero

Muestra	Órgano	Tratamiento	Nº de secuencias totales	Nº de secuencias no quiméricas	Nº de secuencias bacterianas	% secuencias bacterianas
R1	Raíz	Sin inocular	211761	98016	1022	0,48
R2	Raíz	Sin inocular	275221	234691	1232	0,45
R3	Raíz	Sin inocular	603663	518047	442	0,07
RI1	Raíz	Inoculada	463788	389039	730	0,16
RI2	Raíz	Inoculada	526060	427036	3235	0,61
RI3	Raíz	Inoculada	566366	474368	3243	0,57
A1	Parte aérea	Sin inocular	766350	640760	1933	0,25
A2	Parte aérea	Sin inocular	906267	762496	2065	0,23
A3	Parte aérea	Sin inocular	619593	510049	781	0,13
AI1	Parte aérea	Inoculada	390818	329373	3646	0,93
AI2	Parte aérea	Inoculada	825308	680133	3154	0,38
AI3	Parte aérea	Inoculada	1106266	886326	72359	6,54
S1	Semillas	Sin inocular	1426578	592824	820	0,06
S2	Semillas	Sin inocular	550392	433925	2160	0,39
S3	Semillas	Sin inocular	1181029	955582	2063	0,17

Como se observa en la tabla 3, los porcentajes de lecturas bacterianas obtenidas luego de eliminar las secuencias de mitocondrias y cloroplastos son bajos, sin superar el 1% de las secuencias totales, con excepción de la muestra AI3 de parte aérea de plantas inoculadas para la cual se obtuvo un porcentaje del 6% de las secuencias totales.

Por otra parte, y analizando las curvas de rarefacción se observa que todas las muestras alcanzan una asíntota en la diversidad, con excepción de la muestra AI3 (Fig. 12). Por este motivo la muestra AI3 fue eliminada de los siguientes análisis.

El análisis de PCA, mostró que para todos los niveles estudiados (filó, familia y género), las muestras se agrupan según si fueron inoculadas o no (las semillas se incluyen dentro del grupo de los tratamientos no inoculados), siendo el componente 1 el que explica el 68% de la varianza entre los tratamientos mencionados (Fig. 13, Anexo 4). Asimismo, el análisis por Permanova mostró diferencias significativas en la composición de las comunidades bacterianas según la presencia o la ausencia del inóculo en la planta de la cual provenía el material vegetal ($p=0,001$).

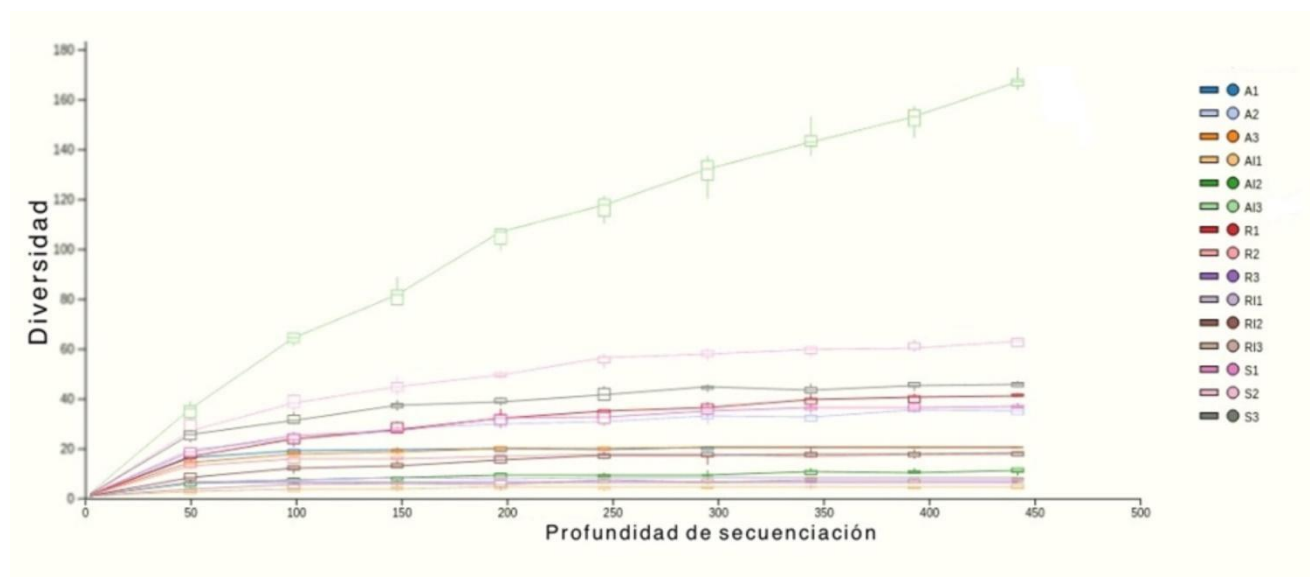


Fig. 12. Curvas de rarefacción.

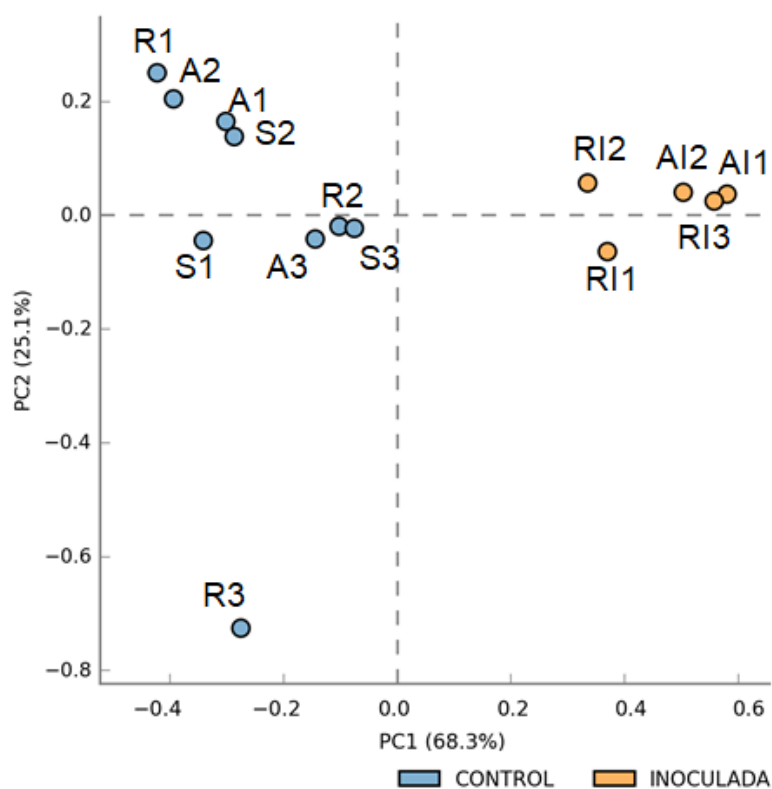


Fig. 13. Análisis de componentes principales de las muestras evaluadas identificadas a nivel de filo. S1, S2, S3: muestras de semilla. R1, R2, R3: muestras de raíz de plantas sin inocular. A1, A2, A3: muestras de tejido aéreo de plantas sin inocular. RI1, RI2, RI3: muestras de raíz de plantas inoculadas. AI1, AI2: muestras de tejido aéreo de plantas inoculadas.

En el total de las muestras analizadas se detectaron 27 filos, observándose una diversidad y riqueza significativamente mayor en muestras de semillas, en comparación con los tratamientos inoculados (Fig. 14). Cabe destacar que ambos parámetros evaluados, fueron significativamente iguales en los tratamientos inoculados y sin inocular.

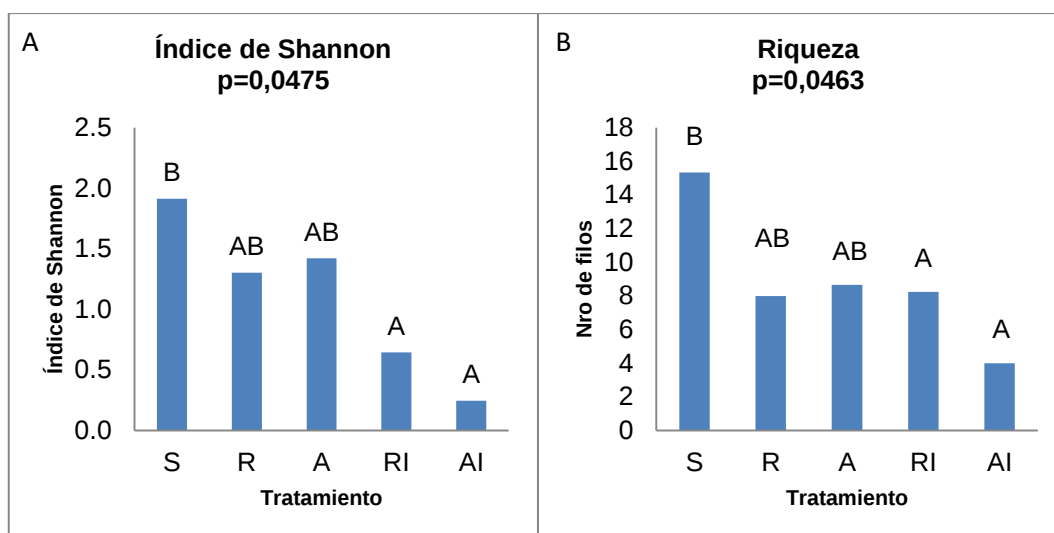


Fig. 14. Índices de diversidad de Shannon (A) y riqueza (B) en los distintos tratamientos. S: semillas. R: raíces de plantas sin inocular. A: tejido aéreo de plantas sin inocular. RI: raíces de plantas inoculadas. AI: tejido aéreo de plantas inoculadas.

En cuanto a la composición de las comunidades bacterianas de los distintos tratamientos se pudo comprobar que el filo *Proteobacteria*, fue significativamente más abundante en las raíces y el tejido aéreo de plantas inoculadas en comparación con los tratamientos no inoculados ($p=0,046$) (Figs. 15A, 16A).

Dentro de las *Proteobacterias* se obtuvieron diferencias significativas en las familias *Rhizobiaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Geminicoccaceae*.

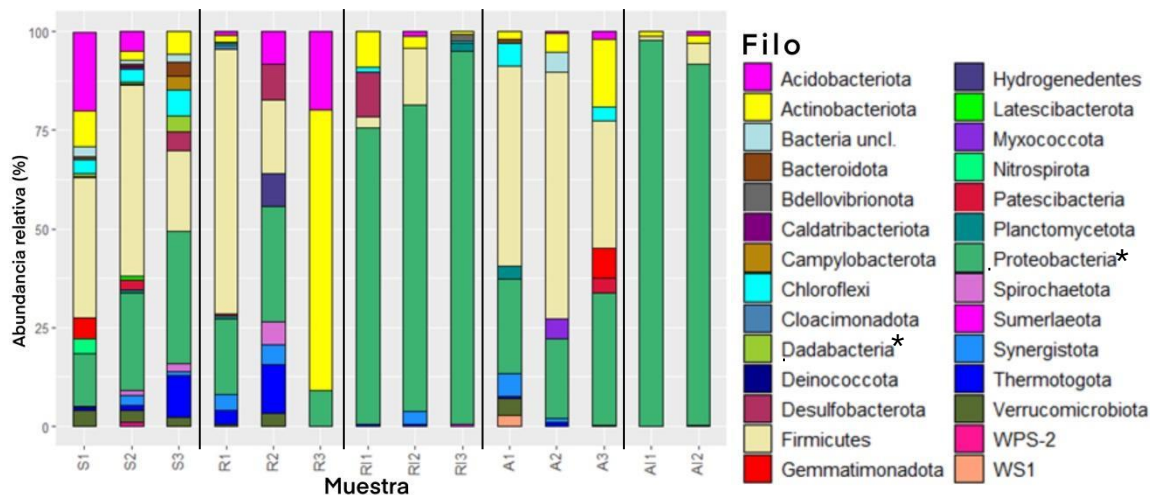
La familia *Rhizobiaceae* fue significativamente más abundante en raíces y tejido aéreo de plantas inoculadas, que en semillas y en los tratamientos sin inocular ($p= 0,0165$) (Figs. 15B y 16C). Dentro de la familia *Rhizobiaceae*, se observaron diferencias significativas en el género *Rhizobium*, el cual fue más abundante en los tratamientos inoculados que en los tratamientos sin inocular y fue ausente en semillas ($p=0,0165$) (Figs. 15C y 16C).

