

TESIS DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA:

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Caracterización de bacterias endófitas productoras de sideróforos en arroz (*Oryza sativa*)

ESTUDIANTE:

Lic. Inés Loaces

LUGAR DE REALIZACION:

Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Química, UdelaR.

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ana Fernández

AGRDECIMIENTOS

A la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química y a toda su gente.

A mi tutora, Dra. Ana Fernández.

A el laboratorio de Gramíneas de EMBRAPA Agrobiología, especialmente a la Dra. Vera Baldani.

A José Terra por permitirnos tomar muestras de su ensayo en la estación experimental Paso la Laguna de INIA Treita y Tres.

A Stella Ávila por proporcionarnos los hongos.

A Silvana Vero por el CAS y por ayudarme con los ensayos de antagonismo.

A CSIC por financiar este trabajo y a la ANII por las becas.

Y a todos los que de alguna manera colaboraron con la realización de esta tesis.

RESUMEN

El cultivo de arroz es uno de los rubros principales en nuestra producción agropecuaria. Tiene alto impacto económico y ambiental, representa una fracción importante de suelo cultivado y consume la mayor cantidad de agua para riego en el territorio nacional.

Para mejorar la competitividad en el mercado internacional Uruguay apunta a obtener un producto de excelente calidad en un proceso productivo que aumente el rendimiento y minimice la contaminación ambiental. La estandarización de patrones de calidad, la obtención de nuevos cultivares y un manejo de cultivo apropiado para reducir los insumos, especialmente los agroquímicos como fertilizantes y pesticidas, son herramientas fundamentales para alcanzar esta meta. Estos objetivos ameritan el desarrollo de nuevas biotecnologías.

Las bacterias nativas asociadas al cultivo constituyen una fuente de recursos factible de ser explotada en este desarrollo. El conocimiento sobre la interacción entre las bacterias endófitas y la planta o entre ellas y otros microorganismos benéficos o patógenos permite avanzar en estos objetivos.

En estudios anteriores se determinó que las hojas de arroz cultivado en Uruguay están colonizadas por un núcleo constante de bacterias constituido por los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Curtobacterium*; siendo *Pantoea ananatis* la especie dominante. Asimismo, se encontró que la mayoría de los aislamientos obtenidos producía sideróforos.

En el presente trabajo se plantea caracterizar las bacterias endófitas productoras de sideróforos presentes en hojas, raíces y granos de arroz cultivado en Uruguay y verificar la presencia de *P. Ananatis* durante el desarrollo de la planta. Se pretende determinar la dinámica de estas poblaciones y sus propiedades agronómicas y de competencia frente a microorganismos patógenos o promotores de crecimiento vegetal.

Índice	
RESUMEN	3
I. INTRODUCCION.....	6
1.1 Antecedentes.....	7
1.2 Cultivo de arroz.....	9
1.2.1 Desafíos del cultivo.....	9
1.2.2 Fisiología del cultivo.....	12
1.2.3 Cultivo de arroz en Uruguay.....	14
1.3 Bacterias endófitas.....	19
1.3.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	21
1.3.2 Producción de sideróforos.....	26
OBJETIVO	30
Objetivos específicos	30
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 Ensayo de campo y muestreos.....	32
2.2 Recuento, aislamiento y caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias endófitas productoras de sideróforos.....	33
2.2.1 Recuento de cepas endófitas.....	33
2.2.2 Caracterización primaria. Prueba OF y oxidasa.....	33
2.2.3 Determinación de compuestos indólicos.....	34
2.2.4 Ensayo de reducción de acetileno, ARA.....	35
2.2.5 Antagonismo de hongos patógenos.....	35
2.2.6 Ensayos de competencia entre cepas endófitas y cepas PGP.....	36
2.3 Identificación y caracterización molecular de las cepas aisladas.....	38
2.3.1 Extracción de ADN.....	38
2.3.2 Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA.....	38
2.3.3 Análisis de la restricción del gen 16S rDNA.....	39
2.3.4. Fingerprinting BOX-PCR.....	40
2.4 Análisis estadístico de los recuentos.....	41
III. RESULTADOS.....	42
3.1 Abundancia y caracterización de bacterias endófitas cultivables aisladas durante el ciclo del cultivo de arroz.....	43
3.1.1 Abundancia de endófitos cultivables.	43
3.1.2 Características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos.	45
3.2 Diversidad molecular de los aislamientos productores de sideróforos.	48
3.2.1 Análisis de la restricción del gen 16S rDNA.....	48
3.3 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal.	58
3.3.1 Producción de IAA.	59
3.3.2 Reducción de acetileno.	60
3.3.3 Producción de sideróforos.	60
3.4 Antagonismo frente a hongos fitopatógenos.	61

3.5 Inhibición de PGPB.	63
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	65
4.1 Abundancia de bacterias endófitas cultivables aisladas durante el cultivo de arroz.	67
4.2 Diversidad molecular de los aislamientos.	67
4.3 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal y antagonistas de bacterias endófitas aisladas de arroz.....	71
Conclusiones:	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
IV. ANEXOS.....	92
ANEXO 1.....	93
ENSAYOS DE INOCULACIÓN Y CO- INOCULACIÓN.....	93
RESUMEN.....	94
1.1 Bacterias utilizadas en inoculantes biológicos.....	96
1.2 Interacción entre PGPB y bacterias nativas endófitas del cultivo de arroz.....	97
II.MATERIALES Y METODOS.....	99
2.1 Diseño del ensayo de invernáculo.....	100
2.2 Recuperación y recuento de cepas inoculadas y asociadas.	101
III. RESULTADOS.....	103
3.1 Tasa de germinación.....	104
3.1 Recuperación de bacterias inoculadas.	104
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	112
4.1 Recuperación y recuento de bacterias inoculadas.....	113
4.2 Biomasa de parte aérea y rendimiento del cultivo.....	113
ANEXO 2.....	115
ANEXO 3.....	128

I. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes.

Al igual que en el resto del mundo en nuestro país se han realizado varios trabajos buscando conocer las poblaciones bacterianas asociadas al cultivo de arroz. Canzani *et al.* (1998) encontraron bacterias fijadoras de nitrógeno en muestras de rizósfera de arroz (en la mayoría de los casos en números elevados), en muestras del interior del grano y en la mayoría de las muestras de parte interna de hoja. Estos autores determinaron que el número de bacterias diazotróficas detectadas difiere entre variedades y entre estadios de desarrollo de las plantas.

Se ha demostrado, en ensayos de inoculación con bacterias endófitas de arroz aisladas en medios semisólidos sin nitrógeno, que existe un potencial de respuesta en arroz en cámara de crecimiento e invernáculo, tanto en parte aérea como raíz. Este potencial de respuesta se asocia a la variedad y a la fertilización nitrogenada del cultivo (Labandera *et al.* 2004).

Sin embargo, la colonización de la planta de arroz no se restringe a las bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Estas son una fracción menor del total de endófitas encontradas en raíces y tallos, en distintas etapas de crecimiento del cultivo y para distintas variedades (Barraquío *et al.* 1997).

En estudios preliminares se estudió la comunidad total de bacterias endófitas de arroz en las cosechas de los años 2005 y 2006 en ensayos implementados en la Estación Experimental Paso la Laguna de INIA Treinta y Tres. Se realizaron aislamientos de endófitos de hoja y tallos de tres variedades (INIA- Tacuarí, INIA- Olimar y El Paso144) cultivadas en Uruguay (Fernandez Mañay, 2005). Dentro de los resultados se destaca que la proporción de bacterias endófitas fijadoras de N es baja respecto al número de bacterias heterótrofas

aerobias totales contadas y que una alta proporción de los aislamientos obtenidos tiene la capacidad de sintetizar sideróforos.

De los aislamientos obtenidos se seleccionaron 97, que fueron predominantes y ubicuos, para estudiar sus propiedades en mayor profundidad. Estos aislamientos se agruparon en 45 perfiles ARDRA diferentes; y se identificaron 16 de ellos por secuenciación del gen 16S rDNA. Los perfiles mayoritarios pertenecen a los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Curtobacterium* y *Xanthomonas*. La especie *Pantoea ananatis* se encontró en alto número, consistentemente en todas las réplicas de todos los tratamientos analizados.

En base a estos resultados es que se plantea estudiar la comunidad de bacterias endófitas asociadas al cultivo de arroz en Uruguay, estudiando la dinámica durante el desarrollo del cultivo e intentando establecer si existen otras cualidades que determinan la asociación con la planta, haciendo principal hincapié en las bacterias endófitas productoras de sideróforos y las cepas de *Pantoea ananatis*, ya que se suponen colonizadores “exitosos” en las variedades uruguayas de arroz.

1.2 Cultivo de arroz.

El arroz es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas. Existen 19 especies, siendo el arroz común (*Oryza sativa* L.) la especie más importante para la alimentación humana. Su cultivo comenzó hace unos 10.000 años en regiones húmedas de Asia tropical y subtropical.

El arroz es el alimento básico para la mitad de la población mundial; se considera el más importante del mundo por la extensión de la superficie en que se cultiva y la cantidad de personas que dependen de su cosecha (FAO, 2004).

El cultivo de arroz es uno de los recursos agronómicos más importantes en Uruguay: su producción aumentó 347.745 toneladas en el periodo 2001-2009 (Méndez, 2009), alcanzando una superficie sembrada en todo el país de 160,7 miles de hectáreas con una producción promedio de 8.012 Kg/ ha.

1.2.1 Desafíos del cultivo.

Según Nguyen, especialista de la FAO en arroz y secretario de la Comisión del Año Internacional del Arroz, el aumento de la población mundial, la cual se prevé que pasará de 6.200 millones de personas en 2004 a más de 8.000 millones en 2030, podría requerir un incremento en la producción de arroz (FAO, 2004).

El crecimiento demográfico se dará principalmente en las zonas urbanas, cuya demanda de arroz aumentará, así como el consumo de recursos destinados a la producción de este cereal, sobre todo el agua. La urbanización además afectará la distribución y la comercialización del arroz, y hace surgir comercios que venden a precios económicos y cadenas de supermercados que ejercen presiones sobre la agricultura para cumplir con normas más altas de calidad e inocuidad y reducir los costos.

Según Nguyen, se requiere un incremento de las cosechas, por temporada y por unidad de superficie, a fin de reducir los costos e incrementar la producción, y así dar competitividad económica a la producción de este cereal. Una opción es el uso de semillas de arroz híbrido, originalmente cultivado con fines comerciales en China en el decenio de 1970, y que produce por lo menos el 20 por ciento más que las variedades normales de elevada producción. Los "super híbridos" de reciente creación han incrementado la producción otro 20 por ciento.

La eficacia en la producción del arroz también puede elevarse mediante una gestión mejorada de los cultivos. Estudios recientes (FAO, 2008) indican que las variedades no son la principal limitación para obtener una producción más abundante: las variedades que actualmente existen pueden producir más de 10 toneladas de arroz por hectárea, pero los agricultores están explotando menos del 50 por ciento de ese potencial. Los estudios también revelan que es posible obtener mejores cosechas en entornos más favorables, para ello se recomienda un mejor aprovechamiento de los fertilizantes que favorecen el cuidado del suelo y de los recursos utilizados.

El nivel de nitrógeno (N) afecta la productividad de la planta de arroz, forma parte de todas las proteínas y de muchos componentes no proteicos, siendo el nutriente que más influye en los rendimientos del cultivo y un factor limitante de la producción (CIAT, 1982). Se requiere N en todo el periodo de crecimiento, pero la mayor necesidad se presenta entre el inicio y mediados del macollaje y al inicio de la formación de la panoja (Dobermann, *et al.* 2000).

Los resultados de 10 años de ensayos en campos de productores en Argentina muestran que la fertilización nitrogenada aumenta los rendimientos en más del 70% de los casos, mientras que el agregado de fósforo o de potasio sólo aumenta el rendimiento en el 35% y 20% de los sitios, respectivamente (Batista 2002).

Pero la fertilización nitrogenada tiene desventajas que incluyen elevado costo, la polución que se produce durante su fabricación y la emisión de gases causantes de efecto invernadero que se producen después de su aplicación (Stoltzfus, *et al.* 1997).

Los beneficios económicos directos obtenidos por la sustitución de la fertilización con N, muy dependientes del precio del petróleo, son evidentes. A su vez, las ventajas de una producción amigable con el medioambiente no sólo son importantes en términos de responsabilidad con el planeta sino también que contribuyen indirectamente a la estrategia exportadora del Uruguay que se basa en al búsqueda de nuevos mercados que tienen como exigencia la producción con bajos niveles de contaminación.

Las enfermedades también constituyen los factores que inciden en la obtención de bajos rendimientos y en la calidad de los granos. Existen numerosas enfermedades que afectan al cultivo de arroz en el mundo y que están extendidas, por lo general, por todos los países productores del cereal (Rives *et al.* 2007). Las enfermedades de origen fúngico son las más comunes y causan los daños más severos. En nuestro país las más frecuentes son la podredumbre del tallo causada por *Sclerotium oryzae* y el manchado confluyente de las vainas, cuyo agente causante es *Rhizoctonia oryzae sativae* (ROS). Ambos patógenos presentan estrategias similares de sobrevivencia. Los esclerocios (estructuras de resistencia) sobreviven el invierno de forma libre o asociados a residuos vegetales. Al año siguiente, cuando el campo es inundado, dichos esclerocios flotan en la superficie y proveen la fuente de inóculo primaria que infecta a las plantas jóvenes cuando las condiciones ambientales son favorables (Beldarain & Ávila, 2002).

1.2.2 Fisiología del cultivo.

El desarrollo de la planta de arroz se divide en tres etapas: vegetativa, reproductiva y maduración.

La primera etapa va desde la germinación de la semilla al macollaje y es posible subdividirla en 2: fase vegetativa básica y fase vegetativa sensible al fotoperiodo. La emisión de los macollos y la diferenciación de las hojas se dan en esta etapa. El macollaje comienza cuando la plántula está establecida y generalmente termina cuando se inicia el desarrollo del primordio floral (inicio de fase reproductiva). El número de macollos depende de la densidad de plantas, puede variar de 3 -en alta densidad- hasta 15 macollos en bajas densidades (Olmos, 2007).

La fase reproductiva, incluye el período desde la formación del primordio floral , hasta la emergencia de la panícula (floración). Esta fase dura entre 35 y 40 días. Normalmente la duración de la fase reproductiva, en las variedades cultivadas, varía muy poco. En esta fase se determina el número de granos por panícula, que es también uno de los componentes de rendimiento. La panícula joven es visible al ojo como una estructura cónica, plumosa, de 0,5 a 1,5mm cerca de 10 días después de su diferenciación. Se encuentra envuelta por la vaina de las hojas (dentro del tallo). La elongación de los entrenudos se inicia con la diferenciación de la panícula y ocurre sólo en los cuatro últimos entrenudos. La elongación del último entrenudo determina la emergencia de la panícula y da inicio al período de floración, en el que ocurren los procesos de apertura de flores, polinización y fertilización (Olmos, 2007).

El intervalo entre la iniciación y la emisión de la panícula es la fase más vulnerable del ciclo de la planta, donde exhibe la máxima sensibilidad a los factores ambientales.

La maduración de la planta de arroz ocurre entre la floración y la maduración de los granos, dura de 30 a 35 días y se divide en estadio de grano lechoso, ceroso y maduro.

El proceso de crecimiento de la planta presenta variaciones en la absorción de nutrientes y en el metabolismo durante las diferentes etapas. En la etapa vegetativa, los nutrientes (incluidos N, P, K y S) se absorben activamente, mientras se producen los fotoasimilados y se sintetizan las proteínas de forma de sustentar los procesos de macollaje y expansión floral.

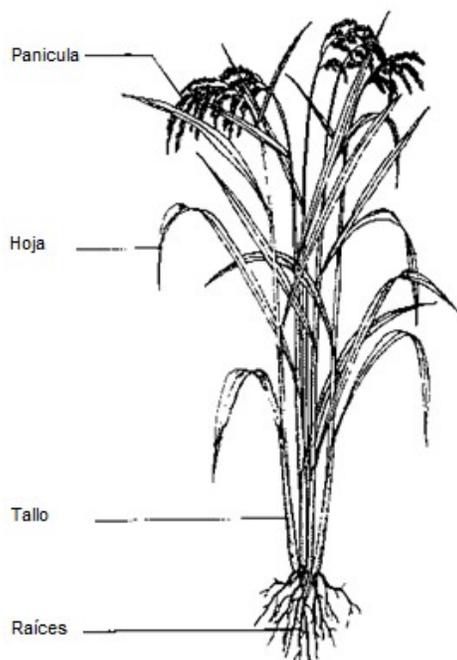


Figura 1.1 Planta de arroz madura. Tomado de <http://ipmworld.unm.edu/cancelado/Sphapters/arrozSp.htm>

Durante la etapa reproductiva, caracterizada por el desarrollo del primordio de la panícula y la elongación del tallo, los fotoasimilados son transformados en componentes de la pared celular, como lignina y celulosa y su exceso se acumula en forma de almidón. En la maduración, la morfogénesis de la planta ya se completó y el almidón se acumula en las panículas. A medida que ese proceso avanza, los carbohidratos, proteínas y minerales acumulados en las hojas se mueven hacia las panículas, y la planta (raíz y parte aérea) se torna senescente (Olmos, 2007).

1.2.3 Cultivo de arroz en Uruguay.

Uruguay tiene un clima templado subtropical húmedo con precipitaciones distribuidas a lo largo de todo el año, un tapiz vegetal casi continuo de fértiles pasturas naturales, numerosos cursos de agua distribuidos en todo el territorio, e innumerables embalses que recogen los excedentes provenientes de las copiosas lluvias, todo lo cual hace posible la producción de arroz.

La producción, muy homogénea, es realizada por grandes, medianas y pequeñas empresas agropecuarias. Su industrialización y comercialización se concentran en general en molinos de gran tamaño, aunque se debe destacar la existencia de pequeñas y medianas empresas molineras (ACA, 2010).

Dentro de los cultivos extensivos, el arroz es el que invierte más capital por hectárea, no sólo en el costo operativo del cultivo (semilla, fertilizantes, herbicidas, combustibles, mano de obra, repuestos, etcétera), sino también porque requiere altas inversiones en maquinaria y equipos, instalación de estaciones de bombeo, canales, drenajes, caminos, puentes, construcción de represas para riego,

etcétera. En la actualidad, un productor con 150 hectáreas de arroz tiene una inversión en activo fijo cercana a U\$ 200.000 (ACA, 2010).

A su vez, todo esto obliga a realizar inversiones en las etapas de postcosecha e industrialización, tales como galpones, silos, secadores y molinos. Como consecuencia, aumenta el empleo de mano de obra generando un importante impacto social y económico y permitiendo el desarrollo de pequeñas industrias y servicios colaterales que dinamizan los centros poblados de las zonas de producción.

Esto adquiere una mayor relevancia si se considera que el cultivo se ha desarrollado en departamentos donde predominaba la ganadería extensiva, sin tradición agrícola. La zona este del país (Rocha, Lavalleja, Treinta y Tres y este de Cerro Largo) abarca las planicies de la Laguna Merín y del Atlántico. Reúne más de la mitad de las tierras cultivadas con arroz en el país, formando además una superficie relativamente continua y concentrada de topografía general muy plana que cuenta con fuentes de agua muy abundantes. El centro (Rivera, Tacuarembó, oeste de Cerro Largo y norte de Durazno) comprende fundamentalmente la cuenca del Río Negro y está formada por un “mosaico” relativamente discontinuo de áreas aptas para el cultivo de arroz que en general requieren de represas para el riego. Mientras que la zona norte del territorio (Artigas y Salto) ocupa parte de la cuenca del río Cuareim y del río Uruguay. También está formada por áreas más o menos discontinuas y dispersas donde las pendientes son, en general, más pronunciadas. Como en la zona centro, el mayor porcentaje se riega desde represas (Figura 1.2). Existen además áreas menores, que ocupan zonas del litoral oeste y de la cuenca del río Negro (ACA, 2010).



Figura 1.2 Distribución de zonas arroceras en Uruguay.

Tomado de www.aca.com.uy

El cultivo de arroz en Uruguay se basa en un sistema de producción de baja intensidad, en rotaciones con pasturas e integrado con la producción ganadera. Estas características le confieren al sector arrocero la posibilidad de aprovechar estas ventajas comparativas y diferenciarse dentro de la región. En Uruguay, el 60% del cultivo se realiza sobre campo natural o diversos tipos de retorno y sólo el 40% se siembra sobre rastrojos de arroz del año anterior. Los retornos mencionados se efectúan sobre campos con varios años de descanso sin arroz o sobre praderas, rotando en un sistema de producción donde, en la mayoría de los casos, los campos pasan por lo menos cuatro años sin ser cultivados (ACA, 2010). Este sistema de producción, sumado a una alta calidad de semilla utilizada por los productores, le otorga al cultivo de arroz una alta sustentabilidad, con un bajo uso

de herbicidas y fertilizantes. Asimismo, posibilita una escasa utilización de insecticidas. Esta realidad productiva, prácticamente única en el mundo, es quizá una de las mayores fortalezas del sistema de producción uruguayo, frente a un escenario mundial que asigna creciente importancia a la conservación del ambiente y a la seguridad alimentaria (ACA, 2010).

Existen particularidades importantes referidas al arroz que lo hacen diferente a otros. Dado que el mismo se realiza con riego por inundación bajo una lámina de agua controlada, la viabilidad técnica y económica del cultivo implica disponer de superficies con una topografía lo más plana posible y suelos que presenten un mínimo de pérdidas por percolación. Por esto se realiza principalmente en terrenos de escasa pendiente, en general de 0.5 – 1.5%, con débil escurrimiento superficial y suelos con drenaje interno muy lento. El país cuenta con una red hidrográfica muy densa, pero los caudales necesarios para el riego del cultivo sólo se encuentran en la Laguna Merín y en cursos de agua importantes (ACA, 2010).

Luego de sembrar el cultivo se construyen las taipas (cordones o camellones de suelo) que son las estructuras que permitirán la retención del agua de riego sobre la superficie del suelo. La lámina de agua que se coloca sobre el suelo entre los 35 y 50 días luego de la siembra, cuando el arroz está suficientemente desarrollado, es de 10 cm en promedio y se la mantiene hasta varias semanas antes de la cosecha. El consumo de agua del cultivo se puede establecer en 12.000 m³/há. El período de riego se extiende desde diciembre a marzo, con una duración promedio de 100 días.

Las variedades de arroz liberadas por el programa de mejoramiento, desarrollado por el INIA, ocupan la casi totalidad del área cultivada del país. Las variedades El Paso 144 (1986) e INIA Tacuarí (1992) han ocupado en los últimos

años más de 90% del área, aportando 20% de incremento en el rendimiento sobre las variedades utilizadas anteriormente. Más recientemente se ha liberado la variedad INIA Olimar, de la cual se proyecta un importante crecimiento en área de siembra, cuyo rendimiento es 12% superior al de las mencionadas anteriormente. Esto es complementado con un programa de producción de semillas básicas y mantenimiento varietal que abastece al sector semillero (Blanco, 2008).

El cultivo se fertiliza con nitrógeno y fósforo previo a la siembra y durante el ciclo se realizan una o dos aplicaciones aéreas de urea como fuente de nitrógeno. La mayor demanda de mano de obra se produce en la siembra, en las etapas inmediatamente posteriores (que corresponden a la iniciación del riego y la corrección de las imperfecciones que se produjeron en la construcción de “taipas” y “rondas”) y en la cosecha (ACA, 2010).

1.3 Bacterias endófitas.

El término endófitas, introducido por Kloepper *et al.* en 1992, hace referencia a los microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas (“endo”, dentro; “fito”, planta). En agronomía, este concepto involucra todas las bacterias que pueden ser aisladas de plantas cuyos tejidos fueron esterilizados superficialmente y que no generan una enfermedad visible en su planta hospedera (Hallmann *et al.* 1997). Según su estrategia de vida, las bacterias endófitas pueden clasificarse en obligadas o facultativas. Las últimas tienen un estadio de su vida en el cual están fuera de la planta. Su ciclo de vida puede clasificarse como bifásico, alternando entre la planta y el ambiente (por lo general el suelo). La gran mayoría de los microorganismos capaces de ingresar a las plantas probablemente tienen ciclos de vida bifásicos. En cambio, los endófitos obligados dependen de la planta hospedera para su crecimiento, y sobrevivencia y su transmisión a otras plantas se da de forma vertical o vía vectores (Hardoim *et al.* 2008). Son bacterias que colonizan nichos específicos en el interior de los tejidos de las plantas, permaneciendo protegidas de variaciones ambientales y con fuentes de carbono más disponibles, ya que existe menor competencia por los nutrientes.

En el proceso de colonización, la comunicación entre la planta y la bacteria (y viceversa) cumple un rol clave (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006). La colonización de las raíces por las bacterias comienza con el reconocimiento de compuestos específicos en los exudados de las plantas. Estos compuestos probablemente también tengan un rol en las interacciones de la población bacteriana del suelo.

Teóricamente, las plantas se comunican simultáneamente con microorganismos comensalistas, mutualistas, simbióticos y patógenos vía compuestos exudados por sus raíces (Bais *et al.* 2006). Sin embargo, se cree que

se limitan a algunos tejidos de la planta particulares (por ejemplo, el cortex radicular). Se propone que los endofitos competentes (amarillos) poseen todas las propiedades de los endofitos oportunistas, y, además, la maquinaria clave genética necesaria para colonizar, por lo que son capaces de invadir tejidos vegetales específicos, como tejidos vasculares, extendiéndose por toda la planta y, mediante la manipulación del metabolismo de la planta, mantener un equilibrio armonioso con la planta huésped, incluso cuando están presentes en alta densidad. Tomada de Hardoim *et al.* 2008.

Al igual que las bacterias seleccionadas en la rizósfera, las bacterias endófitas en particular también podrían ser seleccionadas para establecer su residencia dentro de las plantas (Van Overbeek, & Elsas, 2008).

El ingreso de los endófitos a la planta es pasivo (Figura 1.3) ya que la colonización se da a través de heridas en las raíces y por los estomas en las hojas. Se propagan sistemicamente colonizando los espacios intercelulares de las células de la hipodermis, del córtex radicular o en la pared celular de células del arénquima en plantas cultivadas en sistemas inundados (Guimiraes *et al.* 1999).

1.3.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB) son definidas como bacterias libres del suelo, de la rizosfera, rizoplano y endofíticas que, en determinadas condiciones, son benéficas para las plantas.

Las PGPB promueven el crecimiento vegetal directa o indirectamente. En el primer caso las bacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfato o hierro o producir fitohormonas, con lo cual se afecta el metabolismo de la planta. También se ha observado su influencia en la absorción de otros minerales,

debido a un aumento del flujo de iones en la superficie radicular en presencia de PGPB (Nelson, 2004). Los efectos indirectos se pueden observar cuando el microorganismo de interés es capaz de interactuar con un fitopatógeno y reducir así el daño al vegetal. Además, se incluyen en este grupo las bacterias capaces de aumentar la resistencia del hospedero a la infección.

Producción de fitohormonas. Las fitohormonas son fundamentales como reguladores del desarrollo de las plantas. De acuerdo a la clasificación convencional existen cinco grupos: auxinas, giberlinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico (Tsavkelova, 2006). Las fitohormonas contribuyen a la coordinación de diversos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, floración, la ramificación, macollaje y la maduración de los frutos. Son capaces de incrementar la resistencia de las plantas a factores ambientales e inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova, 2006; Agrios, 1997). Muchos microorganismos asociados a plantas son capaces de sintetizar fitohormonas, actuando como mediadores en la comunicación entre la planta hospedera y su microflora. La habilidad de sintetizar hormonas de plantas está presente principalmente en bacterias rizosféricas, epifíticas y endofíticas que actúan como PGPB (Suzuki *et al.* 2003), aunque también se han reportado bacterias de vida libre productoras de estos compuestos (Tien *et al.* 1979; White, 1987).

Las auxinas son responsables de la división, extensión y diferenciación de las células y los tejidos vegetales. En 1934 Kögl identificó el ácido-3-indol acético (IAA) como el “elemento” responsable del crecimiento de las plantas (Kögl & Kostermans, 1934). Las fitohormonas de este grupo estimulan la germinación de semillas y tubérculos, incrementan la tasa del xilema y la formación de raíces,

controlan el proceso de crecimiento vegetativo, el tropismo, la florescencia y la fructificación de las plantas. También afectan la fotosíntesis, la formación de pigmentos, la biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia a factores de estrés (Spaepen, *et al.* 2007).

El IAA (Figura 1.4) es la fitohormona que posee la mayor actividad, aunque es sabido que las plantas poseen otras auxinas estructuralmente similares al IAA, estos índoles pueden ser precursores o productos de transformación del IAA. Se han descrito las principales rutas biosintéticas en bacterias que tienen como precursor principal el triptófano y se han identificado los intermediarios de al menos cinco de esas rutas (Spaepen, *et al.* 2007). El análisis de varias especies bacterianas sintetizadoras de IAA indica que el rol de esta auxina es diverso en la interacción planta- bacteria: antes la producción de auxinas por parte de un microorganismo se asociaba con la patogénesis, específicamente con la formación de callos, sin embargo, muchas bacterias, incluyendo fitopatógenos (no sólo los formadores de callos) así como también las PGPB tienen la habilidad de sintetizar IAA.

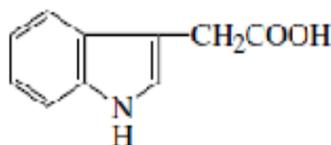


Figura 1.4. Estructura química del ácido indol-3-acético.

Fijación biológica de Nitrógeno. A pesar de la abundancia de N_2 en la atmósfera terrestre, los organismos que pertenecen al grupo de los eucariotas (plantas y animales) no consiguen utilizar este elemento directamente. Apenas una porción de los organismos del grupo de los procariotas pueden reducir enzimáticamente el

nitrógeno de la atmósfera a amonio, el cual puede ser incorporado para el crecimiento y mantenimiento de las células. Estos organismos son denominados diazótrofos y el mecanismo responsable de la incorporación de N a la biomasa es llamado fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Entre los organismos diazotrófos hay muchos heterótrofos, es decir que necesitan un suplemento de carbono reducido. La fuente de C depende indirectamente de la energía de la luz, y allí distinguimos organismos que requieren simbiosis con un hospedero eucariota, de aquellos de vida libre que compiten con otros organismos por la materia orgánica disponible en el ambiente. Otros son autótrofos, los cuales pueden reducir el CO₂ en presencia de luz. En general, ya fueron descritas especies representantes de varios grupos de procariotas que fijan nitrógeno, tales como: bacterias fotosintéticas (*Rhodospirillum rubrum*) y cianobacterias, bacterias anaeróbicas (ej.: *Clostridium spp.*), microaerófilas (ej.: *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.*, *Burkholderia spp.*, etc), bacterias aerobias (ej.: *Azotobacter spp.* y *Derxia spp.*) y también algunos representantes de los actinomicetes (*Frankia*) (Marin *et al.* 1998).

Según Evans & Burris (1992, citado en Marin *et al.* 1998), podemos caracterizar tres grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno: diazótrofos de vida libre, que fijan el nitrógeno para su propio uso; diazótrofos asociativos, que contribuyen al crecimiento de las plantas sin formar estructuras diferenciadas, sin establecer una simbiosis y los diazótrofos simbióticos, que establecen una interacción muy estrecha con el macrosimbionte, y que en algunos casos, forman estructuras diferenciadas denominadas nódulos.

Algunos microorganismos que pueden fijar nitrógeno atmosférico son de gran importancia para el suministro de N al cultivo de arroz en condiciones sumergidas. Los procesos microbianos de importancia para la FBN se favorecen

en suelos inundados de arroz debido a la disponibilidad de humedad suficiente en casi todo el periodo de crecimiento del cultivo, el pH cercano a la neutralidad y la baja disponibilidad de oxígeno. La situación existente en los ecosistemas inundados del suelo de arroz ofrece las condiciones propicias que facilitan la actividad de variedad de microorganismos que pertenecen a grupos aeróbicos, microaerofílicos, anaerobios facultativos y obligados. Al mismo tiempo, los suelos inundados también promueven muchos de los procesos químicos y biológicos que conducen a la pérdida de nitrógeno. Las pérdidas relativas de nitrógeno se producen con regularidad desde el suelo a través de procesos microbianos como la nitrificación- desnitrificación, además de la lixiviación, la volatilización, erosión del suelo y otros procesos naturales (Rao *et al.* 1998).

Antagonismo de hongos patógenos. La colonización y retención de nichos en la rizósfera por PGPB involucra la producción de aleloquímicos bacterianos, incluyendo sideróforos quelantes de hierro, antibióticos, biocidas volátiles, enzimas líticas y enzimas de desintoxicación.

La antibiosis es el mecanismo mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a otro organismo por medio de la producción de pequeñas moléculas tóxicas y de enzimas líticas que dañan sus paredes. En la antibiosis no se requiere el contacto entre el microorganismo antagonista y el patógeno y el poder antagónico es proporcional al nivel de productos metabólicos. El mecanismo de control de hongos mediante antibiosis es bastante conocido y ya se han descrito una gran variedad de antibióticos sintetizados por variados grupos bacterianos (Compant *et al.* 2005).

Por otro lado, se ha descrito una gran variedad de microorganismos que atacan patógenos por excreción de enzimas hidrolíticas de la pared celular.

1.3.2 Producción de sideróforos

El hierro es un elemento ubicuo en casi todos los ambientes. En el periodo del origen de la vida, el hierro estaba disponible en su forma soluble debido a las condiciones reductoras de la atmósfera. De hecho, la abundancia del hierro podría haber llevado a que forme parte de un amplio rango de reacciones metabólicas y funciones fisiológicas tales como la cadena respiratoria y el transporte del oxígeno (Chincholkar *et al.* 2007). La liberación del oxígeno durante las reacciones fotosintéticas con la consiguiente formación de una atmósfera oxidativa tornó poco insoluble el hierro. La solubilidad del hierro bajo condiciones aeróbicas es menor a 10^{-38} M a pH fisiológico (Castignetti & Smarrelli, 1986). De todos modos el hierro es indispensable para la vida. Las plantas siendo autolitótrofas desarrollaron varios mecanismos para captar hierro insoluble de la rizósfera. Uno de los mecanismos que poseen las no-gramíneas monocotiledoneas y todas las dicotiledoneas, consiste en la formación de un ambiente reductor localizado en la rizosfera gracias a la liberación de protones (en forma de ácidos orgánicos) complementado con reductasas asociadas a la membrana. Un mecanismo especializado para la captación del hierro se observa en las gramíneas las cuales, vía las raíces, liberan aminoácidos, quelantes de hierro, no proteicos, llamados fitosideróforos (como el ácido mugineico de la cebada, el ácido disticónico de la cebada de cerveza, el ácido avénico A de la avena entre otros) (Chincholkar *et al.* 2007).

Los microorganismos están en íntimo contacto con el ambiente y por lo tanto se ven afectados directamente por los cambios en este. En condiciones normales, el hierro libre es escaso debido a su rápida oxidación y la consiguiente formación de hidróxidos insolubles. Por esto las bacterias han tenido que desarrollar mecanismos eficientes de captación de hierro con el fin de garantizar un suministro suficiente. Estos mecanismos involucran generalmente proteínas

receptoras que residen en los distintos compartimentos de la envoltura celular bacteriana, las cuales se unen específicamente y/o trasladan una amplia gama de moléculas que contienen hierro (Faraldo, 2007). Para muchos patógenos estos ligandos pueden ser proteínas de unión a hierro que el huésped utiliza para mantener el hierro en solución, u otras proteínas pequeñas que capturan grupos hemo. Alternativamente, las bacterias y otros microorganismos pueden sintetizar, excretar y finalmente reabsorber compuestos de bajo peso molecular quelantes de hierro denominados sideróforos (Crowel *et al.* 1991), los cuales son capaces de superar las barreras termodinámicas y cinéticas involucradas en el secuestro y la movilización del hierro (Chincholkar *et al.* 2007).

Químicamente los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular quelantes de metales secretados por microorganismos creciendo en condiciones de bajo hierro (Lankford, 1973, citado en Chincholkar *et al.* 2007). Varios factores ambientales pueden modular la síntesis de sideróforos, incluyendo el pH, los niveles de hierro y sus formas químicas, la presencia de otros elementos traza y una adecuada fuente de carbono, nitrógeno y fósforo (Compant *et al.* 2005).

Uno de los principales factores involucrados en el mejor crecimiento vegetal es la “nutrición del hierro” que es revelado en varios factores del crecimiento. La evidencia también sugiere que las plantas tienen la habilidad de aceptar el hierro derivado de los complejos sideróforo bacteriano-hierro (Chincholkar *et al.* 2007b).

Las prácticas modernas para la supresión de fitopatógenos están basadas principalmente en el uso de pesticidas sintéticos. Se ha demostrado que estos pesticidas químicos causan deterioro ambiental y que se incorporan en la cadena alimenticia teniendo efectos negativos en micro y macroorganismos e incluso en la salud humana (Chincholkar *et al.* 2000). Es por esto que existe una demanda creciente de alternativas a estas prácticas de control por lo que el control biológico

está ganando atención sobre los agentes químicos. Estos ofrecen una alternativa para reducir las enfermedades de las plantas sin los efectos negativos de los pesticidas.

El control biológico involucra el uso de un microorganismo o un consorcio de organismos que producen metabolitos secundarios y son capaces de inhibir a los fitopatógenos reduciendo la ocurrencia de la enfermedad vegetal. Kloepper *et al.* (1980) fueron los primeros en demostrar la importancia de los sideróforos en el biocontrol. La baja solubilidad del hierro en un medio acuoso aeróbico genera una gran competencia por este nutriente (Chincholkar *et al.* 2007b). Un buen agente de control biológico produce sideróforos fuertes, que sean capaces de quelar el hierro presente en la rizósfera de manera competitiva y ser capaz a su vez de utilizar complejos sideróforo-hierro heterólogos, limitando así aun más el acceso de los fitopatógenos a este nutriente. A su vez la producción de sideróforos puede promover la resistencia sistémica inducida (ISR) y así puede jugar un papel doble en la supresión de la enfermedad por privación de hierro a los patógenos localmente y por inducción de resistencia en la planta (Höfte *et al.* 2007).