En cuanto a la familia *Enterobacteriaceae*, la misma fue significativamente más abundante en semillas que en raíces y tejido aéreo de plantas inoculadas ($p= 0,0457$) (Figs. 15B y 16D).

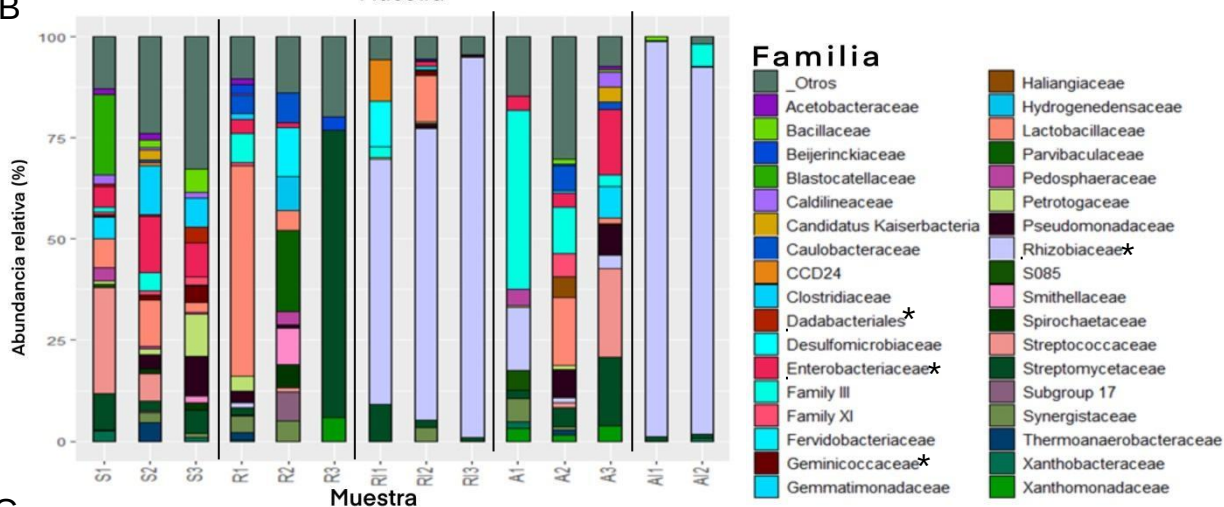
Por su parte, la familia *Geminicoccaceae*, mostró diferencias significativas en su abundancia en semillas con respecto a su abundancia en raíces de plantas sin inocular ($p=0,0395$) (Figs. 15B y 16E). Dentro de la familia *Geminicoccaceae* se encontraron diferencias significativas en el género candidato *Alysiosphaera*, significativamente más abundante en semillas, que en los tratamientos sin inocular y en el tejido aéreo de plantas inoculadas ($p=0,0395$) (Figs. 15C y 16E).

Por otro lado, también se obtuvieron diferencias significativas en la abundancia del filo candidato *Dadabacteria*, hallado únicamente en semillas ($p=0,0124$) (Figs. 15A y 16B). Dentro del filo *Dadabacteria* se obtuvieron diferencias significativas en la familia *Dadabacteriales* y género *Dadabacteria*, hallados únicamente en semillas ($p=0,0124$) (Figs. 15B y 16B).

A



B



C

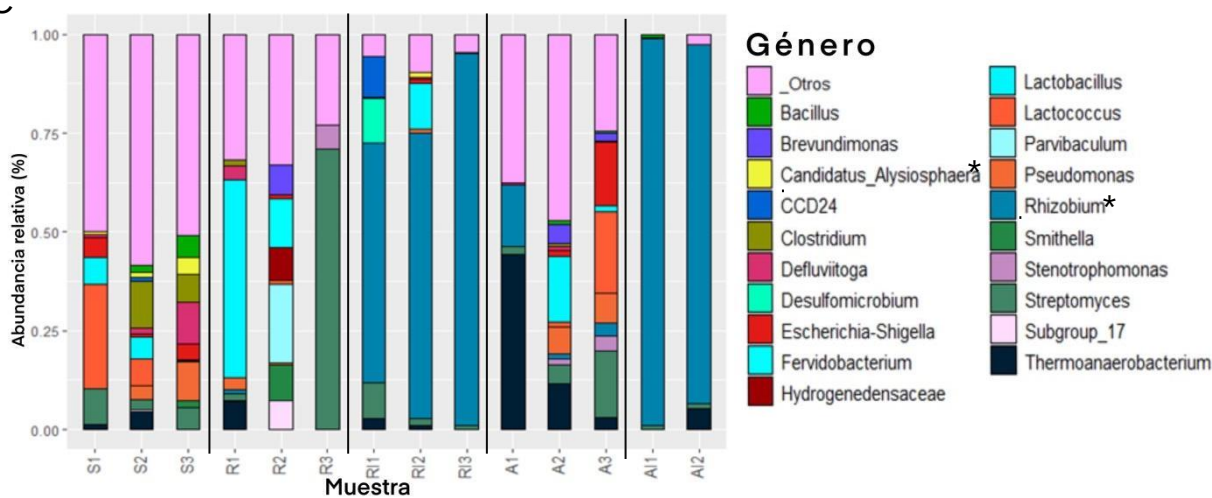


Fig. 15. Abundancia relativa de los taxa presentes en las muestras. A- Nivel: Filo. B- Familia (35 más abundantes) C- Género (20 más abundantes). Cada color corresponde a un taxón diferente. Las familias/géneros menos abundantes en el total del set de datos se agruparon en la parte superior de la figura en la categoría "Otros". Los taxa marcados con * presentaron abundancias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

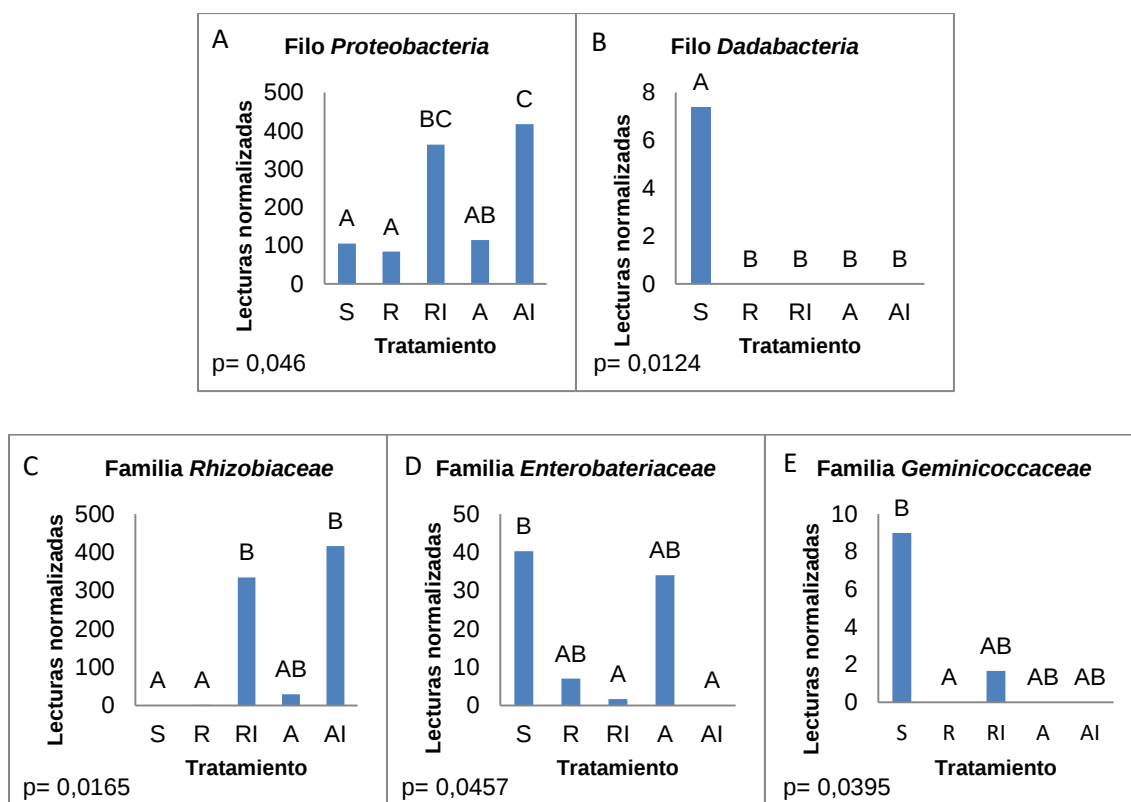


Fig. 16. Abundancia de los taxa que presentaron diferencias significativas en los tratamientos. A- filo *Proteobacteria*. B- filo *Dadabacteria*. Mismos valores y nivel de significancia para la familia *Dadabacteriales*, y el género *Dadabacteria*. C- Familia *Rhizobiaceae*. Mismos valores y nivel de significancia para el género *Rhizobium*. D- Familia *Enterobacteriaceae*. E- Familia *Geminicoccaceae*. Mismos valores y nivel de significancia para el género *Alysiosphaera*. S: semillas. R: raíces de plantas sin inocular. A: tejido aéreo de plantas sin inocular. RI: raíces de plantas inoculadas. AI: tejido aéreo de plantas inoculadas.

2- Seguimiento de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 en plantas de sorgo granífero

Teniendo en cuenta que el inóculo aplicado corresponde a una cepa del género *Rhizobium*, se profundizó en el análisis correspondiente a las ASVs relacionadas al mismo. En ese sentido se encontraron cuatro ASVs diferentes dentro de todo el conjunto de datos que fueron asignadas al género *Rhizobium* sin encontrarse ASVs asignadas a *Agrobacterium* ni a la familia *Rhizobiaceae* sin género ni al orden *Rhizobiales* sin género. Los porcentajes de identidad y cobertura obtenidos al realizar un BLAST entre las ASVs con la secuencia del gen *ARNr 16S* de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 inoculada se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Alineamiento de las ASVs del género *Rhizobium* con la secuencia de ARNr 16S de la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 inoculada.

ASV	Cobertura (%)	e- value	Id (%)
ASV 4	99	2.0×10^{-8}	100
ASV 127	100	6.0×10^{-8}	99.51
ASV 238	99	2.0×10^{-7}	99.51
ASV 312	100	1.0×10^{-9}	100

Las secuencias correspondientes a las cuatro ASVs se agruparon con cepas tipo del género *Rhizobium* o *Agrobacterium* (Fig. 18). Si bien las secuencias correspondientes a las cuatro ASVs en estudio presentan un alto porcentaje de identidad con la cepa inoculada, solamente la secuencia correspondiente a la ASV 312 se agrupa filogenéticamente con la cepa inoculada *Rhizobium* sp. UYSB13 (Fig. 17).

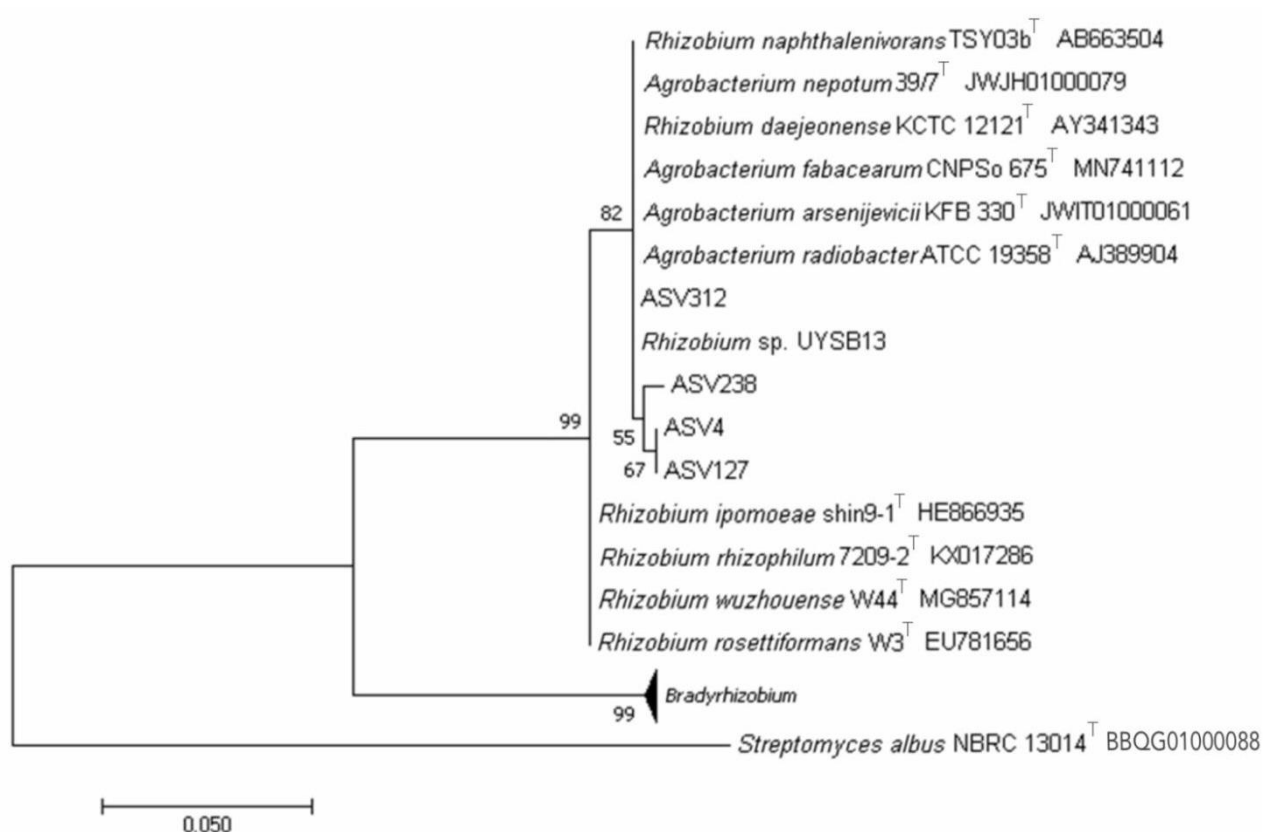


Fig.17. Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S inferido por el método de máxima verosimilitud y modelo de dos parámetros de Kimura. Se muestra la relación entre las ASVs del género *Rhizobium* y cepas tipo cercanas. En los nodos se muestran valores de bootstrap mayores a 50% basados en 1000 réplicas de bootstrap. Grupo externo: *Streptomyces albus* NBRC 13014.

Las ASVs relacionadas al género *Rhizobium* fueron identificadas principalmente en las muestras de raíces y parte aérea de plantas inoculadas (Fig. 18). En dichos tratamientos se encontraron únicamente las ASVs 4 y 312 que son las más abundantes dentro del género *Rhizobium* (55% y 44% respectivamente). En los tratamientos no inoculados se encontraron las ASVs previamente mencionadas y además las ASVs 127 y 238 en muy baja abundancia. Particularmente en muestras de tejido aéreo de plantas sin inocular se hallaron las ASVs 4, 312 y 127, mientras que en raíces de plantas sin inocular se halló únicamente la ASV 238 (Fig. 18).

La cantidad de lecturas normalizadas correspondientes a la ASV 4 en raíces de plantas inoculadas, representa un 39% del total de lecturas de ese tratamiento y en el tejido aéreo de plantas inoculadas representa un 58% (Fig. 18). Sin embargo en el tejido aéreo de plantas sin inocular representa un 3% del total de ASVs. La diferencia en la abundancia de la ASV 4 en órganos de plantas inoculadas en comparación con órganos de plantas sin inocular y con semillas fue significativamente diferente ($p=0,0183$).

Por su parte, la ASV 312 representa un 36% del total de lecturas en raíces y en tejido aéreo de plantas inoculadas, mientras que en tejido aéreo de plantas sin inocular representa solo un 4% (Fig. 18). También se observaron diferencias significativas en la cantidad de lecturas normalizadas de la ASV 312 halladas en raíces y tejido aéreo de plantas inoculadas con respecto a la cantidad de lecturas en raíces de plantas sin inocular y semillas ($p=0,0216$).

Por su parte, la ASV 127 fue encontrada únicamente en tejido aéreo de plantas sin inocular representando un 0,45% del total de las lecturas de dicho tratamiento. También, la ASV 238 fue encontrada solamente en una réplica de raíces de plantas sin inocular representando un 0,38% del total de las lecturas de dicho tratamiento (Fig. 18). Para dichos casos, las abundancias en el número de lecturas normalizadas no fueron diferentes entre tratamientos (Fig. 18). Finalmente no se encontraron ASVs relacionadas con el género *Rhizobium* en semillas (Fig. 18).

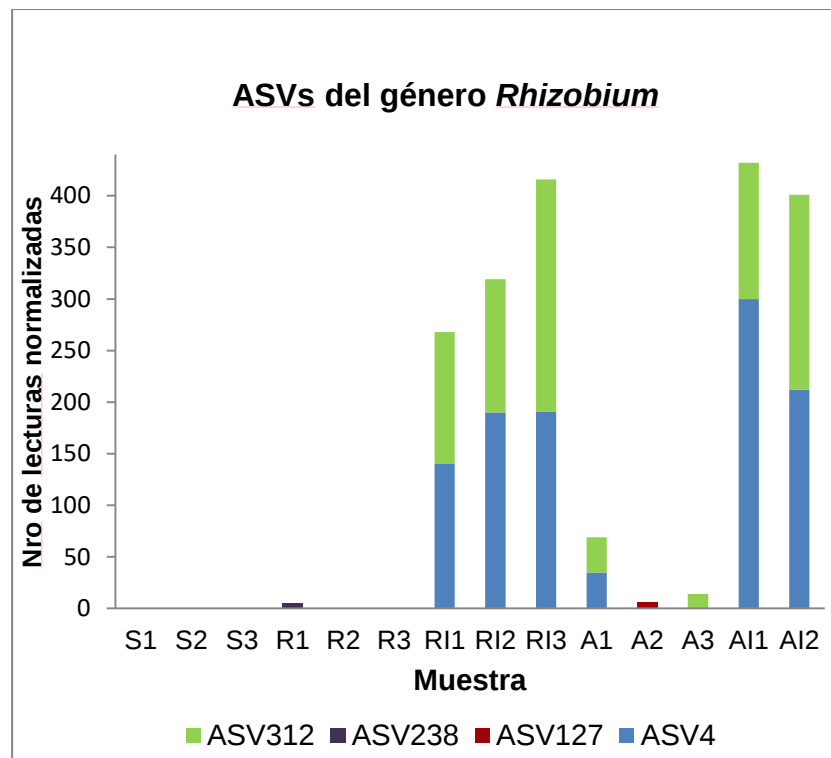


Fig. 18. Abundancias absolutas de ASVs del género *Rhizobium*. S1, S2, S3: muestras de semilla. R1, R2, R3: muestras de raíz de plantas sin inocular. A1, A2, A3: muestras de tejido aéreo de plantas sin inocular. RI1, RI2, RI3: muestras de raíz de plantas inoculadas. AI1, AI2: muestras de tejido aéreo de plantas inoculadas.

DISCUSIÓN

La colección de bacterias asociadas a sorgo dulce, presenta una gran variedad de géneros bacterianos con potencial biotecnológico

Hacia finales del siglo XIX Beijerinck descubrió que ciertas bacterias producían nódulos en las leguminosas generando una interacción benéfica para las plantas (Perret et al. 2000; Herridge 2008). Este hallazgo promovió nuevas investigaciones en no leguminosas y permitió la aplicación de formulaciones comerciales a base de microorganismos PCV, ampliamente utilizadas actualmente. La aplicación de esta tecnología, sin dudas fue uno de los mayores éxitos en la agricultura a nivel mundial (Herridge 2008).

Las formulaciones comerciales a base de microorganismos PCV son productos biotecnológicos que requieren estrictos procesos de investigación previo a alcanzar su registro habilitante. En Uruguay el organismo encargado de regular los bioinoculantes es la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). El desarrollo de nuevos inoculantes a base de BPCV comienza con la construcción de colecciones seguido por ensayos en el laboratorio basados en la búsqueda de mecanismos PCV como la FBN, la producción de ACC desaminasa, la síntesis de fitohormonas, y la solubilización de minerales (P, K, Fe) (Backer et al. 2018). Luego se realizan ensayos de evaluación de la respuesta de la planta, frente a la inoculación bacteriana en distintas condiciones: *in vitro*, en invernáculo y finalmente en condiciones de campo evaluándose también las dosis requeridas (Backer et al. 2018). Posteriormente, se desarrolla la formulación que se relaciona directamente con el tipo de aplicación del producto. Es necesario que la formulación permita su aplicación en campo y confiera al producto una larga vida útil (Backer et al. 2018). Por último, se procede al escalado de la producción y se realizan ensayos adicionales para obtener el registro del producto. Un aspecto fundamental para el registro, es la identificación a nivel de especie y la inocuidad del microorganismo a ser inoculado, es decir, el producto debe cumplir su objetivo agronómico sin afectar la diversidad biológica, el ambiente y la salud humana, animal o vegetal (DGSA 2013).

Una de las limitantes en todo este proceso es que luego de las etapas iniciales de caracterización de la colección bacteriana y selección de cepas según los mecanismos clásicos mencionados, no siempre se obtienen cepas con capacidad PCV. La obtención de cepas PCV, se dificulta más aún cuando se complejiza el sistema en el que se evalúa la interacción planta - microorganismo. Por ejemplo, al emplearse un sistema de crecimiento *in vitro*, un ensayo en invernáculo o en campo. En estos últimos, el desempeño de las bacterias inoculadas se ve influenciado por la comunidad de microorganismos presentes en el sustrato, siendo muchos de los potenciales inóculos no competitivos en la rizósfera (Backer et al. 2018).

Por otro lado, los aislamientos que poseen pocas características PCV *in vitro* pueden poseer mecanismos indirectos, u otros mecanismos PCV directos no evaluados o conocidos. Como estos mecanismos son generalmente menos estudiados, suelen ser pasados por alto en la fase de selección, siendo descartados para la fase de ensayos de respuesta del cultivo a la inoculación (Backer et al. 2018).

En este trabajo de tesis se buscó valorizar una colección de bacterias asociadas a plantas de sorgo dulce del cultivar M81E. Teniendo en cuenta que la generación y caracterización de colecciones de probables endófitos bacterianos conlleva un gran esfuerzo, se considera que este recurso puede ser aprovechado como inoculante en otros cultivos distintos a la planta de la cual fueron aisladas. Para esto, se utilizó una estrategia de selección de cepas en la que se consideró en primera instancia, el género de las mismas para poder descartar géneros asociados a patógenos humanos con la finalidad de buscar la inocuidad del posible inoculante. Posteriormente, para la selección de las cepas se consideraron las características PCV *in vitro*, evaluándose las mismas como inoculantes en condiciones *in vitro* y luego en invernáculo, en plantas de sorgo del cultivar ADV 2010 y/o ACA 727. Esta estrategia de selección permitió reducir el número de aislamientos a evaluar en condiciones de invernáculo, los cuales son ensayos más largos y costosos.