Los sideróforos producidos por cepas de *Pseudomonas* spp. han recibido gran atención ya que se postula que están involucrados no sólo en la sobrevivencia de estas cepas en sus hábitats naturales en condiciones de escaso hierro si no también debido a su papel en el control biológico de enfermedades de plantas (Mercado-Blanco *et al.* 2007). Las pioverdinas (o pseudobactinas) son la clase prevalente de sideróforos producidos por cepas de *Pseudomonas*. Además de estas moléculas, algunas cepas benéficas para plantas pueden producir otras clases de sideróforos (Mercado-Blanco *et al.* 2001), incluidos en ácido salicílico, el cual es precursor o intermediario en la síntesis de sideróforos como piochelina y el ácido dihidroaerugénico en *P. aeruginosa* o pseudomonina en *P. fluorescens* (Mercado-Blanco *et al.* 2007). Se ha visto la producción de ácido salicílico en

condiciones de bajo hierro para cepas de *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Azospirillum lipoferum*, y *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (Mercado-Blanco *et al.* 2001).

OBJETIVO

Caracterizar la comunidad de bacterias cultivables endófitas productoras de sideróforos.

Objetivos específicos

- 1- Estudiar la dinámica y distribución de la población de bacterias endófitas productoras de sideróforos predominantes durante el desarrollo de la planta, verificando si *Pantoea* sigue siendo el género dominante.
- 2- Determinar la diversidad genética de bacterias endófitas productoras de sideróforos de la especie *Pantoea ananatis*.
- 3- Determinar la producción de IAA, la reducción de acetileno y la capacidad antagonista de las bacterias endófitas productoras de sideróforos.
- 4- Estudiar la competencia entre cepas de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* y las bacterias endófitas productoras de sideróforos aisladas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ensayo de campo y muestreos.

Durante la zafra 2008- 2009 se llevaron a cabo en la Estación Experimental Paso de La Laguna, del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Treinta y Tres, los ensayos de campo de los cuales se obtuvieron las plantas necesarias para los muestreos. El suelo consistía en un Brunosol Subéutrico Lúvico de 3 años de descanso, en el cual se instaló raigrás sembrado al voleo en marzo de 2008 como cobertura del suelo durante el invierno (Terra, 2009). La siembra de arroz (*Oryza sativa* Tipo Indica var. INIA Olimar) se realizó el 13 de octubre, sin fertilización nitrogenada, y la inundación el 15 de noviembre de 2008. En la Tabla 2.1 se muestran las características del suelo al momento de la siembra del recubrimiento invernal.

Tabla 2.1. Análisis químico del suelo (0-15-cm) previo a la instalación de los cultivos de cobertura sobre el laboreo de verano. Tomado de Resultados experimentales 2008-2009 –ARROZ, INIA Treinta y Tres, Estación experimental del Este (Terra, 2009).

pH(H ₂ O)	C. Org (%)	N total (%)	P Bray I (µgP/g)	K int (meq/100g)
5,4 ±0,17	1,90 ±0,17	0,17 ±0,01	14,6 ±4,8	0,27 ±0,01

Se colectaron plantas en cuatro momentos del desarrollo del cultivo: macollaje (M, 36 días post siembra, DPS), inundación (I, 60 DPS), embarrigado (E, 102 DPS) y llenado de grano (LL, 144 DPS). De cuatro parcelas diferentes, elegidas en un diseño de bloques al azar, se tomaron cuatro plantas de cada parcela, con las cuales se hizo un pool. Se analizó cada parcela por separado. Se muestrearon raíces y hojas en los cuatro estadíos, y granos siete meses después de la cosecha. También se tomaron muestras de suelo en la etapa de macollaje y llenado de grano. Las muestras se transportaron el mismo día que fueron tomadas

hacia el laboratorio de Microbiología de Facultad de Química y una vez allí se conservaron a 4°C hasta su procesamiento 12hs después.

2.2 Recuento, aislamiento y caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias endófitas productoras de sideróforos.

2.2.1 Recuento de cepas endófitas.

Después de retirar el exceso de tierra bajo agua corriente, se desinfectaron superficialmente 5g de cada tejido mediante 2 lavados sucesivos con 100ml de una solución 5% de hipoclorito de sodio con agitación durante 5 minutos. Mediante lavados ulteriores con agua destilada estéril se retiró el exceso de desinfectante. Se realizó el macerado de los tejidos en mortero esterilizado y el producto se suspendió en 45 ml de suero fisiológico. Se sembraron superficialmente diluciones sucesivas en R2A (Difco) para el recuento y aislamiento de heterótrofos totales y para el aislamiento y recuento de productores de sideróforos en medio CAS-R2A (modificado de Schwyn *et al.* 1987). En las diluciones mayores de ambos medios de cultivo se seleccionaron colonias con morfología diferente. Del medio CAS-R2A se recuperaron todas las productoras de sideróforos. Del medio R2A se recuperaron las dominantes y las de morfología típica de *Pantoea*, aunque no fueran dominantes. Se utilizó R2A como medio genérico para la conservación y mantenimiento de los cultivos frescos de bacterias.

2.2.2 Caracterización primaria. Prueba OF y oxidasa.

Los más de 200 aislamientos obtenidos se sembraron en placas de CAS-R2A, se midió el halo de producción de sideróforos formado alrededor de la

colonia y se clasificaron las cepas en tres categorías según el tamaño del halo: - sin halo, + halo de 1 a 3mm, ++ de 3 a 6mm, +++ más de 6mm de halo.

Todas las cepas fueron evaluadas en su capacidad de fermentar u oxidar glucosa en tubos de 5ml de OF (medio Hugg-Leifson O/F, Difco, con 1% de glucosa); clasificándolas en fermentadoras, oxidadoras o no cambio según su respuesta a esta prueba después de su incubación durante 24hs a 30°C. Para las cepas fermentadoras de glucosa se evaluó además si fermentaban maltosa mediante el mismo ensayo con maltosa como único azúcar. Esto permite diferenciar las especies de *P. ananatis* (fermentadoras de maltosa) y *P. agglomerans* (no fermentadoras de maltosa).

A las cepas oxidadoras de glucosa y las que no mostraron cambio se les realizó la prueba oxidasa utilizando el reactivo dimetil-p-fenilendiamina con el fin de obtener más información sobre las mismas.

2.2.3 Determinación de compuestos indólicos.

Las cepas se incubaron en 5ml de medio Trp (modificado de Glikmann, 1984, anexo 2) a 30°C, hasta alcanzar valores de densidad óptica a 600nm de 0.5-1 (aproximadamente 12 hs.). Se centrifugaron las células y se conservó el sobrenadante. Para la cuantificación de ácido indol acético (IAA) se agregó 1ml de reactivo colorimétrico PC: FeCl₃, 12g/l y H₂SO₄, 7.9M a 1ml de sobrenadante (Glikmann, 1984). Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 530nm. Los ensayos se hicieron por duplicado. Se corrigió la producción de indoles según la medida de biomasa (densidad óptica a 600nm) para cada cepa. Se realizó una curva estándar a partir de IAA (Sigma) y se calculó la cantidad de indoles producido como mg de IAA/ml. DO de cultivo.

2.2.4 Ensayo de reducción de acetileno, ARA.

Se evaluó la capacidad de fijar nitrógeno mediante la reducción de acetileno (ARA) en medio NFb carente de nitrógeno. Se inocularon viales de vidrio con 5 ml de medio semisólido, se incubaron durante 48 hs a 30° C. Luego se taparon los viales con septa de goma y precinto, se inyectó acetileno (AGA, 99,95% de pureza) mediante jeringa de plástico con válvula gas-tight hasta alcanzar una concentración final de 10% v/v en el headspace. Se incubó nuevamente a 30° C y se evaluó la producción de etileno a las 24 hs y a los cinco días de incubación mediante cromatografía gaseosa. El etileno y acetileno se midieron en un equipo (SRI 8610, Ca, USA) con detector de ionización de llama y con una columna Porapak R (80/100 mesh, 6 feet x 1/8 inch, Supelco, USA) mantenida a 45° C utilizando N₂ como gas carrier. Como control positivo se usó la cepa 245 de *A. brasilense*. Todas las cepas se evaluaron por duplicado. Se tomaron como positivas las áreas 10% mayores que el nivel basal de controles con acetileno no inoculados.

2.2.5 Antagonismo de hongos patógenos.

Se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento de los hongos *Rhizoctonia oryzae* y *Sclerotium oryzae* en medio Waksman agar según Berg *et al.* 2002, utilizando Bacto peptona (Difco) en sustitución de Peptona proteasa (Merck). Los hongos se sembraron en placas de PDA y se incubaron por 3 días. El inóculo consistió en discos de agar tomados de esas placas con tips estériles. A su vez los cultivos bacterianos se realizaron en medio TSB crecidos hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 600nm. En cada placa de Waksman agar

se ensayaron una cepa bacteriana, sembrada en estría con tip estéril y un hongo, sembrados a igual distancia del centro de la placa. Las placas se incubaron durante 5 días a 20° C y se midió el porcentaje de inhibición GI, como $[(Kr - r1)/Kr] \times 100 = GI$, donde Kr representa el crecimiento del micelio (medido en mm) desde el punto de inoculación al margen de colonia en dirección opuesta a la estría de la bacteria potencialmente antagonista, r1 el crecimiento del micelio del hongo desde el punto de inoculación hacia la bacteria antagonista (Alvindhia *et al.* 2009). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las cepas de hongos (*R. oryzae* y *S. oryzae*) se conservaron en Potato Dextrosa Agar (PDA).

2.2.6 Ensayos de competencia entre cepas endófitas y cepas PGP.

Luego de la evaluación de diferentes medios (Tabla 2.2) se diseñó el medio NFbl para los ensayos de competencia. Este medio modificado permitía el crecimiento adecuado tanto de cepas de *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, y *Herbaspirillum seropedicae*, como de las cepas de *Pantoea*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* aisladas en este trabajo. Se agregó 1ml de 0,5% Cloruro de trifenil tetrazolio por 100ml de medio para visualizar mejor el crecimiento del cultivo cuya sensibilidad se iba a testar, el cual se sembró incorporado en el agar.

Los inóculos se prepararon con cultivos de 12hs en medio NFbl líquido. Se calculó la cantidad de microorganismos utilizando la escala Mc. Farland y se diluyó con medio estéril para que los inóculos a ensayar tuvieran igual concentración de células en el medio a sembrar.

Se realizó siembra incorporada para la cepa contra la cual se buscaba determinar inhibición, (*A. brasilense* Az39 o *H. seropedicae* Z94) en una concentración final de 10^5 ufc/ml, mientras que se estriaron 10 μ l de la cepa

potencialmente inhibidora en una concentración de 10^5 ufc/ml en una estría de 5cm de largo. Se incubaron las placas a 30°C durante 48 horas. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se realizaron recuentos de viables en paralelo a los ensayos para verificar la cantidad de células inoculadas.

Tabla 2.2. Composición de medios evaluados para ensayar la capacidad inhibidora de cepas endófitas de arroz frente *A. basilense* y *H. seropedicae*.

Componentes (g/l)	NFb **	JNFb**	LGI*	NFb modificado	JNFb modificado	NFbl
Ac. málico	5	5	-	2,5	2,5	2,5
Glucosa	-	-	5	2,5	2,5	2,5
K ₂ HPO ₄	0,5	0,6	0,2	0,5	0,6	0,2
KH ₂ PO ₄	-	1,8	0,6	-	1,8	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Micronutrientes ^a	2ml	2ml	-	2ml	2ml	2ml
Fe-EDTA ^b	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml
pH	6,5	5,8	6	6,5	5,8	6
vitaminas	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Agar	17	17	15	15	17	17
Ext. levadura ^c	20mg	20mg	-	-	-	-
NH ₄ Cl	-	-	-	1	1	1

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

b- solución 1.64% de Fe (p/v).

c- solo para suplementar medio sólido.

*_Prokaryotes 5:141-150 Chapter 3.1.6 (2006).

**_Protocolos para preparo de meios de cultura da EMBRAPA Agrobiologia; ISSN 0104-6187 (1999).

2.3 Identificación y caracterización molecular de las cepas aisladas.

2.3.1 Extracción de ADN.

Se centrifugó (15 min a 15000g) 1ml de cultivo fresco y el ADN se extrajo del pellet lavado utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA); el ADN se resuspendió en 50 µl de agua milliQ esterilizada.

3.3.2 Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA.

Para la amplificación del gen 16S rDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se preparó una mix (1x) conteniendo: buffer provisto por el fabricante (Invitrogen) 1x, MgCl₂ 1,5mM ; BSA (Boehringer Mannheim) 0,1 mg/ml, dNTPs 0,2mM de cada uno, Primers (IDT, Iowa, USA) 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 0,48 µM cada uno, Taq DNA polimerasa 0,4U/ml (Invitrogen, Brasil) y agua milliQ esterilizada c.s.p. 25µl.

La técnica utilizada, en el caso de partir del pellet de células, contó con una etapa previa de desnaturalización (15 min. a 94°C). La amplificación se realizó con 30 ciclos de 94°C por 1 min., 53°C por 1 min. y 72°C durante 3 min, y una fase final de elongación de 72°C por 7 min. Se utilizó un termociclador automático (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer, Conn, USA) para realizar todas las reacciones de amplificación.

En los casos en que no se logró el producto de amplificación, se procedió a la extracción de ADN como se indica en el ítem anterior y se redujo el tiempo de la etapa de desnaturalización a 94°C a 5 min..

Los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 0,9 % (Agarose I, Amresco) en buffer TBE 0,5x a 100V durante 30 minutos aproximadamente, usando, como patrón de peso molecular, el marcador 1Kb (Invitrogen).

Para la secuenciación parcial del gen 16S rDNA se utilizó el primer 27f. Todas las reacciones de secuenciación se realizaron en el servicio de secuenciación de MacroGen (MacroGen Sequencing Service, Korea) usando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para la identificación de los aislamientos, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de la base de datos del GenBank.

2.3.3 Análisis de la restricción del gen 16S rDNA.

Se utilizó una mezcla con 0,3 µl (10 U/µl) de cada una de las enzimas *Rsa* I (Boehringer) y *Msp* I (Biolabs) en 1 µl de buffer adecuado y 8,4 µl de producto de PCR del gen 16S rDNA. La restricción se llevó a cabo durante 4 hs. a 37°C.

Los productos de restricción se corrieron en gel de agarosa 2,5 % (Methaphor) en buffer TBE 0,5x (Tris 44,5mM, ácido bórico 44,5 mM y EDTA 1,25 mM; pH 8,2) a 100V durante 1 hora aproximadamente. Para la preparación del gel: se diluyó 1g de agarosa Methaphor en 40 ml de TBE 0,5x frío. Se fundió en microondas a potencia 30, se enfrió bajo la canilla hasta alcanzar 50-60°C. Para la visualización de los productos se agregó 3 µl de bromuro de etidio. Se mantuvo en heladera durante 24 hs y luego se efectuó la corrida. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador pBR322/HaeIII (Bioron).

Luego de cada corrida los geles fueron fotografiados (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak) bajo transiluminador UV (UVP).

Los perfiles de ARDRA (Amplified Restriction DNA Ribosomal Análisis) se compararon utilizando el programa de análisis de imágenes Gel Compar 4.2 (Applied Maths Kortrijk, Belgium), utilizando el coeficiente de correlación de Dice para establecer su similitud. Para el agrupamiento de los perfiles se usó el algoritmo UPGMA (Unweighted to Pair Group Method with Arithmetic means).

2.3.4. Fingerprinting BOX-PCR.

La reacción de BOX-PCR se desarrolló en un volumen final de 25 μ l, conteniendo buffer Taq 1x, BSA (Boehringer Mannheim) 160 μ g/ml, DMSO 10% v/v, MgCl₂ 6.7 mM, dNTPs 1mM cada uno, Taq DNA Polimerasa 8U/ml (Invitrogen, Brasil) y Primer BOX A1R 2 μ M (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3').

El ciclo contó con una etapa primaria de desnaturalización de 7 min. a 95°C, luego 30 ciclos de amplificación (94°C por 1min., 53°C por 1 min. y 65°C durante 8 min.); por último una etapa de elongación a 65°C durante 16 min, seguida de 15 minutos a 4°C.

Los productos de la amplificación por PCR se separaron por electroforesis en gel de Agarosa 1.5 % (LE, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) en buffer TAE 0.5x, de volumen total 120 ml, teñido con bromuro de etidio, durante 3-3.5 hs a 120 V en heladera, para evitar que el gel se estropee con el calor. Se utilizó como patrón de peso molecular el marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies, Gibco BRL).

Los geles fueron fotografiados (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak) bajo transiluminador UV (UVP). Se utilizó el programa Gel Compar 4.2 (Applied Maths Kortrijk, Belgium), utilizando el coeficiente de correlación de Dice para comparar los patrones de bandas

obtenidos. Para el agrupamiento de los perfiles se usó el algoritmo UPGMA (unweighted to pair group method with arithmetic means). Para la comparación de los perfiles se utilizó el mismo programa mencionado antes. Se analizaron los fragmentos de 0.5 a 2.0 kb, y se consideraron iguales los perfiles que presentaban una similitud de 85% o mayor ya que se vio que ese número era el porcentaje de similitud más bajo entre repeticiones de corrida de una misma muestra.

2.4 Análisis estadístico de los recuentos.

Se realizó el Análisis de Varianza para un factor (ANOVA) con el programa Past (Hammer, 2001), con un alfa de 0.05. Para la comparación a posteriori se utilizó el test de Tukey.

III. RESULTADOS

3.1 Abundancia y caracterización de bacterias endófitas cultivables aisladas durante el ciclo del cultivo de arroz.

3.1.1 Abundancia de endófitos cultivables.

Entre noviembre de 2008 y marzo de 2009 se tomaron muestras de raíces y hojas de plantas de arroz (*Oryza sativa* var. Olimar) en cuatro momentos del desarrollo del cultivo: Macollaje (M), Inundación (I), Embarrigado (E) y Llenado de grano (L), así como granos (G) luego de la cosecha, para contar y aislar bacterias endófitas heterótrofas totales y productoras de sideróforos, con el fin de establecer la dinámica de estas poblaciones. También se estudió la población de suelo en las etapas de macollaje y llenado de grano.

El recuento de heterótrofos totales fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en suelo respecto a las raíces, hojas y granos (Figura 3.1, Tabla 1 en anexo 1). En los dos momentos evaluados, el número de productores de sideróforos en suelo fue significativamente menor que el de heterótrofos totales.

La proporción de productores de sideróforos respecto a los heterótrofos totales, tanto en suelo como en raíz, aumentó entre las etapas de macollaje y de llenado de grano. Pero en ambos estadios fue mayor en las raíces que en el suelo, esto podría significar que la producción de sideróforos podría estar involucrada en la permanencia de los microorganismos en las raíces.

El número de heterótrofos totales en raíz fue desde $\text{Log } 4.93 \pm 0.55$ hasta 6.03 ± 0.91 ufc/g peso fresco entre las etapas de macollaje y llenado de grano, mientras que los productores de sideróforos variaron entre $\text{Log } 3.98 \pm 0.35$ y 5.03 ± 0.56 ufc/g peso fresco. La abundancia de estas poblaciones no mostró diferencias significativas en el transcurso del desarrollo del cultivo.