Diversos trabajos reportan una gran diversidad de géneros de bacterias aisladas a partir del interior de los tejidos vegetales (Ryan et al. 2008; Grönemeyer et al. 2012; Mareque et al. 2015; de los Santos et al. 2016). Particularmente, del interior de raíces de sorgo, se han aislado bacterias con características PCV *in vitro* relacionadas con los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* entre otros (Mareque et al. 2015; Govindasamy et al. 2017).

En esta tesis se identificaron 30 cepas con potencial de PCV. Dichas cepas, se suman a las 84 cepas de la colección previamente identificadas (Heijo 2015; Mareque et al. 2015). Los resultados mostraron la identificación de cepas pertenecientes a varios de los géneros previamente mencionados como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, además de cepas pertenecientes a otros géneros incluyendo *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Cellulomonas*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Kosakonia*. Este resultado es concordante con resultados obtenidos en otros trabajos donde se generaron colecciones de endófitos bacterianos provenientes de distintos cultivos. Se han hallado cepas de los géneros mencionados en el interior de tejidos de sorgo dulce, caña de azúcar y maíz (Beracochea 2011; Taulé et al. 2012; Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021).

La capacidad de promover el crecimiento vegetal de cepas de la colección depende del sistema de cultivo empleado, el tipo de cultivo así como el cultivar evaluado

La estrategia empleada en este trabajo, fue de mucha utilidad para la evaluación de una gran cantidad de aislamientos, de una colección muy numerosa. La misma consistió, en primera instancia, en la evaluación de la capacidad PCV de 62 aislamientos seleccionados según su género y características PCV *in vitro*, al inocularse en plantas de sorgo dulce y/o granífero en condiciones *in vitro*. Posteriormente aquellas cepas PCV seleccionadas, fueron evaluadas en condiciones de invernáculo inoculándose en sorgo dulce, sorgo granífero y maíz. El análisis de los resultados permitió identificar las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12, *Paenibacillus* sp UYSB19, *Agrobacterium* sp. UYSB23, *Pseudomonas* sp. UYSB32 y *Stenotrophomonas* sp. UYSB33 como BPCV del cultivar ADV2010 en condiciones *in vitro*. Sin embargo, dichas cepas no fueron BPCV del mismo cultivar en condiciones de invernáculo, lo que resalta el efecto que puede tener el sistema en el cual se evalúa la PCV, así como la viabilidad de la semilla y su microbiota asociada (Backer et al. 2018). Los resultados obtenidos llevaron a que se evaluaran, además, otras cepas de la colección previamente identificadas como BPCV en otros cultivares de sorgo dulce, con la finalidad de aumentar el número de cepas a ensayarse y profundizar en su caracterización (Mareque et al. 2015; Heijo et al. 2021).

Mediante dicha estrategia se comprobó que las cepas promotoras del crecimiento de los cultivares M81E y ADV2010, *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Kosakonia* sp. UYSB89, lo eran también para el cultivar ACA 727 de sorgo granífero en condiciones *in vitro*. Este efecto pudo ser observado en condiciones de invernáculo, para las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12 y UYSB13. Curiosamente la cepa UYSB12, no fue promotora de crecimiento en condiciones *in vitro* pero si en invernáculo. Este tipo de comportamiento también se observó con la cepa *Pantoea* sp. UYSB45, empleada como referencia en algunos de los ensayos de PCV en plantas de sorgo dulce en esta tesis. Previamente, se reportó la cepa UYSB45 como promotora del crecimiento de sorgo dulce del cultivar ADV 2010 en condiciones de invernáculo (Mareque et al. 2015). Sin embargo, al evaluarse en este trabajo en condiciones *in vitro* en el mismo cultivar, no se observó PCV. Estos resultados pueden deberse a las diferencias en las condiciones de crecimiento de las plantas. Posiblemente un sistema más complejo y con un sustrato no estéril (arena:tierra), como el utilizado en el invernáculo, favorezca la capacidad PCV de esta cepa al interactuar con la microbiota del sustrato (Backer et al. 2018). Por otro lado, se observó un efecto diferencial en la respuesta a la inoculación bacteriana de acuerdo al cultivar o cultivo evaluado cuando se inoculó la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7, empleada como referencia en los ensayos de PCV de sorgo granífero y maíz. Si bien dicha cepa ha sido reportada previamente como promotora del crecimiento de plantas de sorgo y de maíz (Steenhoudt and Vanderleyden 2000; Bashan and de-Bashan 2010), su inoculación en las condiciones en que se realizaron los ensayos, no mostró ningún efecto en las

plantas. Estos resultados fueron reportados previamente en estudios realizados en Uruguay, donde plantas de sorgo dulce del cultivar ADV2010 inoculadas con la cepa Sp7, no mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo en condiciones *in vitro* y tampoco en condiciones de invernáculo (Heijo 2019). Estas diferencias en la respuesta del cultivo, pueden deberse a una incompatibilidad entre los genotipos de la planta y la bacteria inoculada, o debido a que la cepa es mala competidora con la microbiota del sustrato, o de la semilla del cultivar utilizados, siendo incapaz de colonizar efectivamente las raíces (Long et al. 2008). De esta forma, se destaca la relevancia de estudiar y desarrollar inoculantes que estén adaptados a las variedades de cultivo y suelos del lugar donde se empleará, para lograr tener rendimientos óptimos.

Cabe destacar que los ensayos de evaluación de la respuesta de las plantas frente a la inoculación en condiciones *in vitro*, pueden realizarse de diversas maneras, empleándose distintos medios de cultivo y distintos soportes como el agar o bolas de polipropileno. También pueden realizarse en frascos estériles, en tubos de ensayo o en placa de Petri según la planta y la bacteria a evaluar (Conn et al. 1997). En este tipo de ensayos las plantas son crecidas en condiciones *axénicas*, con una temperatura y fotoperíodo controlado. Si bien estas condiciones se encuentran alejadas de lo que ocurre en la naturaleza, estos sistemas presentan ventajas a la hora de evaluar un conjunto numeroso de cepas por su simplicidad (Conn et al. 1997). También se conocen sus desventajas, las cuales radican por un lado, en que el efecto PCV debe observarse en períodos cortos de tiempo en los que la plántula es viable en ese tipo de sistemas. Por otro, en la baja efectividad de identificar bacterias que promuevan el crecimiento mediante mecanismos indirectos (Conn et al. 1997). Este tipo de comportamiento hace importante la evaluación constante de la respuesta de un cultivo de interés a la inoculación bacteriana en diferentes sistemas, ya que se encuentran limitaciones y ventajas en ambos tipos de aproximaciones. Asimismo la efectividad de la inoculación en invernáculo con BPCV en la PCV y el rendimiento de los cultivos se ve influenciada por muchos factores bióticos y abióticos incluyendo la textura, pH, temperatura, humedad, tipo de suelo, estado sanitario de la planta, el cultivar de la planta, la edad de la planta, y la competencia con las bacterias existentes en el suelo (Jarak et al. 2012). En ese sentido, los ensayos en condiciones de invernáculo representan una etapa intermedia en la transición hacia los ensayos en campo donde las condiciones climáticas y del suelo son variables. Por otra parte, en los ensayos de repetición para confirmar los resultados se observó que la época del año en la que se realizaba el ensayo puede influir también en el efecto PCV de las cepas, siendo el sorgo y el maíz cultivos que crecen mejor a temperaturas cálidas.

Como se mencionó, las cinco cepas PCV de **sorgo dulce** identificadas del cultivar ADV 2010 en condiciones *in vitro* fueron: *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Paenibacillus* sp. UYSB19, aisladas de raíces; así como las cepas *Agrobacterium* sp. UYSB23, *Pseudomonas* sp. UYSB32 y *Stenotrophomonas*

sp. UYSB33 aisladas de tallos. Las cepas aisladas de tallo dan idea de su capacidad de diseminación sistémica dentro de la planta, un factor relevante a la hora de seleccionar cepas para el desarrollo de inoculantes. Todas las cepas mencionadas presentaron el gen *nifH* codificante para la enzima nitrogenasa (Mareque et al. 2015), por lo que la FBN podría ser un mecanismo que esté operando en la PCV en ellas ya que los ensayos *in vitro* fueron realizados en medios de cultivo sin nitrógeno. Se ha reportado que bacterias asociadas a sorgo dulce, pertenecientes a los géneros *Kosakonia*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus*, fueron PCV *in vitro* y en invernáculo de dicha planta (Kayalvizhi and Antony 2011; Haiyambo et al. 2015). Por otra parte, se reportó que la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* KBS9-B promueve el crecimiento de plantas de sorgo dulce en condiciones de invernáculo y la cepa *Agrobacterium rubi* A16 es capaz de promover la germinación de plantas de rabanito (*Raphanus sativus*) bajo estrés salino (Idris et al. 2009; Kaymak et al. 2009). Sin embargo y como se mencionó, las cepas ensayadas en sorgo dulce del cv ADV 2010, no promovieron el crecimiento de la misma variedad en invernáculo, por lo que nuevos experimentos son necesarios realizar para evaluar por ejemplo la viabilidad de las semillas y la época del año en la que se realizan los ensayos.

Por otra parte en **sorgo granífero** cultivar ACA 727, se identificaron como BPCV en condiciones *in vitro* las cepas *Kosakonia* sp. UYSB89 y *Rhizobium* sp. UYSB13 (confirmada esta última en condiciones de invernáculo conjuntamente con la cepa UYSB12). Todas las cepas presentan el gen *nifH* y a su vez la cepa *Kosakonia* sp. UYSB89 presenta actividad nitrogenasa confirmada y es BPCV de sorgo dulce cv. ADV 2010 en condiciones de invernáculo (Heijo et al. 2021). Esto indica la posibilidad de que las cepas promuevan el crecimiento mediante la FBN. Por su parte, la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 posee la enzima ACC desaminasa que podría tener efecto en la modulación del etileno. En lo que respecta al género *Rhizobium*, existen reportes de cepas promotoras del crecimiento de plantas no leguminosas como en arroz, lechuga (*Lactuca sativa*), caña de azúcar, entre otros (Biswas et al. 2000; Galleguillos et al. 2000; Hallmann et al. 2006; Rosenblueth and Martínez-Romero 2006; Taulé et al. 2012; Beneduzi et al. 2013). Particularmente, las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Rhizobium* sp. UYSB13 han mostrado promover el crecimiento de plantas de sorgo dulce cv. M81E, en condiciones de invernáculo (Mareque et al. 2015). Por otra parte, la cepa *Kosakonia* sp. UYSB89 promueve el crecimiento de plantas de sorgo dulce del cultivar ADV 2010 en condiciones de invernáculo, por lo que se puede afirmar que no es específica de un único cultivar (Heijo et al. 2021).

Por último, los resultados obtenidos en **maíz** cultivar NT 426 mostraron que en invernáculo, a los 4 meses post inoculación las cepas *Paenibacillus* sp. UYSB19, *Pseudomonas* sp. UYSB32 *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 promovieron el crecimiento en alguna de las

variables biométricas evaluadas. Estos resultados se confirmaron únicamente para la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03, lo que destaca la importancia de repetir los ensayos para confirmar los resultados. Asimismo, se debe tener en cuenta la época del año en que se realizan los ensayos y su influencia en los resultados. El primer ensayo se realizó en primavera- verano entre los meses de agosto a diciembre mientras que el segundo ensayo se realizó en otoño- invierno iniciándose en abril y cosechándose en julio. Dado que el maíz es una planta que crece mejor en climas cálidos, es posible pensar que en el ensayo realizado en primavera, las bacterias tengan mayores efectos sobre las plantas al estar creciendo las mismas en condiciones más óptimas.

En cuanto al cultivo de maíz, se ha reportado una cepa del género *Pseudomonas* capaz de promover el crecimiento de plantas de maíz en condiciones de invernáculo y campo (Jarak et al. 2012). Si bien en este trabajo no se evaluaron como inoculante las cepas del género *Kosakonia* en plantas de maíz, se ha reportado una cepa de *Kosakonia radicincitans* capaz de promover el crecimiento de maíz en condiciones de invernáculo (Berger et al. 2018). En el futuro podrían ensayarse cepas del género *Kosakonia* de la colección de trabajo, en plantas de este cultivo, lo cual resalta que la colección de partida de este trabajo podría tener un mayor potencial aún no investigado.