El recuento de heterótrofos totales en hojas estuvo entre $\text{Log } 4.95 \pm 0.79$ y 5.53 ± 0.32 ufc/g peso fresco sin mostrar diferencias significativas conforme avanzaba el desarrollo del cultivo, mientras que la población de productores de sideróforos fue de 3.44 ± 0.42 a 5.52 ± 0.41 ufc/g peso fresco, con un aumento significativo ($P < 0,05$) entre las etapas de macollaje y llenado de grano.

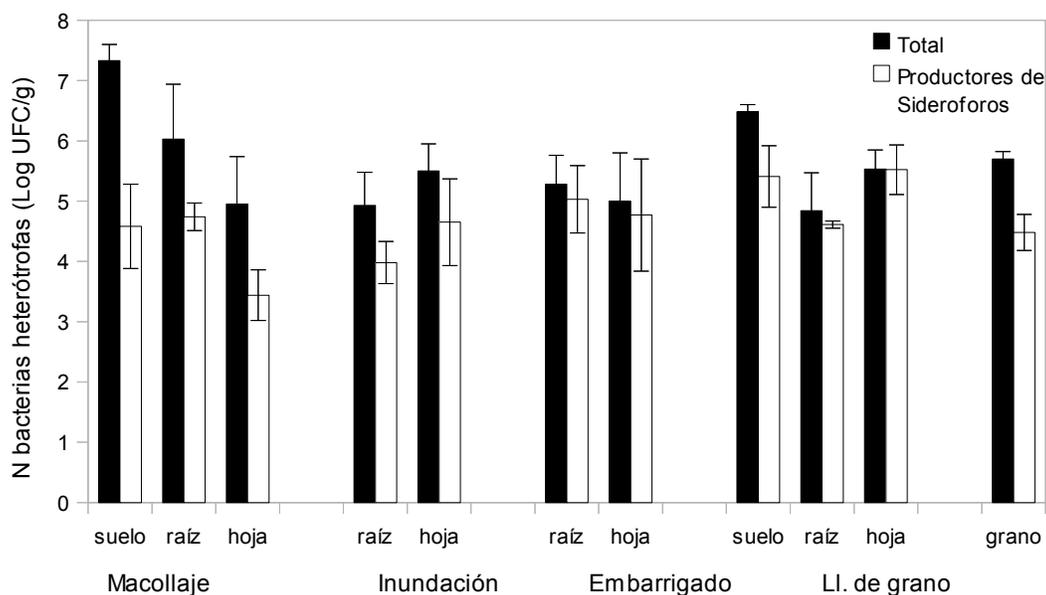


Figura 3.1. Abundancia (Log) de heterótrofos totales y heterótrofos productores de sideróforos aislados durante el desarrollo del cultivo de arroz en suelo, raíz, hoja y grano. Las barras representan la desviación estándar de 4 réplicas. Ver Tabla 1 en anexo 1.

La comparación entre el recuento de heterótrofos totales y productores de sideróforos mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) en la etapa vegetativa del desarrollo (macollaje) tanto en hoja como en raíz, pero luego de la inundación no se detectaron diferencias, lo cual indicaría una selección hacia los

microorganismos capaces de sintetizar sideróforos a medida que la planta madura.

La población de heterótrofos productores de sideróforos en granos ($\text{Log } 4.48 \pm 0.30$ ufc/g peso fresco) fue significativamente menor ($P < 0,05$) a la población de heterótrofos totales ($\text{Log } 5.70 \pm 0.12$ ufc/g peso fresco).

3.1.2 Características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos.

A los aislamientos productores de sideróforos y a los obtenidos en R2A cuya morfología fue típica de *Pantoea* spp. (colonias amarillas, circulares, de centro poco elevado, brillantes, lisas, con halo claro) (Figura 3.2), se les realizó la prueba de OF- glucosa. Los resultados de estas pruebas junto con el análisis semi- cuantitativo de la producción de sideróforos en placas de CAS-R2A permitieron la agrupación de las cepas. Con esto se obtuvieron 142 aislamientos, de los cuales 56 provenían de raíces, 66 de hojas y 20 de granos.

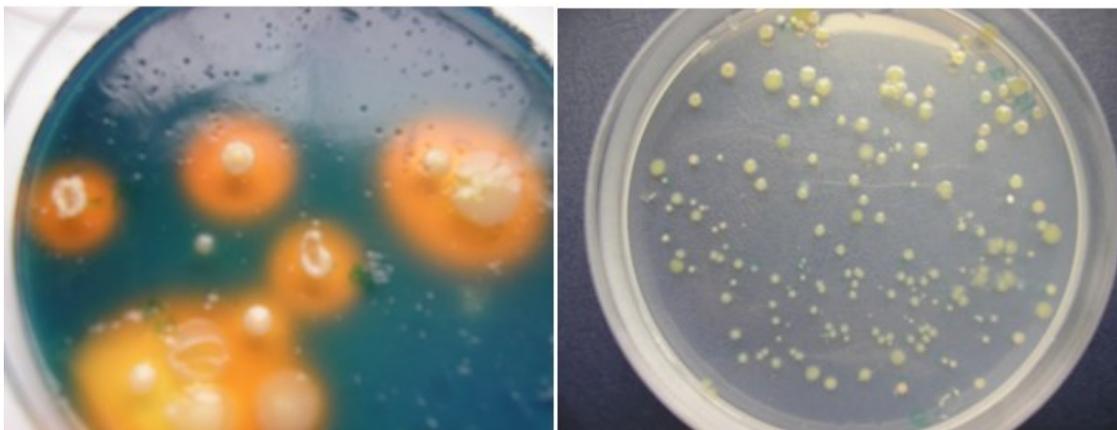


Figura 3.2. Placas de CAS-R2A y R2A mostrando las morfologías encontradas en los aislamientos realizados de raíces y hojas de plantas de arroz.

De los aislamientos obtenidos de raíces, 16 fueron fermentadores de glucosa, 21 fueron oxidadores de glucosa y 19 no fueron capaces de utilizar el azúcar.

Los aislamientos oxidadores de glucosa fueron los que mostraron mayor producción de sideróforos en placas de CAS, siendo la mayoría de éstos obtenidos en las etapas de macollaje (7) e inundación (6). El 76,4% de los 17 aislamientos que no mostraron cambio en la prueba de OF obtenidos de raíces se aisló en la etapa de llenado de grano, y en todos estos aislamientos la producción de sideróforos fue muy pobre (Figura 3.4). La mayoría (68,7%) de los 16 aislamientos fermentadores de glucosa obtenidos de raíces fue aislada en la etapa de macollaje y produjo bajos niveles de sideróforos.

Dentro de los aislamientos obtenidos de hojas se obtuvieron en total 43 fermentadores de glucosa. La proporción de esta población fue aumentando en los tres primeros momentos del desarrollo evaluados (Figura 3.4), manteniéndose estable hacia el final. Los aislamientos oxidadores de glucosa y los que no mostraron cambio fueron un 22,7% y 12,1% respecto al total de aislamientos obtenidos en este tejido respectivamente.

El 55% de los 20 aislamientos obtenidos de granos fue oxidador de glucosa, mientras que el 25% fue fermentadores de glucosa y el 20% no utilizó la glucosa. De este tejido, sólo un aislamiento (G16) produjo sideróforos en gran cantidad, siendo este aislamiento oxidador de glucosa.

Los aislamientos fermentadores de glucosa se evaluaron respecto a su capacidad de fermentar maltosa con el fin de discriminar las cepas de *P. ananatis*, fermentadoras de dicho azúcar, de las de *P. agglomerans* que no lo fermentan.

Sólo siete aislamientos no utilizaron la maltosa, siendo seis de ellos obtenidos de muestras de raíz (Tablas 2 y 3 en anexo 1).

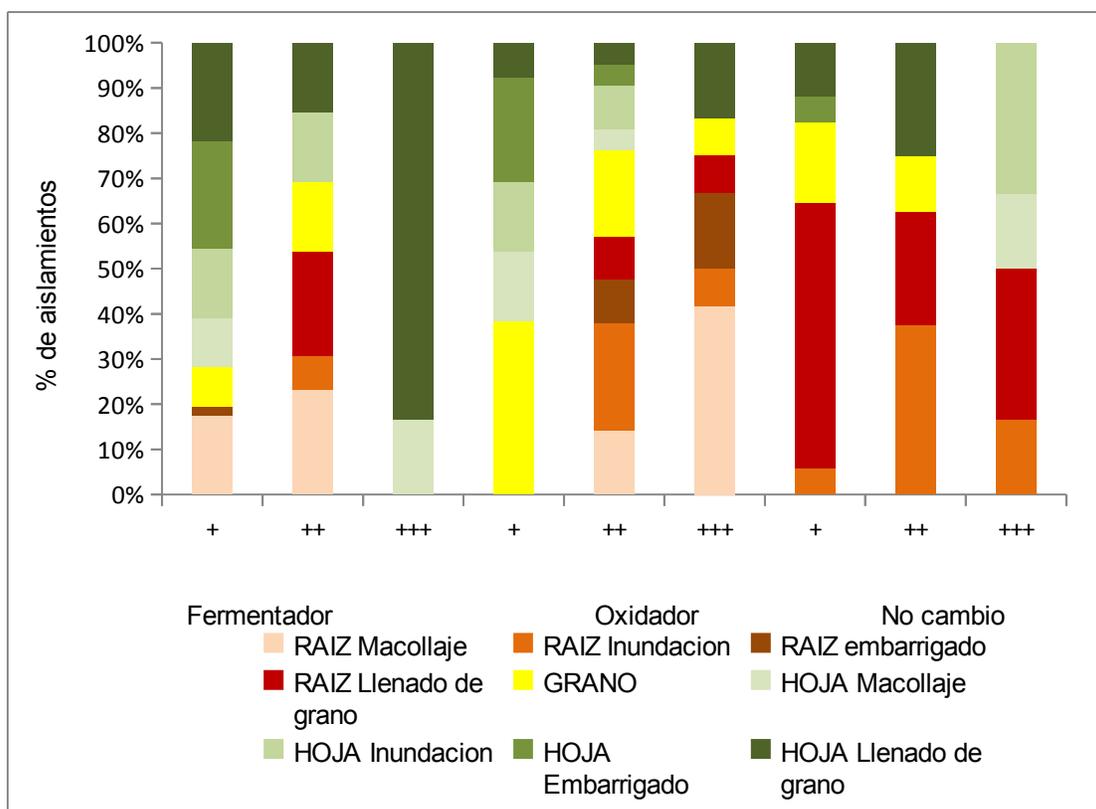


Figura 3.4. Porcentaje de los aislamientos de bacterias endófitas aisladas de raíz, hoja y grano en cuatro momentos del desarrollo del cultivo de arroz, agrupadas según el resultado de la prueba de OF-glucosa y la producción de sideróforos en medio CAS-R2A: + halo de 1 a 3mm, ++ de 3 a 6mm, +++ más de 6mm de halo. Sobre las columnas se muestra en número total de aislamientos obtenidos.

Las cepas oxidadoras de glucosa y las que no mostraron cambio en la prueba de OF-glucosa fueron evaluadas con la prueba de oxidasa. No se vio una asociación entre los resultados de OF con los de oxidasa, obteniéndose las cuatro combinaciones posibles (Tablas 4 y 5 en anexo 1).

3.2 Diversidad molecular de los aislamientos productores de sideróforos.

3.2.1 Análisis de la restricción del gen 16S rDNA.

Se realizó la restricción del gen 16S rDNA (ARDRA) a 128 aislamientos obtenidos de raíces, hojas y granos.

Se obtuvieron 64 perfiles diferentes, siendo 49 de ellos representados por un único aislamiento. La presencia de las cepas con perfiles únicos, detectados en un momento y tejido en particular, revela que condiciones específicas de cada tejido/ momento influyen en la población de bacterias cultivables y que existe una dinámica constante de ésta. La mayoría de estos aislamientos únicos fue aislada de hojas y de raíz en la etapa de llenado de grano y de granos (Tabla 8 en anexo 1).

Las cepas fermentadoras de glucosa y maltosa se agruparon en 4 perfiles: PA1, PF3, PF4 y PF5 (Figura 3.5).

El perfil ARDRA PA1 fue el mayoritario y el único presente en todos los tejidos y momentos evaluados. Los perfiles PF3 y PF4 fueron tejido y momento específicos, aislándose en hojas durante el llenado de grano y en hojas en la etapa de embarrigado, respectivamente; mientras que las cepas representantes del perfil PF5 se aislaron en la etapa de macollaje, tanto en hoja como en raíz. El perfil de ARDRA PG agrupó a todos los aislamientos no fermentadores maltosa, teniendo representantes en raíces en macollaje y llenado de grano, así como en granos.

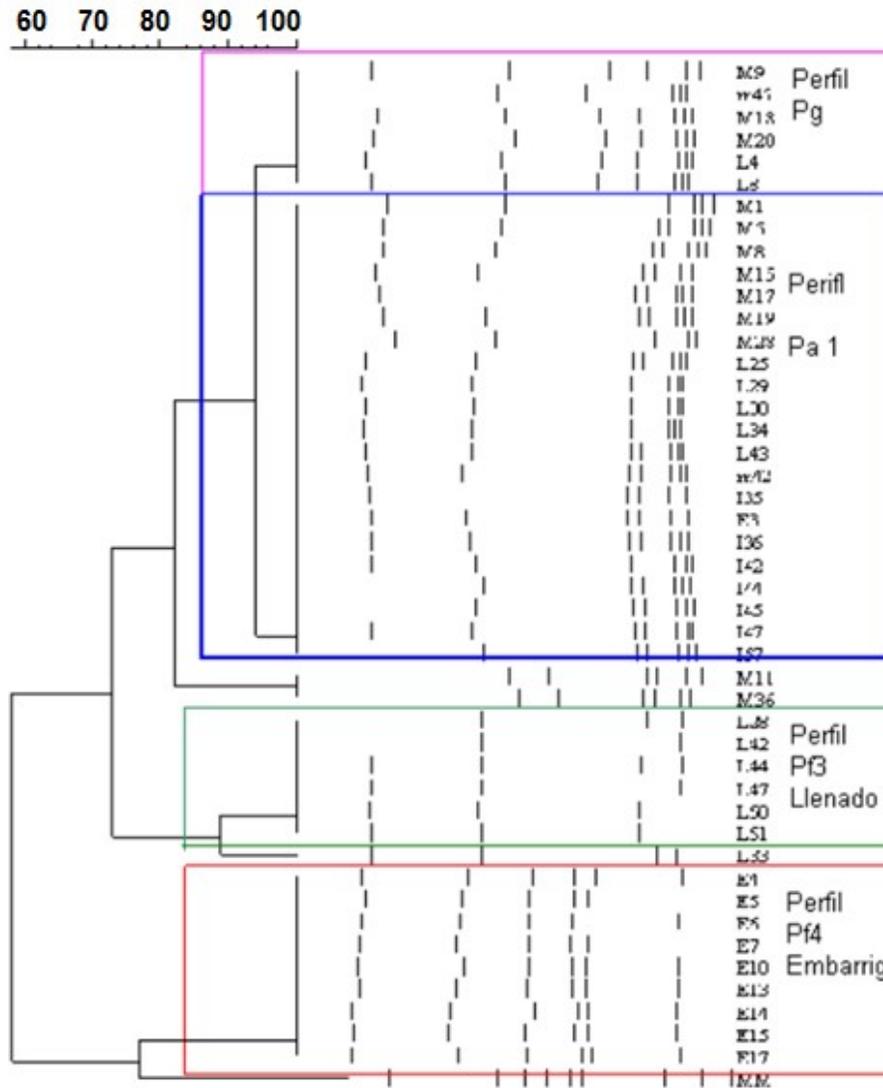


Figura 3.5. Análisis de agrupamiento de los aislamientos fermentadores de glucosa con un representante de cada perfil ARDRA obtenidos en los cuatro momentos del cultivo evaluados. En la primera columna figura el nombre del aislamiento, según: M: macollaje; I: inundación; E: embarrigado; L: llenado de grano; en cada cuadro se indica el perfil de ARDRA asignado. Las líneas corresponden a las bandas reconocidas por el programa para el agrupamiento.

Las cepas oxidadoras de glucosa se agruparon en los perfiles de ARDRA A, B, D, F, G, I y J (Figura 3.6).

El perfil F fue el segundo más abundante después de PA1. Se detectaron aislamientos pertenecientes al mismo en raíces en las etapas de macollaje e inundación y en hojas en inundación y embarrigado. Por otra parte, este perfil se encontró en aislamientos de grano aunque no se detectó en la etapa de llenado de grano en ninguno de los dos tejidos analizados.

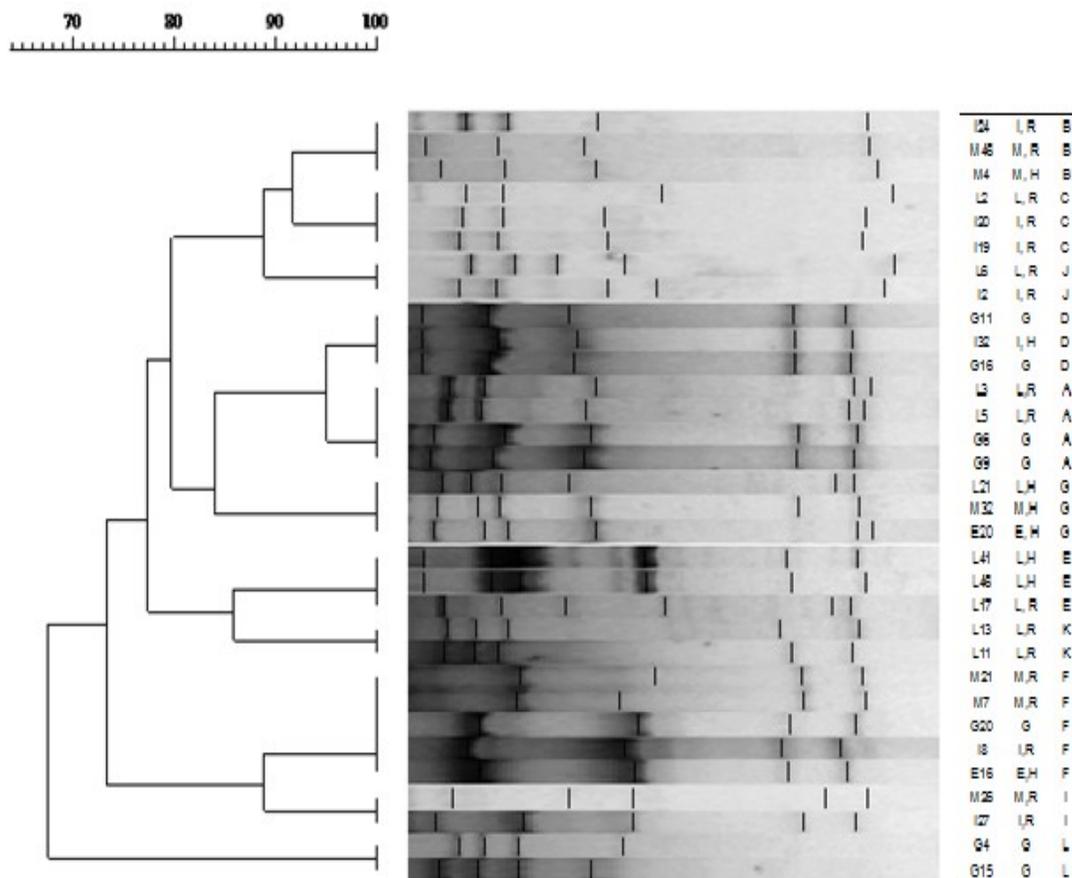


Figura 3.6. Análisis de agrupamiento de los aislamientos oxidadores de glucosa y los que no muestran cambio en la prueba de OF. En la primer columna figura el nombre del aislamiento, en la segunda el origen del aislamiento (momento, tejido) según: M: macollaje; I: inundación; E: embarrigado; L: llenado de grano; G: grano; R: raíz; H: hoja. En la tercera columna se muestra el perfil ARDRA correspondiente.

El perfil C, que incluye a los aislamientos que no fueron capaces de utilizar azúcares, estuvo representado por dos integrantes aislados de raíz en las etapas de inundación y llenado de grano.

3.2.2 Identificación de aislamientos representativos de los perfiles ARDRA por secuenciación del gen 16S rDNA.

Los aislamientos representativos de los diferentes perfiles de ARDRA mayoritarios que están en la Tabla 3.1 fueron identificados con más de un 99% de similitud con secuencias del GenBank.

Los perfiles PA1, PF3 y PF4 se identificaron como *Pantoea ananatis*. El perfil PF5 se asoció al género *Pantoea* mientras que el representante del perfil PG se identificó como *Cronobacter sakazakii* (originalmente *Enterobacter sakazakii*, también relacionado con *Pantoea agglomerans*).

Los perfiles A, D y G se agruparon con *Pseudomonas*, mientras que los perfiles B, C, I y J pertenecieron al género *Burkholderia*. Por otro lado el perfil F se asoció al género *Sphingomonas* sp.

Tabla 3.1. Identificación de los aislamientos representativos de los perfiles ARDRA mayoritarios según la secuenciación parcial del gen 16SrDNA. Se muestra el Número de acceso con el cual la secuencia respectiva fue depositada.

Aislamiento	Perfil ARDRA	Número de acceso	Especie más cercana (Número acceso)	Similitud (%)
G6	A	HM591474	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (HM038118)	99
I24	B	HM591475	<i>Burkholderia cenocepacia</i> ESR108 (EF602567)	100
I20	C	HM591476	<i>Burkholderia cepacia</i> 2Pe22 (EF178444)	100
I32	D	HM591477	<i>Pseudomonas</i> sp. M051(AB461633)	99
L27	D	HM591478	<i>Pseudomonas</i> sp. FeL30 (EU741045)	100
G16	D	HM591479	<i>Pseudomonas</i> sp. Aek29 (EU741008)	99
G20	F	HM591480	<i>Sphingomonas</i> sp. EM0335 (EU448284)	100
M32	G	HM591481	<i>Pseudomonas</i> sp. M051 (AB461633)	99
I27	I	HM591482	<i>Burkholderia cenocepacia</i> ESR108 (EF602567)	99
I2	J	HM591483	<i>Burkholderia caribensis</i> INPA89A (GU144372)	99
M17	PA1	HM591484	<i>Pantoea ananatis</i> JA04 (DQ365569)	98
E3	PA1	HM591485	<i>Pantoea ananatis</i> E-1-4(GU338400)	99
L42	PF3	HM591486	<i>Pantoea ananatis</i> LN-4(GU937431)	98
E4	PF4	HM591487	<i>Pantoea</i> sp. pt2 (EU887710)	99
E5	PF4	HM591488	<i>Pantoea ananatis</i> E-1-4(GU338400)	100
M11	PF5	HM591489	<i>Pantoea</i> sp. CWB600(EU984512)	99
M18	PG	HM591490	<i>Enterobacter</i> sp. SR-2 (FJ593001)	100
G7	PG	HM591491	<i>Cronobacter sakazakii</i> KYU38 (GU227698)	99

Se obtuvieron aislamientos del género *Pseudomonas* en muestras de raíz en la etapa de llenado de grano, y en hojas en los cuatro estadios evaluados, así como en grano (Figura 3.7).

Los aislamientos pertenecientes al género *Burkholderia* se obtuvieron de muestras de raíz en macollaje, inundación y llenado de grano y en hojas únicamente en macollaje (Figura 3.7).

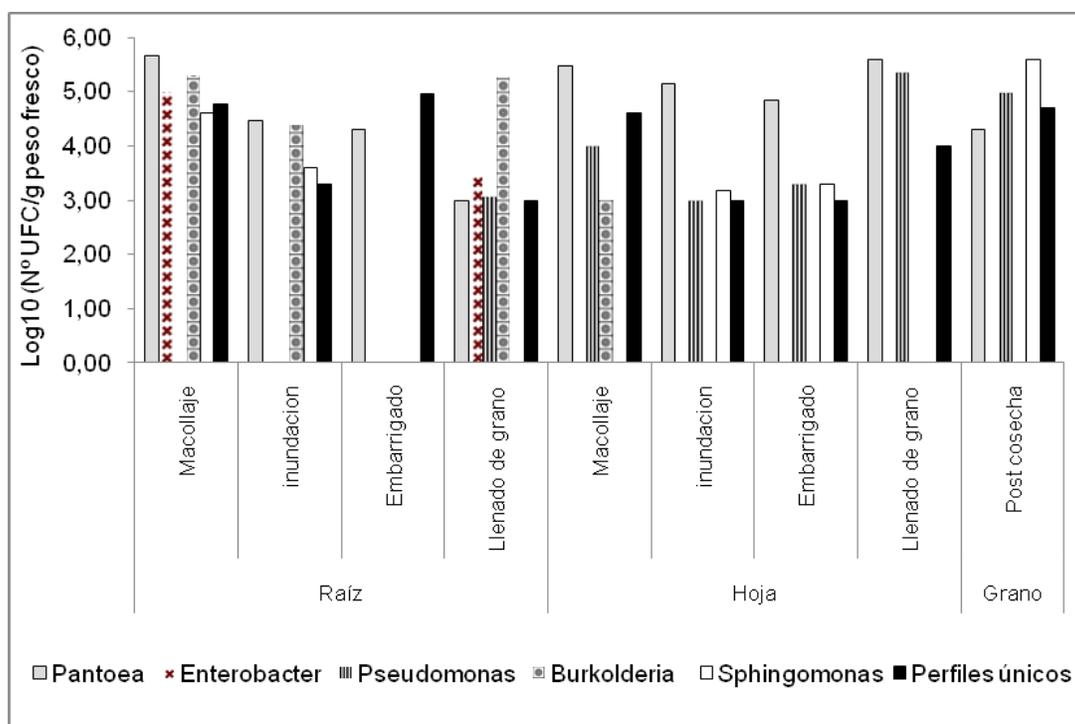


Figura 3.7. Abundancia (Log UFC/g peso fresco) de los aislamientos pertenecientes a cada género según el tejido y momento del desarrollo del cultivo.

Por su parte, los aislamientos de *Sphingomonas* se obtuvieron en granos, raíces en macollaje e inundación y hoja en las etapas de inundación y embarrigado (Figura 3.7). Es posible plantear la hipótesis que las cepas de este género son capaces de migrar desde las raíces a las hojas luego de las etapas

vegetativas, y que son también capaces de establecerse preferentemente en los granos una vez que éstos comienzan a formarse, migrando desde los tejidos aéreos.

Se obtuvieron aislamientos de *Pantoea* sp en todos los momentos y tejidos evaluados. En las etapas tempranas, tanto en hoja como en raíz, el porcentaje de los aislamientos identificados como *Pantoea* sp. respecto al total de productores de sideróforos es alto, por lo tanto es probable que los principales productores de sideróforos en estas etapas sean pertenecientes al género *Pantoea*.

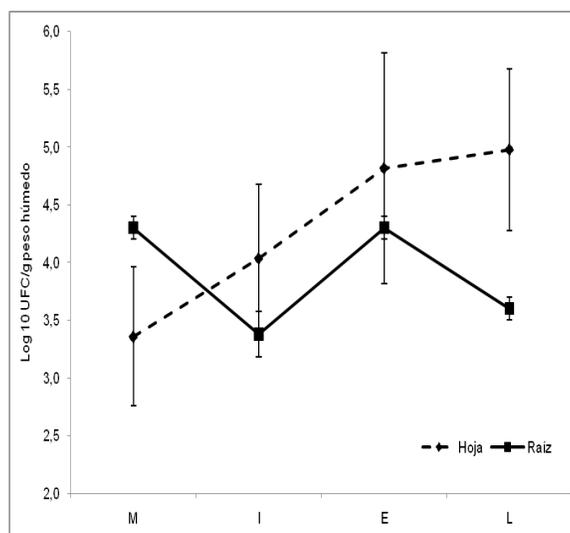


Figura 3.8 Log UFC/ g peso fresco de aislamientos identificados como *Pantoea* sp. M, Macollaje, I, Inundación, E, Embarrigado; L, Llenado de grano.

El recuento de estas bacterias aumenta en hoja conforme avanza el desarrollo del cultivo (Figura 3.8), mientras que en raíz disminuye la proporción de aislamientos del género *Pantoea* respecto al total. Se observaron otros

productores de sideróforos que lograron establecerse en la raíz luego de la inundación que pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Es posible entonces suponer que las cepas de *Pantoea* se movilizaron hacia las hojas dejando lugar a otros microorganismos en las raíces. Por otro lado en grano, los aislamientos identificados como *Pantoea* sp. representan una porción pequeña del total de productores de sideróforos.

3.2.3 Diversidad de las cepas de *Pantoea ananatis* aisladas.

En esta parte del trabajo se presenta el análisis de la diversidad genética de los aislamientos de *Pantoea ananatis*. Se analizaron dos grupos de aislamientos: (a) un grupo obtenido previamente a partir de hojas de tres variedades de arroz en dos cosechas consecutivas (2005 y 2006) y un segundo grupo de aislamientos (b) obtenidos en este trabajo a partir de hojas y raíces en los cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

a) El análisis de los perfiles BOX de los aislamientos obtenidos de hojas de tres variedades de arroz (INIA Tacuarí, INIA Olimar e INIA El Paso 144) pertenecientes a la especie *Pantoea ananatis*, caracterizados por restricción del gen 16S rDNA e identificados por secuenciación del mismo, muestra que los 26 aislamientos evaluados se agruparon en 19 perfiles BOX (Figura 3.9).

No se visualizó correlación entre las cepas de *Pantoea* y las variedades de arroz o el año de muestreo. Esto indica que, aunque se verificó la presencia de cepas de la especie *Pantoea ananatis* en las tres variedades de arroz más importantes de nuestro país (Tacuarí, Olimar y El Paso 144) durante dos años consecutivos (2005 y 2006), no se encontraron cepas asociadas a una variedad o a una cosecha particular.

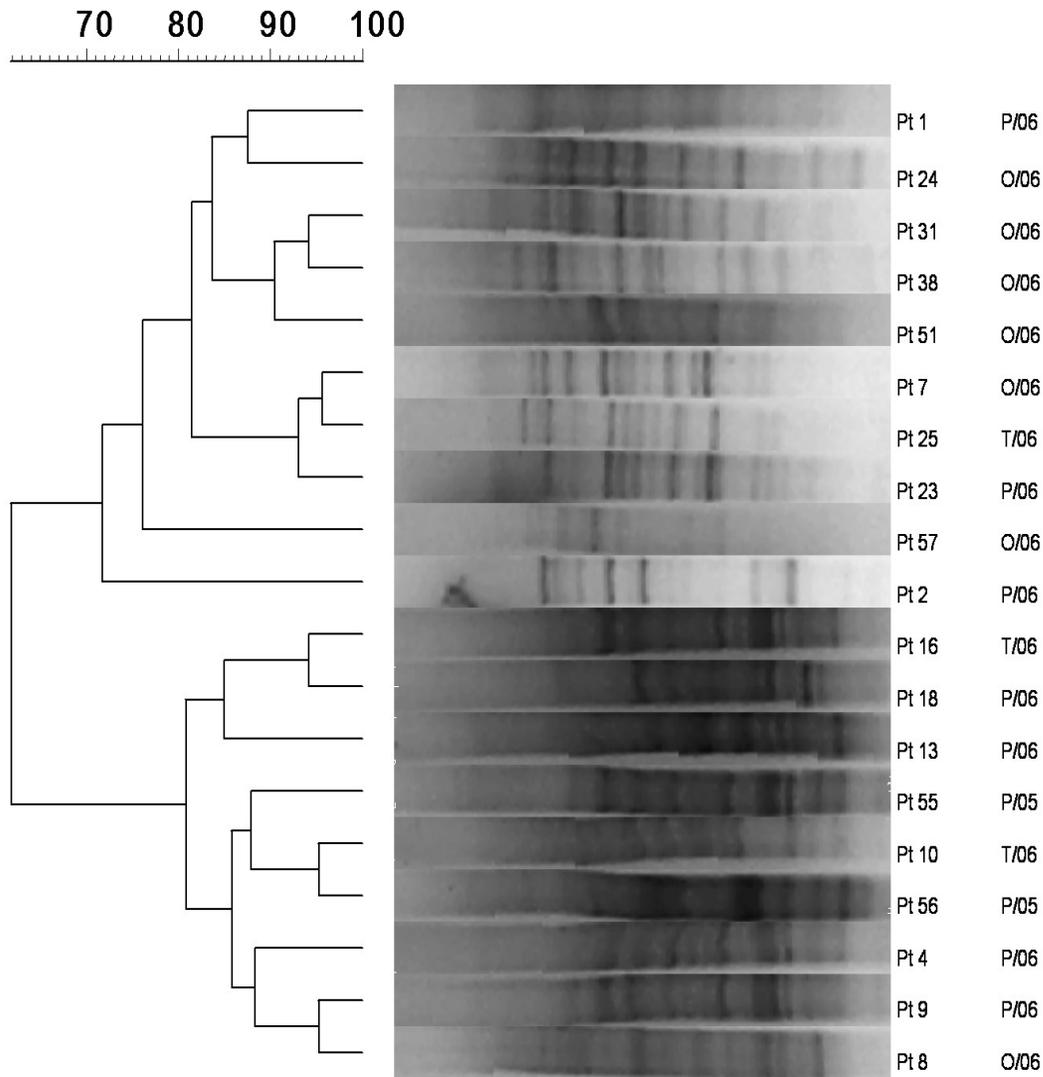


Figura 3.9. Denograma de los perfiles BOX-PCR representativos de los aislamientos de *P. ananatis* obtenidos de hojas en tres variedades y dos años de muestreo mostrando un representante de cada perfil, utilizando UPGMA para el análisis de cluster. En la segunda columna se detalla el origen del aislamiento (variedad/ año), siendo: O, Olimar, P, El paso, T, Tacuarí, 06, muestreo año 2006 y 05, muestreo año 2005.

b) Los perfiles de las cepas aisladas de la variedad Olimar en este trabajo mostraron entre 5 y 16 bandas en el rango de 0.5 a 2.0 kb. El análisis de estos perfiles indica que existe una gran diversidad a nivel de cepa entre los aislamientos de *P. ananatis*: 29 de los 31 aislamientos analizados se agruparon en 9 clusters con entre 2 y 7 integrantes (Figura 3.10).

El cluster I está compuesto por 4 aislamientos obtenidos en la etapa de macollaje y 3 en inundación. Los clusters II y VIII parecen ser tejido y momento específicos, ya que sólo comprenden aislamientos de hoja en la etapa de llenado de grano.

Dos clusters agruparon aislamientos obtenidos sólo de hojas: el cluster V agrupó aislamientos de las etapas de inundación y llenado de grano, mientras que el cluster VII de macollaje e inundación. Estos grupos muestran que algunas cepas pueden haber sido capaces de persistir en este tejido de una etapa a la siguiente.

Los cluster III y IV poseen un aislamiento obtenido de raíces en etapas tempranas (macollaje o embarrigado) y dos de hojas de etapas avanzadas del desarrollo del cultivo (inundación y llenado de grano). Asimismo, el cluster VI está constituido por dos aislamientos obtenidos en raíces en la etapa de macollaje y uno de hoja en la etapa de inundación. La composición de estos grupos sugiere que algunas cepas de *Pantoea ananatis* podrían migrar desde la raíz hacia las hojas durante el desarrollo del cultivo.

No fue posible agrupar los aislamientos E3 y M18, obtenidos de muestras de hoja en la etapa de embarrigado y de raíces en macollaje, respectivamente.

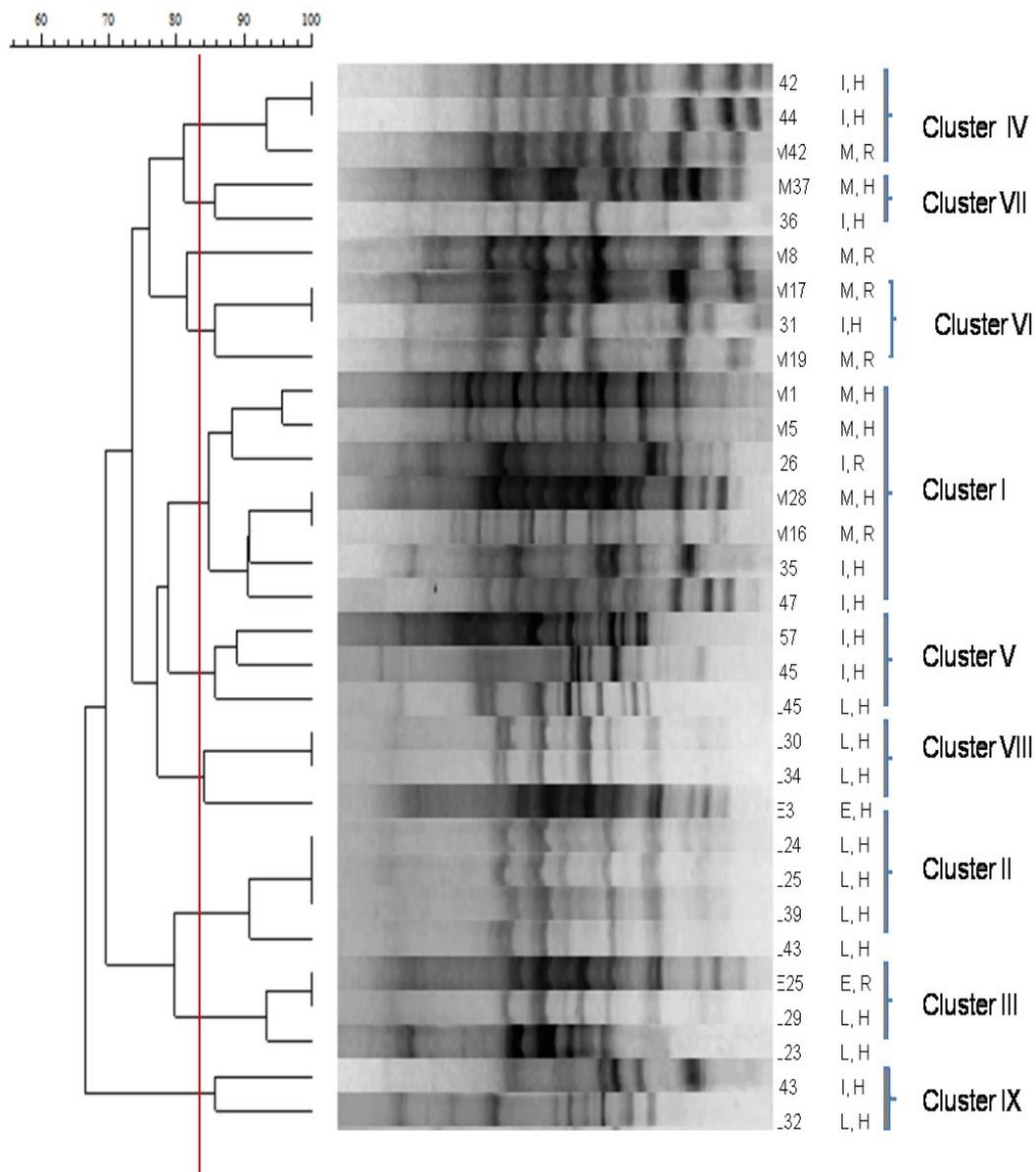


Figura 3.10. Denograma de los perfiles BOX-PCR de los aislamientos de *P. ananatis* utilizando UPGMA para el análisis de cluster. En la segunda columna se muestra el origen de los aislamientos (momento/ tejido), siendo: M, macollaje; I, inundación; E, embarrigado; L, llenado de grano; H, hoja y R, raíz.