Considerando lo mencionado anteriormente, se puede concluir que las cepas nativas *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Rhizobium* sp. UYSB13 presentan potencialidad para ser utilizadas como inoculantes de sorgo granífero del cultivar ACA 727. Por su parte, en cuanto al maíz se puede concluir que las cepas *Rhizobium* sp. UYSB12, *Paenibacillus* sp. UYSB19, *Pseudomonas* sp. UYSB32 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 presentan potencialidad como inoculantes del cultivar NT426. Sin embargo, en todos los casos se debe tener en cuenta que estos resultados fueron obtenidos a partir de ensayos bajo condiciones semi- controladas, por lo que falta confirmar su efecto en experimentos de campo, donde las condiciones no son controladas y donde se encuentran expuestas a mayores adversidades. Por otra parte, también falta confirmar si las BPCV son endófitos verdaderos, mediante ensayos de microscopía como parte esencial de su caracterización.

La diversidad, riqueza y composición de la microbiota endofítica bacteriana asociada a plantas de sorgo granífero, se ve afectada al inocularse con la cepa PCV *Rhizobium* sp. UYSB13

En este trabajo se utilizaron oligonucleótidos bloqueadores por detención de la elongación, con la finalidad de bajar el número de secuencias correspondientes a mitocondrias y cloroplastos (Vestheim and Jarman 2008). Sin embargo, en los resultados obtenidos llama la atención la baja

proporción de secuencias bacterianas obtenidas 0,94%, en relación a las secuencias totales. Este porcentaje es bajo en comparación con los obtenidos en otros trabajos realizados en hojas de plantas de olivo (*Olea europea*) crecidos en campo, y en semillas de distintos cultivares de maíz, en los que utilizaron sondas PNA, obteniéndose porcentajes que rondan el 87% de secuencias bacterianas (Abdullaeva et al. 2020; Vergine et al. 2020). También el porcentaje obtenido resulta ser bajo en comparación con trabajos similares en cultivo de manzana (*Malus domestica*) y pasto vetiver (*Chrysopogon zizanoides*), en donde no se utilizaron mecanismos de depleción y se obtuvieron porcentajes que rondan entre el 40% al 60% (Mahnkopp-Dirks et al. 2020; Munakata et al. 2021). De todos modos, a pesar de tener un bajo porcentaje de secuencias bacterianas, se alcanzó la asíntota en las curvas de rarefacción lo cual valida los resultados obtenidos. La comparación de los resultados obtenidos con la bibliografía hace pensar que los oligonucleótidos bloqueadores no funcionaron. En este trabajo se utilizaron los bloqueadores de secuencias de mitocondrias y cloroplastos, ubicados entre la región amplificada por los cebadores universales utilizados para la amplificación. Ambos oligonucleótidos bloqueadores se encontraban modificados con un espaciador C3 responsable del bloqueo de la amplificación y se agregaron en una alta proporción con respecto a los cebadores (8:1 bloqueadores: cebadores), tal como indica la técnica (Vestheim and Jarman 2008). Las secuencias de los bloqueadores fueron obtenidas a partir de trabajos en los que se las utilizaron como sondas PNA, es decir, los oligonucleótidos se encontraban unidos a péptidos, en el método PCR *clamping* (Abdullaeva et al. 2020; Vergine et al. 2020). Se ha reportado en la bibliografía que los oligonucleótidos bloqueadores por detención de la elongación (con espaciador C3), no son tan efectivos como los bloqueadores PNA. Esto se debe a que en ambos casos se generan diferentes tipos de interacciones bloqueador - polimerasa (Vestheim and Jarman 2008). Por lo tanto, es conveniente usar las sondas PNA para optimizar los porcentajes de lecturas bacterianas obtenidas en la secuenciación.

El análisis de los resultados obtenidos muestra que existe una diversidad y riqueza significativamente mayor en las muestras de semillas y plantas no inoculadas, en comparación con las de los tratamientos inoculados con la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13. Estos resultados demuestran el impacto que tiene la inoculación bacteriana sobre la microbiota endofítica al mes de ser evaluada, hecho que se evidenció también en la agrupación según los tratamientos evaluados en los PCA.

Contrariamente a lo que se obtuvo en este trabajo, existen diversos reportes que indican que la inoculación bacteriana es capaz de aumentar la diversidad de la comunidad endofítica (Pedraza et al. 2009; Gadhav et al. 2018). Se ha reportado un aumento en la diversidad endofítica de raíz de plantas de brócoli (*Brassica oleracea*) con la inoculación con *Bacillus* sp. y también en la filósfera endofítica de plantas de arroz luego de la inoculación con *Azospirillum* sp. en condiciones de campo (Pedraza et al. 2009; Gadhav et al. 2018). Sin embargo, es difícil predecir cómo la

inoculación con un microorganismo afectará la diversidad endofítica. Dicho efecto dependerá del lugar y la concentración en la que sea aplicado el inóculo, su capacidad de colonizar el tejido, así como las funciones que cumpla dentro de la planta y las condiciones de crecimiento, (Castro-Sowinski et al. 2007). Por otra parte, cabe destacar que esta baja diversidad endofítica se observó en plantas crecidas durante un mes en condiciones *in vitro*, por lo que sería interesante estudiar si este fenómeno se mantiene a lo largo del tiempo y en sistemas más complejos empleando otros tipos de sustratos.

En cuanto a la composición de la microbiota endofítica, en este trabajo se observaron diferencias significativas entre tratamientos en las familias *Enterobacteriaceae*, *Rhizobiaceae* (género *Rhizobium*), *Geminicoccaceae* (género candidato *Alysiosphaera*), y *Dadabacteriales* (género candidato *Dadabacteria*). Particularmente el género *Rhizobium* fue más abundante en los tratamientos inoculados, lo que sugiere que la cepa UYSB13 fue capaz de colonizar tanto las raíces como el tejido aéreo de las plantas. Por otra parte, se detectó que la familia *Enterobacteriaceae*, y los géneros Candidatus *Alysiosphaera* y *Dadabacteria* fueron más abundantes en semillas. El hecho de que ciertos grupos sean más abundantes en semillas, resalta la importancia de investigar sobre la microbiota de semillas debido a su implicancia en el desarrollo de la planta, sobre todo en los primeros estadios de desarrollo (Berg and Raaijmakers 2018).

Particularmente las Enterobacterias, han sido previamente detectadas como endófitas de plantas y de semillas de maíz (Berg and Raaijmakers 2018). Por otra parte, se ha reportado una cepa perteneciente a la familia *Geminicoccaceae*, con 89% de homología con el género candidato *Alysiosphaera europeae*, como endófita del tronco de pinos afectados por un nemátodo. Dicha cepa presenta la capacidad de degradar el almidón y la quitina, lo que podría indicar la posibilidad de ingresar a los tejidos vegetales, así como de proveer a la planta de cierta defensa contra patógenos y favorecer su germinación (Proença et al. 2018). Con respecto al género candidato *Dadabacteria*, se ha reportado que cepas relacionadas a este género son capaces de convertir el nitrato a nitrito y luego a amonio (Hug et al. 2016). Esta función podría beneficiar a las plantas en cuanto a la adquisición de nitrógeno, sin embargo, no se han reportado hasta el momento bacterias de este género asociadas a plantas.

En este trabajo se profundizó en el estudio de la variación de la abundancia relativa de ASVs asociadas al género *Rhizobium* ya que las mismas se relacionarían con el inóculo aplicado.

De las cuatro ASVs del género *Rhizobium* identificadas, dos de ellas fueron las más abundantes (ASV 4 y ASV 312). Estas ASVs se encontraron principalmente en muestras provenientes de plantas inoculadas, pero también en bajas proporciones en muestras de tejido aéreo de plantas sin inocular. Este resultado indicaría, por un lado, la capacidad del inóculo de colonizar los tejidos vegetales no solo raíces sino también tejidos aéreos. Por otra parte, el hecho de encontrar un bajo

porcentaje de ASV 4 y ASV 312 en muestras de plantas sin inocular, pero no en semillas, puede sugerir que esta ASV pudiera estar presente en semillas en una proporción tan baja que resultó indetectable pero luego de un mes de crecimiento de la plántula, aumentó su proporción.

Por otra parte, las otras dos ASVs (ASV 127 y ASV 238) se encontraron en muy bajos porcentajes, en un tratamiento de tejido aéreo y de raíces de plantas sin inocular respectivamente. El bajo o nulo porcentaje de dichas ASVs en muestras de plantas sin inocular incluyendo las semillas, sugiere que el género *Rhizobium* no es significativo como endófito de sorgo granífero del cultivar utilizado, crecido en condiciones *in vitro*. De todos modos, dicho género ha sido reportado como endófito de semilla de maíz y de poroto (*Phaseolus vulgaris*), y se cree que podrían contribuir a la defensa de la planta durante su desarrollo (Rosenblueth et al. 2012).

Como las ASVs son secuencias únicas de ADN recuperadas en la secuenciación, se propone que pueden distinguir más refinadamente las especies que las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por su sigla en inglés), (Koeppel and Wu 2013; Schloss 2021). Sin embargo, como es posible que los genomas bacterianos contengan varias copias del gen 16S, utilizado como gen marcador en este ensayo, y no todas las copias sean exactamente idénticas, es posible que el análisis generando ASVs distinga como especies diferentes, a una misma especie debido a estas diferencias en las secuencias de las copias de sus 16S (Schloss 2021).

Por último, cabe destacar que resulta interesante que la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 promueva el crecimiento de una planta no leguminosa y en estadíos iniciales se disemine al tejido aéreo de la planta. Si bien en los últimos años se han reportado algunos ejemplos de rizobios promotores del crecimiento de no leguminosas tales como arroz, caña de azúcar y trigo, resulta interesante continuar con el estudio de este tipo de asociación (Biswas et al. 2000; Galleguillos et al. 2000; Hallmann et al. 2006; Rosenblueth and Martínez-Romero 2006; Taulé et al. 2012; Beneduzi et al. 2013; Bartoli et al. 2020; Hernández et al. 2021). Por otra parte, si bien, generalmente las bacterias de este género se encuentran asociadas a las raíces de las plantas, también se han reportado rizobios aislados del interior de ramas y hojas de plantas de olivo, lo que respalda nuestro resultado (Vergine et al. 2020).

CONCLUSIONES

El desarrollo de las actividades planificadas, permitió cumplir con todos los objetivos planteados en la presente tesis, lográndose conocimientos fundamentales para el entendimiento de la interacción planta-bacteria, así como insumos valiosos para el futuro desarrollo de inoculantes bacterianos para los cultivos de sorgo dulce, sorgo granífero y maíz.

Se identificaron diversos géneros como asociados a plantas de sorgo dulce, varios de ellos reportados como PCV y endófitos de sorgo dulce. La identificación resulta relevante para seleccionar cepas para futuros ensayos de PCV.

Mediante ensayos de respuesta de plantas a la inoculación bacteriana, se identificaron las cepas:

-*Rhizobium* sp. UYSB12, *Paenibacillus* sp. UYSB19, *Agrobacterium* sp. UYSB23, *Pseudomonas* sp. UYSB32 y *Stenotrophomonas* sp. UYSB33, como BPCV de plantas de sorgo dulce cv. ADV2010 *in vitro*.

-*Kosakonia* sp. UYSB89 como BPCV de sorgo granífero cv. ACA727 en condiciones *in vitro* y *Rhizobium* sp. UYSB13 tanto en condiciones *in vitro* como de invernáculo.

-*Acinetobacter* sp. UYSO03 como BPCV de maíz en condiciones de invernáculo.