3.3 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

Para estos ensayos se seleccionaron cepas representativas de los perfiles de ARDRA mayoritarios que estaban presentes en granos. También se incluyeron cepas presentes en raíces en etapas tempranas (macollaje o inundación) que luego se encontraron en hojas en etapas más avanzadas del desarrollo del cultivo. Se evaluaron sus cualidades como promotoras del crecimiento vegetal mediante la producción de ácido indolacético (IAA) y la fijación biológica de nitrógeno. También se evaluó en forma semicuantitativa la producción de sideróforos.

3.3.1 Producción de IAA.

Todos los aislamientos fueron capaces de sintetizar ácido indolacético en medio Try (Figura 3.12, Tabla 9 en Anexo 1). Aunque ninguno produjo mayor cantidad que *H. seropedicae* ($2,402 \pm 0.060$ mg/ml). Los aislamientos G6, M7 y I2 fueron capaces de producir niveles mayores que la cepa Az 39 de *A. brasilense* ($0,945 \pm 0.019$ mg/ml), mientras que I32, G16 y M18 produjeron niveles superiores a los producidos por *A. amazonense* ($0,825 \pm 0.010$ mg/ml).

Las cepas del género *Sphingomonas* (perfil ARDRA F) produjeron cantidades similares, excepto por el aislamiento M7 que presentó niveles más altos de síntesis. Las cepas de *Pantoea ananatis* (perfiles PA1 y PF5) fueron las que mostraron mayor variación en los niveles de producción de IAA. Los aislamientos del género *Burkholderia* (perfiles ARDRA B y C) evaluados presentaron los niveles más bajos de síntesis de compuestos indólicos. Estos resultados indicarían que la producción de IAA no es una característica asociada al género o especie.

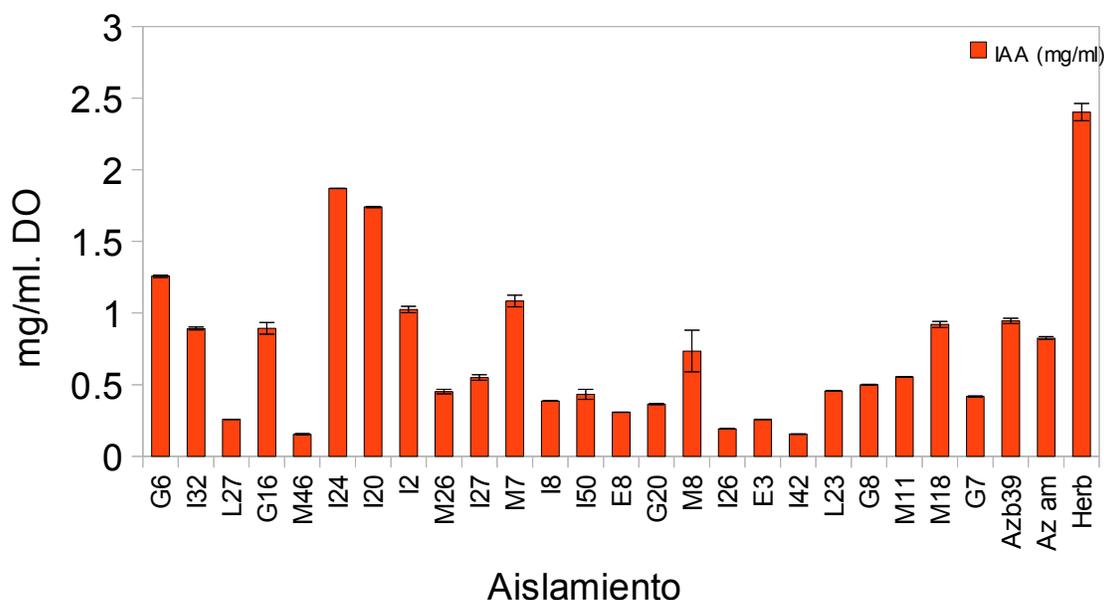


Figura 3.12. Niveles de ácido indol acético producido en medio Try. Se presenta el promedio de dos repeticiones. Las barras representan la desviación estándar de las medidas. El nombre de los aislamientos está seguido de su perfil ARDRA. Az 39- cepa Az 39 de *A. brasilense*, Azo- *A. amazonense*, Herb- *H. seropedicae*.

3.3.2 Reducción de acetileno.

Sólo tres aislamientos fueron capaces de reducir acetileno en la prueba de ARA: G6 (*Pseudomonas* sp.), I20 (*Burkholderia cepacia*) y M18 (*Enterobacter* sp.) luego de cinco días de incubación con acetileno (Tabla 9 en anexo 1).

3.3.3 Producción de sideróforos.

Los aislamientos productores de sideróforos obtenidos en medio CAS-R2A en este trabajo se compararon en cuanto a sus capacidad productora. Se obtuvieron mayores niveles de producción en los aislamientos obtenidos de raíces luego de la inundación (en las etapas de inundación, embarrigado y llenado de

grano). Siendo los aislamientos de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* los que mostraron los mayores niveles de producción de sideróforos.

3.4 Antagonismo frente a hongos fitopatógenos.

En ensayos duales de inhibición se evaluó la capacidad antagonista de los algunos aislamientos obtenidos en este trabajo frente a dos hongos fitopatógenos de variedades uruguayas de arroz (*Rhizoctonia oryzae* y *Sclerotium oryzae*) aislados y cedidos por la Ing. Agr. Stella Avila de la Estación Experimental de INIA Treinta y Tres.

Todos los aislamientos que fueron capaces de inhibir a *R. oryzae* también limitaron el crecimiento de *S. oryzae* (Tabla 3.2), siendo éste último el patógeno más sensible.

La capacidad antagonista se detectó en todos los aislamientos de *Burkholderia* estudiados, en un aislamiento de *Sphingomonas* y en cuatro de *Pantoea ananatis*. Estos aislamientos se obtuvieron de raíces en macollaje (*Burkholderia* y *P. ananatis*), inundación (*Burkholderia* y *Sphingomonas*) y hojas en inundación, embarrigado y llenado de grano (*P. ananatis*). Los aislamientos de *Burkholderia* evaluados fueron los que presentaron mayores niveles de inhibición, con valores de GI entre $55,84 \pm 6,16$ y $60,72 \pm 8,86$ %.

En algunos casos no se detectó inhibición de la expansión del micelio del hongo, pero se observó que su crecimiento se afectaba de diferentes formas (cambio de color del micelio, reducción de la biomasa del micelio, formación de esclerocios). La formación de esclerocios se vio principalmente en el crecimiento del *R. oryzae* sobre la estría de las cepas G20 y M18.

Tabla 3.2. Actividad antagonista de cepas representativas de perfiles ARDRA frente a *R. oryzae* y *S. oryzae* en ensayos duales. Se presenta el promedio de duplicados y su desviación estandar.

Aislamiento	Perfil ARDRA	Actividad antagonista ^a	
		<i>Rhizoctonia oryzae</i>	<i>Sclerotum oryzae</i>
G6	A	-	-
I32	D	-	-
L27	D	-	-
G16	D	-	-
M46	B	-	-
I24	B	56,78 ± 0,30	51,45 ± 3,44
I20	C	55,84 ± 6,16	51,24 ± 12,68
I2	J	60,72 ± 8,86	53,57 ± 1,24
M26	I	-	-
I27	I	-	-
M7	F	-	-
I8	F	32,68 ± 2,66	26,23 ± 9,22
I50	F	-	-
E8	F	-	-
G20	F	-	-
M8	Pa1	40,73 ± 3,47	42,05 ± 5,44
I26	Pa1	-	-
E3	Pa1	21,89 ± 4,09	29,14 ± 7,40
I42	Pa1	25,97 ± 0,02	32,88 ± 5,07
L23	Pa1	27,79 ± 1,59	28,37 ± 4,09
G8	Pa1	-	-
M11	Pf5	-	-
M18	Pg	-	-
G7	Pg	-	-
Az 39	-	14,05 ± 1,27	28,10 ± 0,89
Azo	-	16,87 ± 0,58	39,88 ± 6,32
Herb	-	-	-

^a Inhibición de hongos patógenos, *R. oryzae* y *S. oryzae*, expresado como $[(Kr - r1)/Kr] \times 100 = GI$ (%), donde Kr representa la distancia (medida en mm) desde el punto de inoculación al margen de colonia en dirección opuesta a la bacteria antagonista, r1 el crecimiento del hongo desde el punto de inoculación hacia la bacteria antagonista, y GI el porcentaje de inhibición del crecimiento. - no se vió inhibición.

3.5 Inhibición de PGPB.

En ensayos duales en placas de NFBI se evaluó para las cepas aisladas de granos y raíces en etapas tempranas del desarrollo del cultivo de arroz la capacidad inhibitoria del crecimiento frente a las PGPB *A. brasilense* y *H. seropedicae*. Sólo dos aislamientos de los quince evaluados fueron capaces de inhibir el crecimiento de la cepa *A. brasilense* Az 39, mientras que tres inhibieron el crecimiento de *H. seropedicae* Z94 (Tabla 3.3). El aislamiento G16 (*Pseudomonas sp.*) fue el que presentó mayor actividad, con más de 1cm de halo de inhibición. G7 fue capaz de limitar el crecimiento de *A. brasilense* pero no de *H. seropedicae*. Mientras que las cepas M8 e I20 fueron capaces de inhibir el crecimiento de *H. seropedicae* Z94 pero no el de la cepa Az 39.

Tabla 3.3. Actividad inhibitoria de cepas seleccionadas frente a *A. brasilense* y *H. seropedicae* en cultivo dual.

Aislamiento	Perfil ARDRA	Secuencia ^a	Actividad inhibitoria	
			Az 39	H. Z94
G6	A	<i>P. oryzihabitans</i>	-	-
I24	B	<i>B. cenocepacia</i>	-	-
I20	C	<i>B. cepacia</i>	-	+
G16	D	<i>Pseudomonas</i> sp.	++	++
M7	F	<i>Sphingomonas</i> sp.	no crece	-
G20	F		-	-
I2	J	<i>B. caribensis</i>	-	-
m26	I	<i>B. cenocepacia</i>	-	-
I27	I	<i>B. cenocepacia</i>	-	-
m8	Pa1	<i>P. ananatis</i>	-	+
I26	Pa1	<i>P. ananatis</i>	-	-
G8	Pa1	<i>P. ananatis</i>	-	-
m11	Pf5	<i>Pantoea</i> sp.	-	-
m18	Pg	<i>Enterobacter</i> sp.	-	-
G7	Pg	<i>C. sakazakii</i>	++	-
Az 39	Nc	<i>A. brasillense</i>	Nc	-
H Z 94	Nc	<i>H. seropedicae</i>	-	Nc

^a según sea del propio aislamiento o el correspondiente al perfil de ARDRA.

Nc- no corresponde. +. Inhibición de la cepa Az 39 de *A. brasilense* o la cepa Z94 de *H. seropedicae*.

No crece- Inhibición del crecimiento del aislamiento evaluado.

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La diversidad y dinámica de la población de bacterias endófitas durante el desarrollo del cultivo de arroz (*Oryza sativa* var. Olimar) cultivado en Uruguay no habían sido estudiadas previamente. Se aisló y estudió la población de productores de sideróforos asociados a raíces y hojas en cuatro momentos claves en el desarrollo del cultivo: macollaje, inundación, embarrigado y llenado de grano. A su vez se estudió dicha población en los granos luego de 7 meses de reposo a temperatura ambiente. La población de suelo se determinó en las etapas de macollaje y llenado de grano.

El conocimiento de las poblaciones endófitas y sus propiedades no sólo aporta al entendimiento de su rol ecológico y las interacciones planta-bacteria sino que también pueden contribuir al desarrollo de biotecnologías, como el control biológico de fitopatógenos (Berg *et al.* 2005).

Los sideróforos producidos por microorganismos pueden aumentar o regular la disponibilidad de hierro en la rizósfera o servir como fuente de hierro para las plantas. Para adquirir el hierro unido a los sideróforos, los microorganismos utilizan complejos proteicos que unen y transportan el complejo quelante-hierro hacia el interior de la célula o que remueven el hierro de los sideróforos en la superficie celular. Aunque no todas las plantas pueden utilizar todos los sideróforos producidos por los microorganismos, las plantas también tienen sistemas de transporte de los complejos sideróforos-hierro o, en condiciones reducidas del suelo, podrían adquirir hierro inorgánico por la disociación de los complejos con sideróforos en la rizósfera (Crowley *et al.* 1988). A su vez, y aunque poseen menor afinidad que los sideróforos bacterianos, las plantas liberan ácidos orgánicos, tales como mugineico, disticónico o avénico, que pueden solubilizar hierro a pH bajo los cuales suelen denominarse fitosideróforos (Crowley *et al.* 1988).

4.1 Abundancia de bacterias endófitas cultivables aisladas durante el cultivo de arroz.

Se ha reportado que el recuento de endófitos en raíz es mayor que en tejidos aéreos (Prakamhang *et al.* 2009, Mano *et al.* 2007). Por el contrario, en este trabajo la población de endófitos de raíz, hoja y grano no mostró diferencias significativas en los diferentes momentos del desarrollo del cultivo evaluados.

El recuento de heterótrofos totales en suelo fue aproximadamente tres órdenes mayor al de productores de sideróforos. Esta población en raíces en las etapas de macollaje y llenado de grano es similar al detectado en suelo, mientras que el número de heterótrofos totales es significativamente menor, por lo cual es posible suponer que hay una selección hacia este sub grupo de bacterias presentes en el suelo por parte de la planta.

La población de heterótrofos totales es significativamente mayor que la de productores de sideróforos tanto en hoja como en raíz en la etapa de macollaje. Después de la inundación no se ven diferencias en los recuentos de estas poblaciones. A su vez, los aislamientos obtenidos de raíz fueron fuertes productores de sideróforos.

4.2 Diversidad molecular de los aislamientos.

Diversos géneros se han identificado como endófitos de varios cultivos de interés agronómico. Mano & Morisaki (2008) en su revisión sobre endófitos de arroz afirman que comúnmente se ha aislado *Pantoea* sp. de semillas, *Methylobacterium* sp. de brotes, *Azospirillum* sp. y *Herbaspirillum* sp. de tallos y raíces, y *Burkholderia* sp. y *Rhizobium* sp. de raíces. Estas bacterias también se han aislado como endófitos en otros cultivos: representantes del género *Pantoea* se ha aislado de maíz, algodón, trébol rojo, papa, uva y pera (Mc Inroy & Kleoper 1995, Sturz *et al.* 1997, Bell *et al.* 1995) y de *Burkholderia* de maíz, algodón y

pepino (Mc Inroy & Kleoper 1995). Los grupos *Pseudomonas* (*Pseudomonas* y *Burkholderia*) y Enterobacteriaceae (*Enterobacter*, *Erwinia*, y *Klebsiella*) (Hallmann *et al.* 1997) son los más comunes aislados de varios tejidos de alfalfa, maíz, algodón, pepino, uva, limón, remolacha dulce, y tomate. Por su parte Thomas *et al.* (2007) aislaron representantes de *Pantoea* sp., *Sphingomonas* sp. y *Enterobacter* sp. de papaya.

En este trabajo, los cambios más importantes en la población se detectaron en las raíces luego de la inundación, cuando la población mayoritaria pasa de fermentadora de glucosa (perteneciente a *Pantoea* sp.) a oxidadora o no utilizadora de dicho azúcar; y en las hojas cuando se comienzan a formar los granos. La mayoría de los aislamientos con perfiles de ARDRA únicos fueron aislados en hojas y raíz en la etapa de llenado de grano y en granos. Esto puede asociarse a que luego de la etapa de embarrigado los nutrientes disponibles para las bacterias disminuyen trasladándose a los granos (Pimentel, 1998). De esta forma, la población de bacterias establecidas en hojas y raíz se vería afectada, teniendo ahora que competir con otras bacterias capaces de competir con la planta por tales nutrientes .

En este trabajo se recuperaron aislamientos de *Sphingomonas* sp. en raíces en etapas tempranas, y luego de la inundación en hojas así como en granos luego de la cosecha. Es posible entonces que estas bacterias sean capaces de migrar hacia la parte aérea de la planta de arroz conforme avanza el desarrollo, y establecerse en los granos en cuanto estos comienzan a formarse. Lo mismo puede suceder con las bacterias del género *Pantoea* y *Pseudomonas*, las cuales también se aislaron de raíces, hojas y granos. Según Mc Inroy & Kleoper (1995) y Sturz *et al.* (1997) las bacterias presentes en la raíz pueden ser transportadas a las partes aéreas de diferentes cultivos. A pesar de que se ha reportado que la población de endófitos de hojas y raíces de plantas de arroz es

diferente (Mano *et al.* 2008), muchas especies bacterianas son comunes en tallos y raíces de maíz dulce y algodón (Mc Inroy & Kleoper 1995). De las bacterias del interior de tallos de maíz dulce y algodón, el 93 y el 94% están también presentes en las raíces, respectivamente. Por su parte Sturz *et al.* (1997) determinaron que el 87 y el 58% de endófitos aislados de raíz son similares a los obtenidos en las hojas inferiores y superiores de trébol rojo, respectivamente.

Por su parte, se aislaron cepas de *Burkholderia* sp. de raíz en las cuatro etapas del desarrollo del cultivo evaluadas y de hoja sólo en la etapa de macollaje. Las especies endófitas de *Burkholderia* están recibiendo más atención en los últimos años, ya que son capaces de fijar nitrógeno, y tienen potencial como promotores de crecimiento vegetal. Se aislaron representantes de *Burkholderia* sp. de varios cultivos (Rosenblueth *et al.* 2006) incluidos caña de azúcar (Mendes *et al.* 2007, Oliveira *et al.* 2002), arroz (Baldani *et al.* 2000), vid (Compant *et al.* 2005) y granos de maíz (Estrada *et al.* 2001).