Por otro lado se comprobó que al inocularse la cepa *Rhizobium* sp. UYSB13 en plantas de sorgo granífero en condiciones *in vitro*, la misma afecta la diversidad, abundancia y composición de la microbiota endofítica, estableciéndose en los diferentes tejidos internos de las plantas, siendo un resultado muy interesante para una cepa de este género.

En términos generales, se puede concluir que se logró valorizar la colección de bacterias endófitas de sorgo dulce cv. M81E, identificándose cepas promotoras del crecimiento vegetal con potencialidad para ser utilizadas como inoculantes de sorgo granífero cv. ACA727 o maíz cv. NT426, cultivares empleados en Uruguay.

ANEXOS

Anexo 1. Cepas de la colección de bacterias endófitas seleccionadas en este trabajo, sus características PCV y PMI y sus resultados en ensayos de PCV *in vitro* y en invernáculo

Cepa	Órgano	Género	Mecanismos PCV y PMI	PCV <i>in vitro</i> Sorgo cv. ADV2010	PCV <i>in vitro</i> Sorgo cv. ACA727	PCV invern. Sorgo cv. ADV 2010	PCV invern. Sorgo cv. ACA727	PCV invern. Maiz cv. NT426	Ref
UYSB01	Raíz	<i>Ralstonia</i>	<i>nifH</i> , sid	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB02	Raíz	<i>Ralstonia</i>	<i>nifH</i> , sid, ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB04	Raíz	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , prot, biof	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB05	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB06	Raíz	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , ACC, cel	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB07	Tallo	<i>Bacillus</i>	ACC, cel	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB08	Semilla	<i>Kocuria</i>	<i>nifH</i> , ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB10	Raíz	<i>Stenotrophomonas*</i>	sid, ACC, prot, biof	ND	ND	ND	ND	ND	1
UYSB11	Raíz	<i>Rhizobium</i>	<i>nifH</i> , ACC, biof	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB12	Raíz	<i>Rhizobium</i>	<i>nifH</i> , ACC, prot, biof	+	-	-	+/+	+/-	1
UYSB13	Raíz	<i>Rhizobium</i>	<i>nifH</i> , ACC, prot, biof	ND	+/+	ND	+/+	ND	1
UYSB14	Raíz	<i>Ralstonia*</i>	<i>nifH</i> , sid	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB15	Raíz	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB16	Raíz	<i>Bacillus*</i>	<i>nifH</i> , ACC, prot, biof	ND	ND	ND	ND	ND	1
UYSB17	Raíz	<i>Rhizobium</i>	<i>nifH</i> , ACC, biof	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB18	Raíz	<i>Bacillus</i>	SolP, ACC, prot	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB19	Raíz	<i>Paenibacillus</i>	<i>nifH</i> , ACC, biof	+	-	-	-	+/-	1
UYSB20	Raíz	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB21	Raíz	<i>Pantoea</i>	<i>nifH</i> , sid, AIA, ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB22	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i> , sid, AIA, ACC	-	ND	ND	ND	ND	1

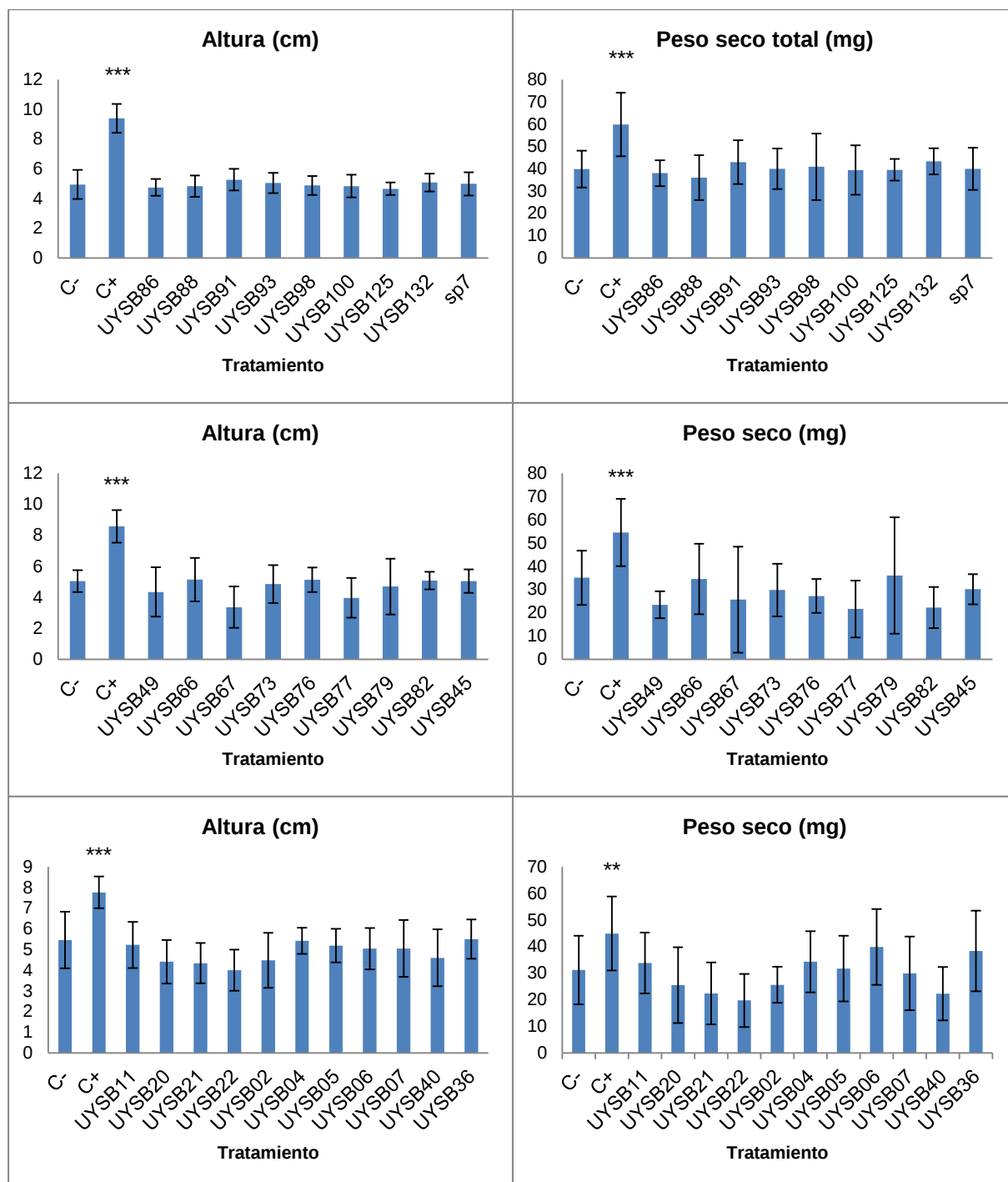
UYSB23	Tallo	<i>Agrobacterium</i>	<i>nifH</i> , sid, prot, biof	+	-	-	ND	ND	1
UYSB24	Tallo	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , AIA, ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB25	Tallo	<i>Rhizobium</i>	<i>nifH</i> , ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB26	Tallo	<i>Bacillus</i>	SolP, AIA, biof	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB27	Tallo	<i>Paenibacillus</i>	<i>nifH</i> , biof	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB28	Raíz	<i>Brevibacillus</i>	<i>nifH</i> , ACC, hemic, cel	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB30	Tallo	<i>Pantoea</i> *	sid, AIA, ACC	ND	ND	ND	ND	ND	1
UYSB31	Tallo	<i>Pseudomonas</i> *	sid, AIA, ACC, biof	ND	ND	ND	ND	ND	1
UYSB32	Tallo	<i>Pseudomonas</i>	<i>nifH</i> , sid, SolP, prot, biof	+	-	-	-	+/-	1
UYSB33	Tallo	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>nifH</i> , AIA, ACC, biof	+	ND	-	ND	-	1
UYSB36	Tallo	<i>Brevibacillus</i>	<i>nifH</i> , AIA, ACC	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB39	Raíz	<i>Pantoea</i> *	AIA, biof	ND	ND	ND	ND	ND	1
UYSB40	Raíz	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>nifH</i> , AIA, prot, biof	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB42	Raíz	<i>Acinetobacter</i>	<i>nifH</i> , SolP, AIA	-	ND	ND	ND	ND	1
UYSB49	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB54	Raíz	<i>Cellulomonas</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB60	Raíz	<i>Staphylococcus</i> *	<i>nifH</i> , AIA	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB62	Raíz	<i>Staphylococcus</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB63	Raíz	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , ARA	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB64	Raíz	<i>Cellulomonas</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB66	Raíz	<i>Citrobacter</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB67	Raíz	<i>Kluyvera</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB70	Raíz	<i>Enterobacter</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB71	Raíz	<i>Klebsiella</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB73	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i> , ARA, AIA	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB74	Raíz	<i>Enterobacter</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB75	Raíz	<i>Enterobacter</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB76	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB77	Raíz	<i>Enterobacter</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB79	Raíz	<i>Enterobacter</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB82	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2

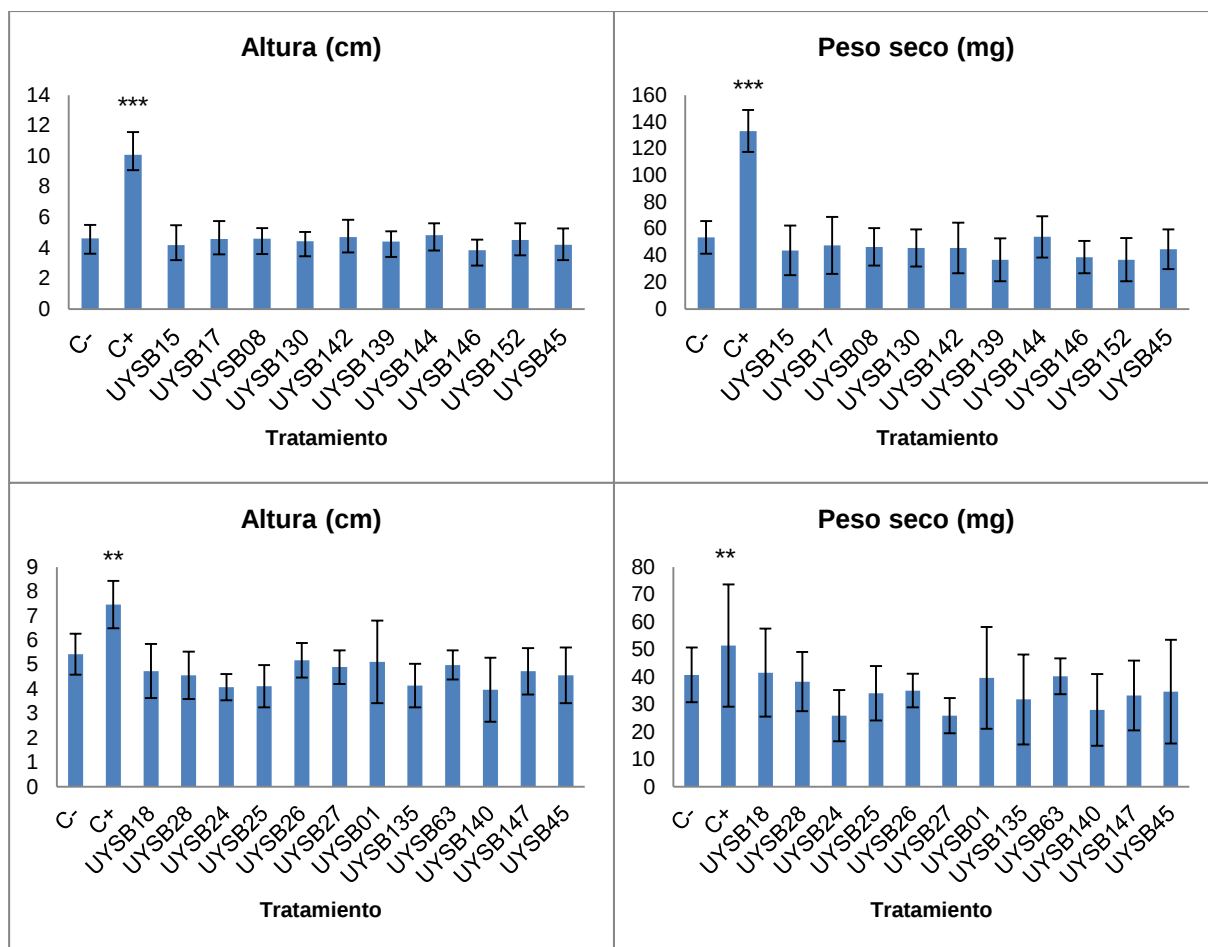
UYSB85	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB86	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB87	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB88	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB89	Raíz	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i> , ARA	ND	+	+ ¹	-	ND	2
UYSB91	Raíz	<i>Enterobacter</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB92	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB93	Raíz	<i>Acinetobacter</i> *	<i>nifH</i> , ARA	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB94	Raíz	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB97	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB98	Raíz	<i>Klebsiella</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB100	Raíz	<i>Kosakonia</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB110	Raíz	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB113	Raíz	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB119	Raíz	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i> , ARA	ND	-	+ ¹	-	ND	2
UYSB130	Raíz	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i> , prot	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB135	Raíz	<i>Citrobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB139	Semilla	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i> , AIA	-	-	+ ¹	-	ND	2
UYSB140	Semilla	<i>Pantoea</i>	<i>nifH</i> , AIA	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB142	Semilla	<i>Bacillus</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB144	Semilla	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB145	Semilla	<i>Pantoea</i>	<i>nifH</i>	ND	-	ND	-	ND	2
UYSB146	Semilla	<i>Kosakonia</i>	<i>nifH</i> , AIA	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB147	Tallo	<i>Microbacterium</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB150	Tallo	<i>Enterobacter</i>	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSB151	Tallo	<i>Pantoea</i> *	<i>nifH</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2
UYSB152	Tallo	<i>Pantoea</i> *	<i>nifH</i>	-	ND	ND	ND	ND	2
UYSO03 [#]	Tallo	<i>Acinetobacter</i>	<i>nifH</i> , ARA, sid, SolP, AIA	- ²	ND	ND	ND	+/-	3
UYSO24 [#]	Tallo	<i>Rhizobium</i>	<i>nifH</i> , ARA, AIA	- ²	ND	ND	ND	-	3

nifH: presencia del gen *nifH* . ARA: actividad nitrogenasa. sid: producción de sideróforos. SolP: solubilización de fosforo. AIA: producción de ácido indol acético. ACC: producción de ACC desaminasa. Hemic: producción de hemicelulasas. cel: producción de celulasas. prot: producción de proteasas. biof:

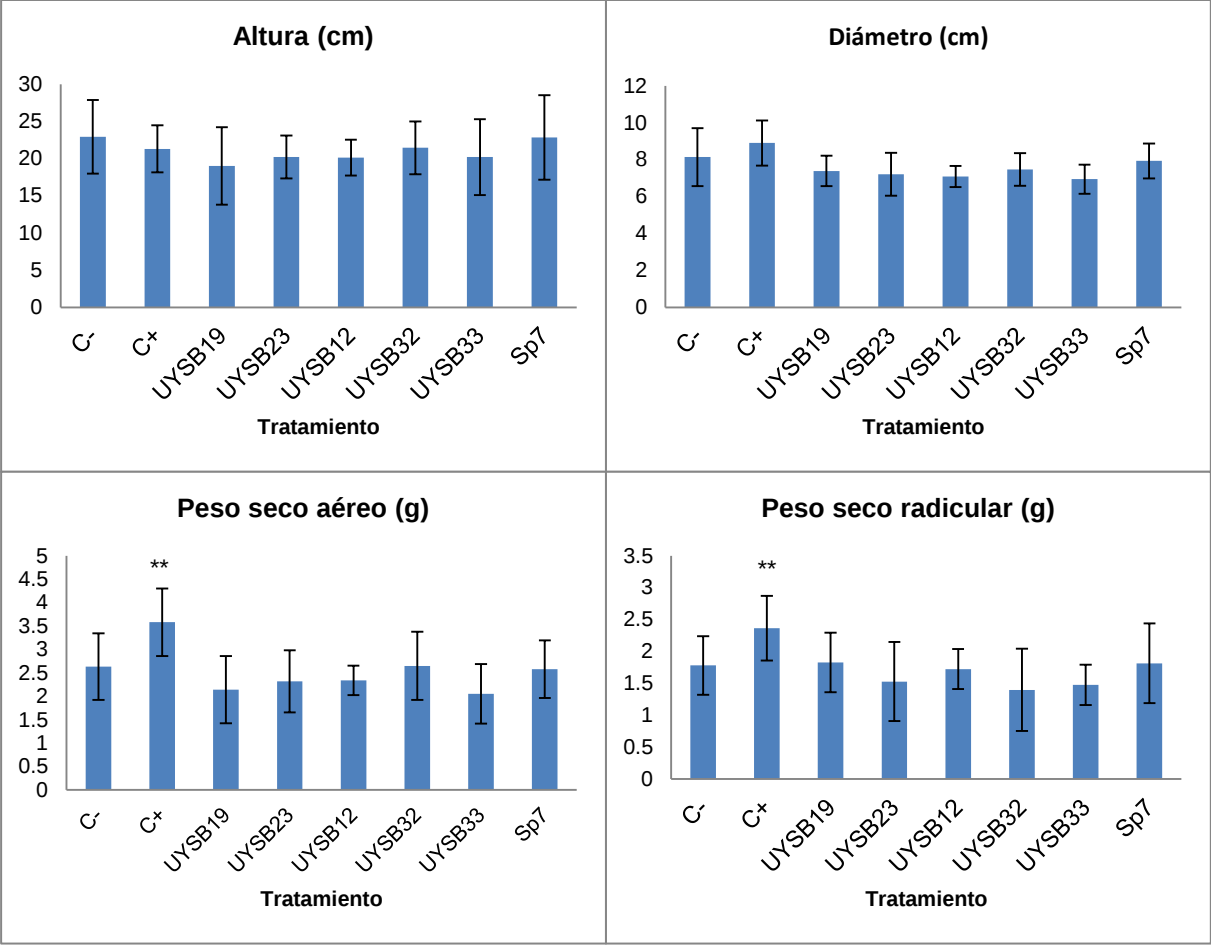
producción de biofilm. ND: no determinado. ¹Resultados obtenidos por (Heijo et al. 2021). ² Resultados obtenidos por (Lanza 2018). +/-: resultados confirmado. Ref: Referencia. 1. Aislamiento y caracterización realizados por (Mareque et al. 2015). 2. Aislamiento y caracterización realizados por (Heijo et al. 2021). 3. Aislamiento y caracterización realizados por (Taulé et al. 2012). Las cepas marcadas con * fueron identificadas en este trabajo. Las cepas marcadas con # fueron aisladas del interior de tejidos de caña de azúcar, el resto de sorgo dulce.

Anexo 2. Evaluación de la respuesta a la inoculación bacteriana en plantas de sorgo dulce cv. ADV2010 en condiciones *in vitro*. Ensayos donde no se obtuvieron cepas PCV

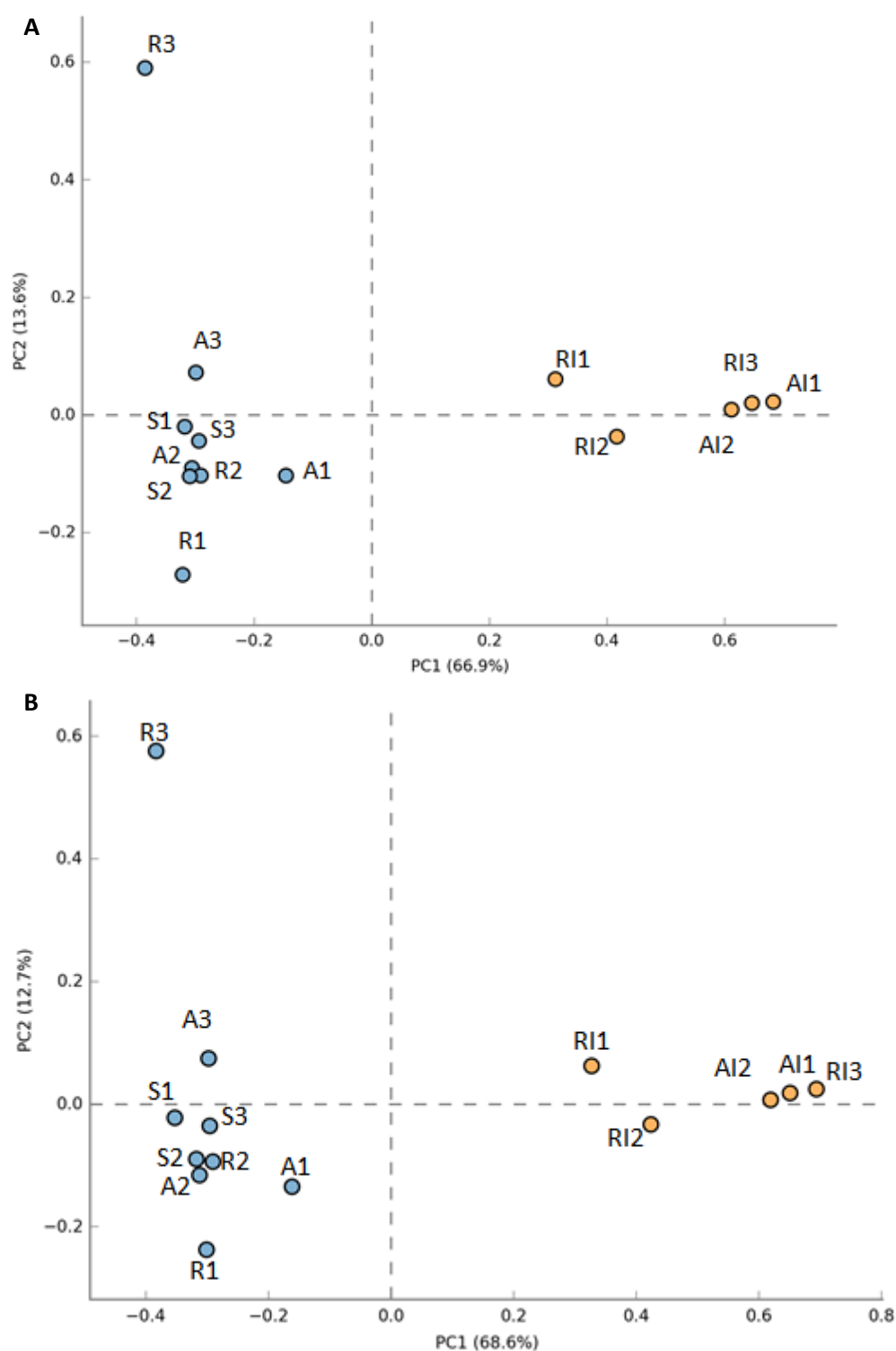




Anexo 3. Evaluación de la respuesta a la inoculación bacteriana en plantas de sorgo dulce cv. ADV2010 en condiciones de invernáculo. Ensayo donde no se obtuvieron cepas PCV



Anexo 4. PCA de los tratamientos evaluados



A- Distribución de los datos identificados a nivel de familia. B- Distribución de los datos identificados a nivel de género. S1, S2, S3: muestras de semilla. R1, R2, R3: muestras de raíz de plantas sin inocular. A1, A2, A3: muestras de tejido aéreo de plantas sin inocular. RI1, RI2, RI3: muestras de raíz de plantas inoculadas. AI1, AI2: muestras de tejido aéreo de plantas inoculadas.