En esta tesis se identificaron aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas* en raíces durante el llenado de grano, en hojas en todos los muestreos y también en granos. Cho *et al.* 2007 encontraron aislamientos identificados como *Pseudomonas* sp. en raíces de tres variedades de ginseng; por su parte Prakamhang *et al.* 2009 aislaron *Pseudomonas* sp. en hojas de arroz.

P. ananatis fue la especie mas frecuentemente aislada, se obtuvieron aislamientos de esta especie en hoja y raíz de los cuatro momentos del desarrollo del cultivo evaluados y en granos luego de la cosecha. Mano *et al.* 2007 aislaron representantes del género *Pantoea* de hojas y granos, pero no de raíz en la etapa de maduración del cultivo. Aunque en este trabajo se obtuvieron bacterias de este género en raíces en la etapa final del cultivo, su número fue bajo (10% respecto al total de productores de sideróforos). Prakamhang *et al.* 2009 identificaron

aislamientos obtenidos de tallo de arroz como *P. agglomerans*. A su vez, se ha reportado el aislamiento de cepas de *P. ananatis* de caña de azúcar (Mendes *et al.* 2007).

En los ensayos preliminares del estudio de la población de endófitos de hoja en las cosechas 2005 y 2006 se vio que el género predominante era *Pantoea*. Esto se confirmó al evaluar su presencia en todo el desarrollo del cultivo. La población que acompaña a *Pantoea* sp. tanto en hoja como en raíz es muy diversa, pero hay un grupo importante de bacterias que tienen en común la capacidad de sintetizar sideróforos y producir indoles. Luego de la inundación, en la raíz se establecen bacterias que producen mayores niveles de sideróforos, mostrando la importancia de esta característica a la hora de selección por parte de la planta de las bacterias endófitas. La población de fermentadoras en hoja se ve modificada una vez que empieza el desarrollo de los granos, apareciendo bacterias con perfiles de ARDRA que fueron específicos de ese momento.

La falta de una asociación entre los perfiles BOX con los momentos o tejidos de los cuales fueron aisladas refutaría la hipótesis de migración de una población determinada de la especie *Pantoea ananatis* establecida en la planta. Es posible plantear la hipótesis entonces que la o las cualidades que hacen a estas bacterias buenas colonizadoras del cultivo de arroz en Uruguay pertenecen a la especie, y no a una cepa específica. La presencia de bacterias del género *Pantoea* en granos junto con aislamientos identificados como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Sphingomonas* sugiere que estas bacterias tienen la capacidad de pasar de una generación a otra a través del grano, ya que se ha propuesto que los granos pueden ser fuente de endófitos (Mano *et al.* 2008). Aunque el rol de los endófitos presentes en las semillas es controversial (Hallmann, 1997), Mano *et al.* (2007) detectaron endófitos en granos de arroz en el orden de 10^2 a 10^6 UFC/ g peso fresco y encontraron muchas especies comunes a

grano y otros tejidos. Cepas de los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Sphingomonas* se identificaron como endófitos de granos de diferentes variedades de arroz (Cottin *et al.* 2000) y *Pantoea ananatis*, *Sphingomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. se aislaron del interior de granos de maíz (Rijavec *et al.* 2007).

4.3 Propiedades promotoras del crecimiento vegetal y antagonistas de bacterias endófitas aisladas de arroz.

La capacidad de sintetizar IAA está muy extendida entre bacterias del suelo y asociadas a plantas (Prakamhang *et al.* 2009). En los últimos años, el avance en la comprensión de las vías de señalización en plantas que involucran IAA ha sido espectacular. El papel del IAA en las bacterias no ha sido estudiado en tanto detalle hasta el momento, pero las investigaciones sobre los diversos aspectos de la señalización planta-bacteria han aportado al conocimiento de la síntesis bacteriana de IAA. A medida que se estudian más especies bacterianas, se comprende que el papel de las auxinas en las interacciones planta-microorganismo puede ser muy diverso cubriendo desde la patogénesis hasta la estimulación del crecimiento. Una serie de estudios recientes muestran que el IAA puede ser una molécula de señalización, tanto en especies bacterianas productoras como en especies no productoras de IAA (Spaepen *et al.* 2007).

Todos los aislamientos seleccionados en este trabajo produjeron IAA. Los mas altos niveles de producción se observaron en aislamientos de los géneros *Pseudomonas* (G6, G16 e I32), *Sphingomonas* (M7), *Burkholderia* (I2) y *Enterobacter* (M18). Se ha reportado la síntesis de esta fitohormona por parte de bacterias de las especies *Pseudomonas* (Prakamhang *et al.* 2009, Pedraza *et al.* 2004, Hernández *et al.* 2004, Berg *et al.* 2005), *Burkholderia* (Hernández *et al.* 2004, Mendes *et al.* 2007), *Sphingomonas* y *Pantoea* (Enya *et al.* 2007).

Aunque fijadores lentos o poco eficientes, los aislamientos G6 (*Pseudomonas* sp.), I20 (*Burkholderia cepacia*) y M18 (*Enterobacter* sp.) dieron positivo para la prueba de reducción de acetileno. Este es un método indirecto para evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, y se encuentra muy lejos de reproducir las condiciones naturales en donde es importante esta propiedad.

Se ha reportado la fijación biológica de nitrógeno en *Pseudomonas* sp. y *Enterobacter* sp. aisladas de hojas y tallos arroz, respectivamente (Prakamhang *et al.* 2009). Varios autores encontraron cepas de *Burkholderia* aisladas de arroz (Baldani *et al.* 2000, Sampaio *et al.* 2009) capaces de fijar N. La baja proporción de fijadores de N obtenidos en este trabajo probablemente se deba a que los métodos de aislamiento utilizados no estaban dirigidos específicamente a las bacterias diazotróficas.

Una de las causas que afectan el rendimiento de arroz es la incidencia de enfermedades. El cultivo de arroz en Uruguay es sensible a dos hongos patógenos: *Sclerotium oryzae* (SO), causante de la podredumbre del tallo, y *Rhizoctonia oryzae sativae* (ROS), responsable de la mancha agregada o manchado confluyente (Beldarrain & Ávila 2002).

La podredumbre del tallo genera manchas en las vainas foliares y lo que se visualiza como manchas irregulares de color castaño claro, rodeadas de un borde más oscuro. En ataques severos producen la muerte de vainas y de hojas, y por último, el vuelco de las plantas.

En nuestro país se aplica una mezcla de fungicidas (Hexaconazol + Kresoxim metil) (www.laguiasata.com), en un 25 a 30% del área sembrada, dependiendo de las condiciones climáticas. El INIA recomienda hacer un seguimiento del cultivo en sus distintas fases de desarrollo, observando síntomas

de las enfermedades para decidir si es necesario o no su aplicación (Deambrosi 1996).

Se considera que las enfermedades seguirán en ascenso, producto del efecto acumulativo del hongo a través de los esclerocios (Molina *et al.* 2001), los cuales pueden permanecer en el suelo por largo tiempo, y por no establecerse un control eficiente de los mismos.

Es por esto que la búsqueda de agentes de control biológico que puedan disminuir la carga inicial infectiva del hongo e incorporarse al manejo de la enfermedad, constituye un reto y una vía más para disminuir las pérdidas y la contaminación ambiental.

La producción de sideróforos es uno de los mecanismos a los cuales se atribuye el control biológico de hongos fitopatógenos por parte de bacterias endófitas (Miethke & Marahiel, 2007). En este trabajo, la mayor capacidad antagonista frente a los fitopatógenos del cultivo de arroz en Uruguay, ROS y SO, se obtuvo en aislamientos de *Burkholderia* sp., *Sphingomonas* sp. y *Pantoea ananatis*. Previamente, Mendes *et al.* (2007) reportaron cepas de *Burkholderia*, productoras de IAA, como antagonistas de *F. moliniforme* en caña de azúcar. Li *et al.* 2009 determinaron que los endófitos aislados de raíces de algodón antagonistas de *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum* son productores de sideróforos y que mayoritariamente pertenecen a los géneros *Enterobacter* (17 de 39) y *Pantoea* (14 de 39). Entre los antagonistas de hongos patógenos de papa se destacan los aislamientos de *Pseudomonas* sp. (Berg *et al.* 2005). Aunque se encontró que el principal mecanismo por el cual *Pseudomonas* sp. aisladas de rizósfera de arroz antagoniza *in vitro* a *P. infestans*, es la producción de sideróforos en bajas concentraciones de hierro (Torres *et al.* 2000), los aislamientos de *Pseudomonas* sp. productores de sideróforos obtenidos en este trabajo no fueron capaces de inhibir el crecimiento de los fitopatógenos evaluados.

Los ensayos de competencia *in vitro* entre las cepas endófitas seleccionadas y las PGPB, *A. brasilense* y *H. seropedicae*, mostró diferentes tipos de interacción: la cepa G16 (*Pseudomonas sp.*) fue capaz de inhibir el crecimiento de ambas PGPB. Por su parte, G7 (*C. sakazakii*) inhibió únicamente el crecimiento de *A. brasilense*, mientras que I20 (*B. cepacia*) y M8 (*P. ananatis*) inhibieron a *H. seropedicae* pero no a *A. brasilense*. Por su parte, el crecimiento de M7 fue inhibido por *A. brasilense*.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos muestran que la población de productores de sideróforos endófitos asociados a raíces, hojas y granos de arroz está representada por un grupo de bacterias diversas, siendo mayoritarios los aislamientos de los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Enterobacter*, siendo *P. ananatis* la única especie presente en todos los tejidos y momentos del desarrollo evaluados.

Los resultados muestran que las cepas estudiadas producen, además de sideróforos, ácido indol acético. La reducción de acetileno, el antagonismo de hongos fitopatógenos y la competencia con PGPB con potencial uso como inoculantes en el cultivo, estuvieron presentes en algunos de los aislamientos obtenidos.

Aunque se ha demostrado la ubicuidad de las bacterias de *P. ananatis*, y su fuerte asociación al cultivo de arroz en Uruguay, no se puede atribuir este comportamiento a la síntesis de sideróforos o de IAA, ya que esta propiedad también está presente en aislamientos de otros géneros.. Otras cualidades evaluadas son menos comunes en este grupo de aislamientos. La distribución de especies en los tejidos o en los momentos de desarrollo del cultivo indica que no hay una asociación estrecha entre estas variables. La diversidad a nivel de cepa detectada para los aislamientos identificados como *P. ananatis* tanto en hojas luego de la cosecha como en las cuatro etapas del desarrollo del cultivo evaluadas permite plantear que la población de estas bacterias sea altamente dinámica, desplazando una cepa a la otra durante el desarrollo del cultivo, no habiendo una cepa dominante asociada a la planta de arroz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACA, Asociación de cultivadores de arroz. EL cultivo en Uruguay. (En línea) www.aca.com.uy/el_cultivo.html [Consulta: Marzo de 2010].

Agrios G. 1997. *Plant pathology*, 4ta ed. San Diego, Academic Press, Inc., New York, Kelly D. Sonnak (Ed) p: 635.

Alvindia D, Natsuaki K. 2009 *Biocontrol activities of Bacillus amyloliquefaciens DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens* Crop Protection 28:236–242.

Anjum, M.; Sajjad, M.; Akhtar, R.; Qureshi, M.; Iqbal, A.; Jami, A. and Hasan, M. 2007. *Response of cotton to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation under different levels of nitrogen*. J. Agric. Res., 45:2, 135-143.

Bais, H.P. Weir, T. Perry, L. Gilroy, S. Vivanco, J. 2006 *The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms*. Annu Rev Plant Biol. 57:233–266.

Baldani V, Baldani J, Dobereiner J. 1987. *Inoculation Of Field Grown Wheat With Azospirillum Spp. In Brasil*. Biology and Fertility of Soils. 4 (1): 57-60, 1987.

Baldani V, Baldani J, Dobereiner J. 2000 *Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs Herbaspirillum seropedicae and Burkholderia spp.*. Biology and Fertility of Soils, Berlin,. 30: 485-491.

Barea J.M, Navarro E, Montoya E. 1976 *Production of Plant Growth Regulators by Rhizosphere Phosphate-solubilizing Bacteria*. J Appl Bacteriol. 40:129–134.

Barroquio W.L, Revilla L, Ladha K.K. 1997 Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil* 194: 15-24.

Bashan Y, de-Bashan L.E. 2005 *Bacteria: Plant growth promoting*. Encyclopedia of soil in the environment. ed. Hillel, Elsevier, Oxford. 1:103-115.

Batista J. 2002 *Fertilización de arroz*. Hoja informativa electrónica EEA, Concepción del Uruguay, 63. Disponible en: www.inta.gov.ar/concepcion/informacion/boletines/hie/02/63.htm

Beldarain G, Ávila S. 2002 *Análisis de las poblaciones de Sclerotium oryzae y Rhizoctonia oryzae sativae en suelo y su interacción con el cultivo de arroz*. En Arroz: Resultados experimentales 2001-02. Serie actividades de difusión INIA 6:2-11.

Berg G, Roskot N, Steidle A, Eberl L, Zock A, Smalla K. 2002 *Plant-Dependent Genotypic and Phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from Different Verticillium Host Plants*. *Appl Environ Microbiol* 68(7):3328-3338.

Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R, Ulrich A, Hallmann J. 2005 *Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi*. *FEMS Microbiol Ecol* 51:215–229.

Bell C, Dickie G, Harvey L, Chan J. 1995 *Endophytic bacteria in grapevine*. Can J Microbiol. 41(1): 46–53.

Blanco 2006. Variedades de arroz liberadas por el INIA. Disponible en: http://www.aca.com.uy/_oldsite/investigacion.html.

Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis RP. 1989 *Identification of Gibberellins A1, A3, and isoA3 in cultures of Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol 90:45–47.

Bottini R, Cassán F, Piccoli P. 2004 *Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase*. Appl Microbiol Biotechnol 5:497–503.

Canzani F, Vitola G, Dutto P y Labandera C (1998) Cuantificación y aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno en arroz. En “Arroz. Resultados experimentales 1997-1998” INIA Treinta y Tres Actividades de difusión N° 166.

Cassan F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Pennat C, Luna V. 2009 *Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (Zea mays L.) and soybean (Glycine max L.)*. Europ J Soil Biol 45:28-35.

Castignetti D, Smarrelli J 1986 *Siderophores, the iron nutrition of plants and nitrate reductases*. FEBS Lett 209:147–151.

Chaudhary R, Nanda J, Tran D. 2003. *Guía para identificar las limitaciones de campo de la producción de arroz*. Departamento de Agricultura, FAO, Roma, ISBN: 9253046848.

Chincholkar SB, Chaudhari BL, Talegaonkar SK, Kothari RM 2000 *Microbial iron chelators: a sustainable tool for the biocontrol of plant disease*. en Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture. Upadhyay RK, Mukerji KG, Chamola PC (Eds) p: 49–70.

Chincholkar S.B. Chaudhari B.L. & Rane M.R. 2007 *Microbial Siderophore: A State of Art* en Microbial Siderophores, Ajit Varma & Sudhir Chincholkar (Eds.) p:233-242.

Chincholkar S.B. Chaudhari B.L. & Rane M.R. 2007b *Microbial siderophores in human and plant health-care* en Microbial Siderophores, Ajit Varma & Sudhir Chincholkar (Eds.) p: 205-217.

Cho K, Young Hong S, Mi Lee S, Hee Kim Y, Gjung Kahng G, Pyo Lim P, Kim H, Dae Yun H. 2007 Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microb Ecol* 54:341–351.

CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1982. Fertilización nitrogenada del arroz. Guía de estudio 40. Disponible en: http://webapp.ciat.cgiar.org/biblioteca/biblioteca_es/inicio.htm

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka E. 2005. *Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles,*

Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl Environ Microbiol 71(9):4951–4959.

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka E. 2005 *Endophytic Colonization of Vitis vinifera L. by Plant Growth-Promoting Bacterium Burkholderia sp. Strain PsJN.* Appl Environ Microbiol 71(4):1685-1693.

Cottin B, Regalado E, Lanoot B, de Cleene M, Mew T, Swings J. 2000 *Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment.* Phytopathology 91: 282-292.

Crowe D, Wang Y, Reid C, Szaniszlo P. 1991 *Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and Plants.* Plant Soil 130:179-198.

Crowley D, Reid P, Szaniszlo P. 1988 *Utilization of Microbial Siderophores in Iron Acquisition by Oat.* Plant Physiol 87:680-685.

Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T. 2000 *Biosynthesis of hormones and elicitor molecules.* En: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (Eds) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiology, Rockville, 850–929.

Datta C, Basu PS. 2000 *Indole acetic acid production by a Rhizobium species from root nodules of a leguminous shrub, Cajanus cajan.* Microbiol. Res. 155:123-127.

Dembrosi E. 1996 *Plaguicidas utilizados en el cultivo de arroz.* En Revista Arroz, N° 7; ACA.

Doberman A, Fairhurst T. 2000 *Rice. Nutrient disorders & nutrient management*. International Rice Research Institute (IRRI). Singapore, MY.

Duijff B, Meijer J, Bakker P, Schippers B. 1993 *Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent Pseudomonas spp.* Neth J Path 99:277-289.

Enya J, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi T, Suyama K, Tsushima S. 2007 *Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents.* Microb Ecol 53:524–536.

Estrada P, Bustillos R, Cabalero J. 2001 *Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution.* Appl Environ Microbiol. 67(6):2790-2798.

FAO. Año internacional del arroz.(En línea) http://www.fao.org/rice2004/es/index_es.htm. [Consulta: Marzo 2010].

Faraldo Gomez J. 2007 *Protein-mediated siderophore uptake in gram-negative bacteria: a structural perspective* en Microbial Siderophores. Ajit Varma & Sudhir Chincholkar (Eds.) p:105-120.

Fernández Mañay J, Ferrando L, Macazaga V, Fernández A. 2005. *Diversidad de bacterias endófitas en cultivos de arroz en Uruguay.* Estudios preliminares. Agrocienza, IX,1y 2: 285-290.

Ferreras J, Ryu J, Di Lello F, Tan D, Quadri LE. 2005 *Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis and Yersinia pestis*. Nat Chem Biol. 1(1): 29-32.

Forni C, Riov J, Grilli Caiola M, Tel-Or E. 1992 *Indole-3-acetic acid (IAA) production by Arthrobacter species isolated from Azolla*. J Gen Microbiol. 138(2):377–381.

Glickmann E, Dessaux Y. 1994 *A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopatogenic bacteria*. Appl Environm Microbiol 61(2):793-796.

Guimarães S, Silva R, Santos C, Baldani J.I, Baldani V. 1999. *Infecção e colonização de raízes de arroz de sequeiro por bactérias diazotróficas endofíticas*.. Comunicado Técnico Embrapa Agrobiologia, Seropédica- RJ.

Hammer Ø, Harper D.A.T, Ryan P, 2001 PAST: *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. Paleontología Electrónica 4(1):9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Hallmann J, Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F, Kloepper J. 1997 *Bacterial endophytes in agricultural crops*. Can J Microbiol 43:895–914.