REFERENCIAS

- Abdullaeva Y, Ambika Manirajan B, Honermeier B, et al (2020) Domestication affects the composition, diversity, and co-occurrence of the cereal seed microbiota. *J Adv Res*.
- Aguado- Santacruz G, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, et al (2012) Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev fitotec* 35:
- Almodares A, Hadi MR (2009) Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *African J Agric Res* 4:772–780
- Artschwager E (1948) Anatomy and Morphology of the Vegetative Organs of *Sorghum Vulgäre*. *Tech Bull* N0957 55
- Avery GS (1930) The botanical text-book,. In: *The botanical Gazette*
- Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, et al (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front Plant Sci* 871:
- Bartoli C, Boivin S, Marchetti M, et al (2020) *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* strains are natural wheat endophytes and can stimulate root development and colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. 1–15.
- Bashan Y, de-Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment, 1st edn. Elsevier Inc.
- Beckers B, Op De Beeck M, Thijs S, et al (2016) Performance of 16s rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Front Microbiol* 7:
- Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, et al (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl Soil Ecol* 63:94–104.
- Beracochea M (2011) Respuesta de variedades comerciales de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay
- Berg G, Raaijmakers JM (2018) Saving seed microbiomes. *ISME J* 12:1167–1170.

- Berger B, Patz S, Ruppel S, et al (2018) Successful Formulation and Application of Plant Growth-Promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. Biomed Res Int.
- Biswas J. C, Ladha JK, Dazzo FB (2000) Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake and Growth of Lowland Rice. Soil Sci Soc Am J 64:1644–1650
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010) correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. Nat Methods 7:335–336.
- Carter P., Hicks DR, Oplinger ES, et al (1989) Grain Sorghum (Milo). Univ Wisconsin
- Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y, Jurkevitch E (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. FEMS Microbiol Lett 276:1–11.
- Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, et al (2009) Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. PLoS One 4:e6669.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, et al (2005) Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and. Appl Environ Microbiol 71:4951–4959.
- Conn KL, Nowak J, Lazarovits G (1997) A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. Can J Microbiol 43:801–808.
- de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, et al (2015) 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.
- de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, et al (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.
- DGSA (2013) Resolución N° 4/013 de la DGSA - Registro y control de inoculantes formulados con microorganismos promotores del crecimiento de las plantas
- Doggett H (1970) *Sorghum*. Tropical agricultura serie. Longman scientific and technical
- Esquivel-cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-ortega R, Huante P (2013) Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rhizobacterias. Rev Fitotec Mex 36:251–258

- Fernández- Pascual M, de María N, de Felipe M. (2002) Fijación Biológica de nitrógeno: Factores limitantes. *Cienc y Medio Ambient* 195–202
- Ferraguti F, Salvagliotti F, Castellarín J (2010) Rendimiento y calidad de maíz según estrategias de fertilización con nitrógeno y azufre.
- Gadhavé KR, Devlin PF, Ebertz A, et al (2018) Soil Inoculation with *Bacillus* spp. Modifies Root Endophytic Bacterial Diversity, Evenness, and Community Composition in a Context-Specific Manner. *Microb Ecol* 76:741–750.
- Galleguillos C, Miguel J, Azco R (2000) Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci* 159:57–63
- Gasser I, Cardinale M, Müller H, et al (2011) Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant Soil* 347:125–136.
- Govindasamy V, Kumar S, George P, et al (2017) Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L .) Moench]. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110:925–943.
- Grönemeyer JL, Burbano CS, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2012) Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. *Plant Soil* 356:67–82.
- Haiyambo DH, Chimwamurombe PM, Reinhold-Hurek B (2015) Isolation and Screening of Rhizosphere Bacteria from Grasses in East Kavango Region of Namibia for Plant Growth Promoting Characteristics. *Curr Microbiol* 71:566–571.
- Hallmann J, Berg G, Schulz B (2006) Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms. In: *Microbial Root Endophytes*. Springer Berlin Heidelberg, pp 299–319
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.. *Palaeontol Electron* 1–9
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293–320.
- Heijo G (2015) Construcción y caracterización de una colección bacteriana de probables endófitos diazotrofos nativos asociados a plantas adultas de la variedad M81E de sorgo dulce. Facultad de Ciencias UdelAR

- Heijo G (2019) Promoción del crecimiento vegetal por bacterias endófitas diazótrofes asociadas a plantas de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*). PEDECIBA Biología. Subárea Microbiología
- Heijo G, Taulé C, Mareque C, et al (2021) Interaction among endophytic bacteria, sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars and chemical fertilization. FEMS Microbiol Ecol 97:245.
- Hernández I, Taulé C, Pérez-Pérez R, et al (2021) Endophytic rhizobia promote the growth of Cuban rice cultivar. Symbiosis 85:175–190.
- Herridge DF (2008) Inoculation Technology For Legumes. In: Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I. NWE (ed) Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Springer, Dordrecht, pp 77–115
- Hu X, Chen J, Guo J (2006) Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain ,. World J Microbiol Biotechnol 22:983–990.
- Hug LA, Thomas BC, Sharon I, et al (2016) Critical biogeochemical functions in the subsurface are associated with bacteria from new phyla and little studied lineages. Environ Microbiol 18:159–173.
- Idris A, Labuschagne N, Korsten L (2009) Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. J Agric Sci 147:17–30.
- INIA (2015) Día de Campo “ Manejo en Cultivos de Verano ” Febrero 2015
- INIA, INASE (2020) Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de sorgo forrajero período 2019
- INIA, INASE (2014) Sorgo para silo y sorgo dulec para producción de etanol Pperíodo 2013
- Jarak M, Mrkovacki N, Bjelic D, et al (2012) Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. African J Microbiol Res 6:5683–5690.
- Kayalvizhi V, Antony U (2011) Microbial and physico-chemical changes in tomato juice subjected to pulsed electric field treatment. African J Agric Res 6:6348–6353.
- Kaymak HÇ, Güvenç I, Yarali F, Dönmez MF (2009) The Effects of Bio-priming with PGPR on Germination of Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds under Saline Conditions. Turkish J Agric For 33:173–179.
- Kloepper JW, Ryu C (2006) Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. Soil Biol 9:33–52
- Koeppel AF, Wu M (2013) Surprisingly extensive mixed phylogenetic and ecological signals among

- bacterial Operational Taxonomic Units. *Nucleic Acids Res* 41:5175–5188.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874.
- Lane DJJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp 115–175
- Lanza M (2018) Evaluación de la capacidad de promover El Crecimiento Vegetal Por Bacterias Endófitas Nativas. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay
- Lavergne C, Bovio-Winkler P, Etchebehere C, García-Gen S (2019) Towards centralized biogas plants: Co-digestion of sewage sludge and pig manure maintains process performance and active microbiome diversity. *Bioresour Technol*.
- Lloret L, Martínez-Romero E (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev Latinoam Microbiología* 47:43–60
- 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:
- Mahnkopp-Dirks F, Radl V, Kublik S, et al (2020) Molecular Barcoding Reveals the Genus *Streptomyces* as Associated Root Endophytes of Apple (*Malus domestica*) Plants Grown in Soils Affected by Apple Replant Disease. *Phytobiomes J* PBIOMES-07-20-0.
- Malfanova N, Lugtenberg BJJ, Berg G (2013) Bacterial Endophytes: Who and Where, and What are they doing there? *Mol Microb Ecol Rhizosph* 1:391–403.
- Malfanova N V. (2010) Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. Facultad de Ciencias, Leiden University
- Mareque C, Freitas da Silva T, Estebanez Vollú R, et al (2018) The Endophytic Bacterial Microbiota Associated with Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor*) Is Modulated by the Application of Chemical N Fertilizer to the Field. *Int J Genomics* 2018:
- 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.
- Martin (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17:10–12

- Mei C, Flinn B (2010) The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement. *Recent Pat Biotechnol* 4:81–95.
- MGAP (2021) Anuario Estadístico Agropecuario [Annual Agricultural Statistics]. Anu Estadístico Agropecu 263
- Milani C, Hevia A, Foroni E, et al (2013) Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. *PLoS One* 8:
- Munakata Y, Gavira C, Genestier J, et al (2021) Composition and functional comparison of vetiver root endophytic microbiota originating from different geographic locations that show antagonistic activity towards *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res* 243:
- Mus F, Alleman A., Pence N, et al (2018) Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. *Metallomics*.
- Nelson EB (2018) The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* 422:7–34.
- Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D (2010) Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoam* 28:
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207–220.
- Pedraza RO, Bellone CH, Carrizo de Bellone S, et al (2009) *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur J Soil Biol* 45:36–43.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180–201.
- Peters JW, Fisher K, Dean DR (1995) Nitrogenase structure and function : A Biochemical-Genetic Perspective. *Annu Rev Microbiol* 49:335–366
- Proença DN, Whitman WB, Varghese N, et al (2018) *Arboriscoccus pini* gen. nov., sp. nov., an endophyte from a pine tree of the class *Alphaproteobacteria*, emended description of *Geminicoccus roseus*, and proposal of *Geminicoccaceae* fam. nov. *Syst Appl Microbiol* 41:94–100.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:590–596.
- Reinhold-hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants : bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol*

14:435–443.

Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Interactions of Gramineous Plants with *Azoarcus* spp. and Other Diazotrophs : Identification , Localization , and Perspectives to Study their Function Plant Sci 17:29–54

Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, et al (2006) An Endoglucanase Is Involved in Infection of Rice Roots by the Not-Cellulose-Metabolizing Endophyte *Azoarcus* Sp . Strain BH72. MPMI 19:181–188

Richardson AE, Simpson RJ (2011) Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. Plant Physiol 156:989–996.

Roca N, Pazos MS, Bech J (2007) Disponibilidad de cobre, hierro, manganeso, zinc en suelos del NO argentino. Ci Suelo 25:31–42

Rosconi F, Trovero MF, de Souza EM, Fabiano E (2016) Serobactins-mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. Environmental Microbiol.

Rosenblueth M, López-López A, Martínez J, et al (2012) Seed bacterial endophytes: Common genera, seed-to-seed variability and their possible role in plants. Acta Hortic 938:39–48. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.938.4

Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. Mol Plant-Microbe Interact 19:827–837.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al (2008) Bacterial endophytes : recent developments and applications. FEMS 278:1–9.

Sarig S, Okon Y, Blum A (1990) Promotion of Leaf Area Development and Yield in *Sorghum bicolor* with *Azospirillum brasilense*. Symbiosis 9:235–245

Schloss PD (2021) Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. mSphere 6:

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS 31:425–448.

Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen- fixing bacterium closely associated with grasses : genetic , biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24:487–506

- Sugumaran P, Janarthanam B (2007) Solubilization of Potassium containing minerals by bacteria and their effect of plant growth. *World J. of Agric Sci* 3:350–355
- Taulé C, Barlocco C, Mareque C, et al (2015) Inoculation effects of endophytic diazotrophs in combination with different levels of chemical N-fertilizer on commercial sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars.
- Taulé C, Mareque C, Barlocco C, et al (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.
- 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.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced. *Annu Rev Phytopathol* 36:453–483
- Vance CP, Uhde-stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use : critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157:423–447
- Vega-celedón P, Martínez HC, González M, Seeger M (2016) Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultiv Trop* 37:33–39.
- Vergine M, Meyer JB, Cardinale M, et al (2020) The *xylella fastidiosa*-resistant olive cultivar “leccino” has stable endophytic microbiota during the olive quick decline syndrome (OQDS). *Pathogens* 9:1–23.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586
- Vestheim H, Jarman SN (2008) Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - A case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Front Zool* 5:1–11.
- Vincent J. (1970) *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacterial* Blackwell Scientific Publications. Oxford. Blackwell Scientific
- Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, et al (2009) Exploiting plant – microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnol* 27:591–598.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617.
- Young JP. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey G, Burris RH,

Evans H. (eds) Biol Nitrogen Fixat. Chapman and Hall inc, New York, pp 43–86

Zaheer R, Noyes N, Ortega Polo R, et al (2018) Impact of sequencing depth on the characterization of the microbiome and resistome. Nat Sci Reports 8:1–11.