Hardoim P, van Overbeek L, van Elsas J. 2008 *Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth*. Trends Microbiol. 16(10):463-471.

Hofte M & Bakker P. 2007 *Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. Microbial Siderophores, Varma, Ajit; Chincholkar, S.B. (Eds.). p: 121.

INIA, Instituto Nacional de investigación Agropecuaria 2008. inia.com.uy/online [Consulta: Marzo de 2010].

Jeounghyun R, Munusamy M, Selvaraj, P, Woojong Y, Pandiyan I, Kyounga K, Rangasamy A, Jongchul Y, Hoon Kim K, Tongmin S. 2006 *Plant growth substances produced by Methylobacterium spp. and their effect on tomato (Lycopersicon esculentum L.) and red pepper (Capsicum annuum L.) growth*. J Microbiol biotech 16(10):1622-1628.

Kloepper JW. Leong J. Tientze M. Schroth MN 1980 *Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils*. Curr Microbiol 4:317–320.

Kloepper J, Beauchamp C. 1992 *A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria* Can. J. Microbiol. 38(12): 1219–1232.

Kögl F, Kostermans D. 1934. *Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen*. XIII. Isolierung aus Hefe. Z Phys Chem 228:113–121.

Labandera C, Punschke K, Carlomagno M. 2004 Desarrollo de inoculantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno en arroz. En “Arroz. Resultados experimentales 2003-2004” INIA Treinta y Tres Actividades de difusión N° 373.

Li, CH.; Zhao, MW.; Tang, CM. & Li, SP. 2009 *Population Dynamics and Identification of Endophytic Bacteria Antagonistic Toward Plant-Pathogenic Fungi in Cotton Root*. Microb Ecol. 59(2): 344-356.

Loaces I, Ferrando L, Fernández A. 2008a *Caracterización de cepas del género Pantoea endófitas de hojas de arroz (Oryza sativa)*. Presentación oral. XVI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM.

Loaces, I., Ferrando, L., Fernández A. 2008b *Persistencia y diversidad genética y funcional de cepas de Pantoea aisladas de arroz (Oryza sativa) en Uruguay*. Presentación oral. VIII Encuentro Nacional de Microbiólogos de la Sociedad Uruguaya de Microbiología (SUM).

Macmillan J, Suter PJ. 1958 *The occurrence of gibberellin A1 in higher plants: isolation from the seed of runner bean (Phaseolus multiflorus)*. Naturwissenschaften 45(2):46.

Magalhaes F, Baldani JI, Souto S, Kuykendall J, Döbereiner J. 1983 *A new acid-tolerant Azospirillum species*. An Acad Bras Cienc. 55:417-430.

Mano H, Tanaca F, Nakamura C, Kaga H, Morisaki H. 2007 *Culturable endophytic bacterial flora on the maturing leaves and roots of rice plants (Oryza sativa) cultivated in a paddy field*. Microb Environm 22(2):175–185.

Mano H, Morisaki H. 2008 *Endophytic bacteria in the rice plant*. Microb Environm 23(2): 109-117.

Marin V, Baldani V, dos Santos-Teixeira K, Baldani JI. 1998 *Fijación biológica de nitrógeno: bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical*. EMBRAPA-AGROBIOLOGIA, Seropedica, Río de Janeiro, Brasil.

Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. 2008 *Selección de aislamientos de Trichoderma spp. candidatos a biofungicidas para el control de Rhizoctonia sp. en arroz*. R Prot Veg. 23(2):118-125.

Mc Inroy A, Kloepper J. 1995 *Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn*. Plant Soil 173(2):337–342.

Méndez J. 2009 *Producción vegetal: arroz*. Anuario estadístico agropecuario DIEA, MGAP. Disponible en: www.mgap.gub.uy/diea

Mendes R, Pizzirani-Kleiner, Araujo W, Raaijmakers M. 2007 *Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates*. Appl Environ Microbiol 73(22):7259-7267.

Mercado-Blanco J, Drift K, Olsson P, Thomas-Oates J, VanLoon L & Bakker P. 2001 *Analysis of the pmsCEAB Gene Cluster Involved in Biosynthesis of Salicylic Acid and the Siderophore Pseudomonine in the Biocontrol Strain Pseudomonas fluorescens WCS374.J*. Bacteriol. 183(6):1909–192.

Mercado-Blanco J, Bakker P. 2007 *Interactions between plants and beneficial Pseudomonas spp.: exploiting bacterial traits for crop protection*. Antonie van Leeuwenhoek 92:367–389.

Miethke M, Marahiel M. 2007 *Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control*. Microbiol Mol Biol Rev. 71(3): 413–451.

Molina Ochoa. 2001 Manejo de los insectos plaga del arroz. Libro electrónico de la Universidad de Minnesota. Radcliffe E, Hutchison W (Eds.) <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/arrozSp.htm>

Naiman, A., Latrónico, A., García de Salamone, I. 2009 *Inoculation of wheat with Azospirillum brasilense and Pseudomonas fluorescens: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora* Eu J Soil Biol 45: 44–51.

Oliveira A, Urquiaga S, Dobereiner J, Baldani J. 2002 *The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants* . Plant & Soil 242(2): 205-215.

Olmos S. 2007 *Apunte de morfología, fenología, ecofisiología y mejoramiento genético del arroz*. Publicaciones Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Argentina.

O' Sullivan D, O'Gara F. 1992 *Traits of Fluorescent Pseudomonas spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens*. Microbiol Rev. 56(4):662-676.

Patten C, Gli, B. 1996 *Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid*. Can J Microbiol 42(3):207–220.

Pedraza R, Ramírez-Mata A, Xiqui M, Baca B. 2004 *Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria*. FEMS Microbiol Lett 233: 15-21.

Pishchik V, Provorov N, Vorobyov N, Chizevskaya E, Safronova V, Tuev A, Kozhemyakov A. 2009 *Interactions between Plants and Associated Bacteria in Soils Contaminated with Heavy Metals*. Microbiol 78(6):785-793.

Piccoli P, Lucangeli D, Schneider G, Bottini R. 1997 *Hydrolysis of [17,17-2H₂] Gibberellin A20-Glucoside and [17,17-2H₂] Gibberellin A20-glucosyl ester by Azospirillum lipoferum cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium*. Plant Growth Regul 23:179–182.

Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtai song K, Boonkerd N, Teaumroong N. 2009 *The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (Oryza sativa L.)*. Appl Soil Ecol 142(2):141–149.

Rao V, Ramakrishnan B, Adhya T, Kanungo P, Nayak D. 1998 *Review: Current status and future prospects of associative nitrogen fixation in rice*. W J Microbiol Biotech 14:621-633.

Rijavec T, Lapanje A, Dernastia M, Rupnik M. 2007 *Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels*. Can J Microbiol 53(6):802-808.

Rives N, Acebo Y, Hernández A. 2007 *Baterías promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (oryza sativa L.)*. Perspectivas de su uso en cuba. Reseña bibliográfica; Cultivos tropicales 28(2):29-38.

Rodriguez G, Smith I. 2003 *Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence*. Mol Microbiol 47(6):1485–1494.

Rodriguez N. 1986. Suma Phtopatologica, Campinas, 12(1):16.

Rosenblueth M, Martinez-Romero E. 2006 *Bacterial endophytes and their interactions with hosts*. Mol Plant Microb Interact. 19:827– 837.

Sampaio S, Simões J, Silva L, Baldani V, Baldani I. 2009 *Occurrence and diversity of nitrogen-fixing Sphingomonas bacteria associated with rice plants grown in Brazil*. FEMS. Microb lett. 239(1):11-19.

Schwyn B, Neilands J. 1987 *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Anal Bioch 160:47-56.

Stoltzfus J, So R, Malarvithi P, Ladha J, de Bruijn F. 1997. *Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen*. Plant Soil 194:25–36.

Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J. 1997 Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. Biol Biofertility Soils 25:13–19.

Suzuki S, He Y, Oyaizu H. 2003 *Indole-3-acetic acid production in Pseudomonas fluorescens HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch*. Curr Microbiol. 47(2):138–143.

Spaepen JV, Remans R. 2007 *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*. FEMS Microbiol Rev 31:425–448.

Terra J, Méndez R, Deambrosi E. 2009. *Efecto de distintas alternativas de cultivos de cobertura invernal sobre la respuesta a N en el cultivo de arroz de*

siembra directa. Arroz Resultados experimentales 2008-09. INIA Treinta y Tres, Actividades Difusión 571 (3): 59-68.

Thomas P, Kumari S, Swarna G, Gowda T. 2007 *Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo*. Can J Microbiol. 53(3): 380-390.

Tien T, Gaskina M, Hubbell D. 1979 *Plant growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (Pennisetum americanum L.)*. Appl Environm Microbiol 37(5):1016–1024.

Torres M, Valencia S, Bernal J, Martinez P. 2000 *Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere*. R Lat Microbiol 42:171-176.

Tsavkelova EA, Klimova S, Cherdyntseva T, Netrusov A. 2006 *Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review*. Appl Biochem Microbiol 42(2):117–126.

Van Overbeek L, van Elsas JD. 2008 *Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (Solanumtuberosum L.)*. FEMS Microbiol Ecol 64:283–296.

Verma S, Ladha J, Tripathi A. 2001 *Evaluation of plant growth promoting and ability of endophytic diazotrophs from deep water rice*. J Biotechnol 91:127-141.

Wandersman C, Delepelaire P 2004 *Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores*. Annu Rev Microbiol 58:611–647.

Wilkinson K, Dixon K, Sivasithamparam K, Ghisalberti E. 1994 *Effect of IAA on Symbiotic Germination of an Australian Orchid and Its Production by Orchid-associated Bacteria*. Plant Soil 159:291–295.

White R. 1987 *Indol-3-acetic acid and 2-(indol-3-ylmethyl) indol-3-yl acetic acid in the thermophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius*. J Bacteriol.169(12):5859–5860.

IV. ANEXOS

ANEXO 1

ENSAYOS DE INOCULACIÓN Y CO- INOCULACIÓN

RESUMEN

El uso de inoculantes biológicos es una práctica que protege el medio ambiente porque contribuye a la disminución del uso de agroquímicos. Debido a esto, se han aislado, identificado y ensayado muchas bacterias capaces de promover el crecimiento vegetal (PGPB). Los mecanismos por los cuales estos microorganismos promueven el desarrollo de las plantas incluyen la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, como hierro o fosfato, la síntesis de fitohormonas y el antagonismo de patógenos. La competencia por nutrientes y nichos entre la población nativa y las cepas inoculadas puede causar fallas en los tratamientos que emplean inoculantes biológicos.

En esta parte del trabajo se determinó, en ensayos de invernáculo que la variedad de arroz INIA Olimar es capaz de responder a la inoculación con *A. chroococum*, *A. brasilense* y *H. seropedicae*, aumentando el peso fresco de las raíces en 113, 60 y 32%, respectivamente. También se observó que el efecto benéfico de *H. seropedicae* disminuye cuando esta bacteria es co- inoculada con bacterias endófitas aisladas de semillas de arroz.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias utilizadas en inoculantes biológicos.

Bacterias de diversos géneros como *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* frecuentemente son colonizadores de importantes cultivos incluyendo arroz, trigo, caña de azúcar o maíz y son capaces de promover el crecimiento vegetal de manera directa o indirecta (Anjum *et al.* 2007).

Las bacterias más utilizadas como PGPB son las del género *Azospirillum* (Naiman *et al.* 2009). El potencial de estas bacterias para incrementar el rendimiento de los cultivos fue descrito hace ya más de 20 años (Baldani *et al.* 1987). Los efectos positivos que provoca en el crecimiento vegetal involucran diferentes mecanismos como producción de fitohormonas, fijación biológica de nitrógeno y promoción del crecimiento radicular. El contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y varios micronutrientes aumenta en plantas inoculadas con *Azospirillum*, a la vez que se han observado rendimientos significativamente mayores en trigo, maíz, soja y arroz cuando las plantas se inoculan (Cassán y García, 2008).

Varios aislamientos de *Pseudomonas* se han descrito como PGPB. Una de las propiedades importantes de estas cepas es la solubilización de fosfato, lograda mediante la producción de ácidos orgánicos (como oxálico, fumárico y cítrico) o de fosfatasas. Además, se ha demostrado que algunas cepas son capaces de sintetizar distintas citoquininas y muchos autores reportaron que dentro de este género es común la síntesis y excreción de sideróforos por bacterias rizosféricas o endófitas (Hernández *et al.* 2004; Kloepper *et al.* 1980; Rodríguez *et al.* 1997; Teintze *et al.* 1981).

Azotobacter sp. es una bacteria aeróbica diazotrófica de vida libre, encontrada frecuentemente en suelos. Un gran número de experimentos revelan que la inoculación de cereales con estos microorganismos resulta en un aumento en rendimiento y contenido de N en las plantas (Abbasdokht, 2008). La inoculación con *A. chroococum* produce un aumento en la cantidad de pelos radiculares y materia seca, contenido de nitrógeno y rendimiento en la cosecha en trigo (Ishac

et al. 1986). Varios estudios muestran que el uso de *A. chroococum* como inoculante no es sólo efectivo en la fijación de N, sino también en otras propiedades como la producción de hormonas, producción de sustancias fungicidas, producción de sideróforos y solubilización de fosfato (Abbasdokht, 2008).

Las bacterias del género *Herbaspirillum* fueron descritas como bacterias gram negativas, fijadoras de nitrógeno microaerófilas, asociadas a raíces de arroz, maíz y sorgo (Baldani *et al.* 1886). La capacidad de *H. seropedicae* de fijar nitrógeno fue demostrada por reducción de acetileno e incorporación de $^{15}\text{N}_2$ en medio JNFb semisólido sin nitrógeno. *Herbaspirillum* spp. se han aislado del interior de raíces, tallos y hojas de muchas gramíneas (Baldani *et al.* 1992; Döbereiner *et al.* 1994; Olivares *et al.* 1996).

1.2 Interacción entre PGPB y bacterias nativas endófitas del cultivo de arroz.

Para obtener beneficios mediante inoculación de PGPB se requiere conocer cuáles son las características de los microorganismos presentes naturalmente en la planta. La competencia entre cepas nativas, fuertemente asociadas al cultivo, con bacterias PGP con potencial uso como inoculantes en arroz, es un punto crítico que rara vez ha sido evaluado. Los ensayos in vitro de cultivos duales de endófitos de arroz y cepas de *Azospirillum* y *Herbaspirillum* mostraron que existen distintos tipos de interacción entre las cepas estudiadas (Tabla 3.3).

El uso de PGPB como biofertilizantes ha tenido resultados inconsistentes, parte de los cuales pueden explicarse por el antagonismo entre las bacterias inoculadas y la población nativa endófito o presente en el suelo (Bacilio-Jimenez *et al.* 2001). La cepa inoculada debe competir mejor y tener una asociación más específica con la planta que los microorganismos nativos del suelo o los endofíticos para predominar y desarrollar su capacidad promotora del crecimiento (Pereira & Baldani, 1995).

Los ensayos de co- inoculación aportarían información a tener en cuenta a la hora de definir la utilidad de la adopción de bacterias PGP aisladas y evaluadas en otras regiones para aplicar en el cultivo de *O. sativa* en Uruguay. Es por esto que en el presente trabajo se plantean ensayos de co- inoculación de cepas PGP y bacterias endófitas aisladas de tejidos de arroz de Uruguay.

Inicialmente, para esta parte del trabajo de tesis se seleccionaron las cepas G16, capaz de inhibir el crecimiento de *A. brasilense* y *H. seropedicae* in vitro, y G6, buena productora de IAA y con la capacidad de fijar nitrógeno. Lamentablemente, ocurrió una contaminación en la colección de aislamientos, y se purificaron los contaminantes de estas dos cepas. Esto se verificó recién después de los ensayos que se describen a continuación, por lo cual no se pudo remediar a tiempo esta situación.

La cepa que se inoculó en lugar de G16 se identificó posteriormente como *Cronobacter sakazakii* (98% similitud de secuencia en el gen 16S rDNA), encontrada también en este trabajo como endófito de grano (cepa G7). Por su parte, G6 se contaminó con un microorganismo externo a la colección, con una secuencia similar a *Enterobacter* sp. (94% de similitud).

A pesar de estos acontecimientos, esta parte del trabajo tiene el valor del entrenamiento en ensayos en invernadero con plantas y en técnicas de inoculación y recuperación de cepas inoculadas.

II.MATERIALES Y METODOS

2.1 Diseño del ensayo de invernáculo.

Previo a la instalación de los ensayos se evaluó la tasa de germinación de las semillas de arroz a inocular. Con este fin se sembraron en Agar-agua (10g agar/L) 10 granos cosechados de cada una de las 4 parcelas utilizadas en la primera parte de este trabajo. Se incubaron a 30°C durante 48hs y se determinó la tasa de germinación como el porcentaje de semillas germinadas respecto al total.

El suelo utilizado para el ensayo en macetas provenía del campo experimental de EMBRAPA Agrobiología. Sus características se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo utilizado para el ensayo de invernáculo.

pH en H ₂ O	Al cmolc/dm ³	Ca+Mg cmolc/dm ³	Ca cmolc/dm ³	Mg mg/dm ³	P mg/dm ³	K mg/dm ³
5,25 ± 0,2	0,05 ± 0,1	4,2 ± 0,8	3,35 ± 0,8	0,8 ± 0,1	18,9 ± 9,3	57,0 ± 4,2

En macetas de 5 L se colocaron 3 Kg de tierra no esterilizada. Se fertilizó con solución líquida de Leonard, tres días antes de la siembra; por hectárea se aplicaron: KCl 4,95g, K₂HPO₄ 1,66g, KH₂PO₄ 3,32g, CaSO₄.2H₂O 11,4g, MgSO₄.7H₂O 16,3g, CuSO₄.5H₂O 2,49mg, ZnSO₄.7H₂O 7,30mg, MnSO₄.2H₂O 6,64mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0,33g, FeSO₄.7H₂O 0,166g y ácido cítrico 0,166g. Se mantuvo la humedad del suelo a capacidad de campo hasta el momento de la inundación, la cual se realizó a los 35 días de cultivo, cuando las plantas tenían una altura de 40cm.

En cada maceta se colocaron 5 semillas no esterilizadas de arroz (*Oryza sativa* var. Olimar) cosechadas de las parcelas 3 y 4 correspondientes a la parte anterior de este trabajo ya que fueron las que presentaron mejores porcentajes de germinación. Se diseñaron 10 tratamientos en bloques al azar con 4 repeticiones cada uno. Los tratamientos difieren en la cepa inoculada: 1) cepa G16A de *Cronobacter sakazakii*, 2) cepa G6B, 3) cepa 245 de *Azospirillum brasilense*, 4)

cepa Z94 de *Herbaspirillum seropedicae* y 5) cepa AC2 de *Azotobacter chroococum*; 6) co-inoculación con G16A- *A. brasilense*, 7) G6B- *A. brasilense*, 8) G16A- *H. seropedicae* y 9) G6B- *H. seropedicae* y 10) control negativo sin inocular. Al momento de la siembra se adicionó 1ml de inoculante (10^8 ufc/ml en medio DYGS) sobre cada semilla.

2.2 Recuperación y recuento de cepas inoculadas y asociadas.

A los 30 y 45 días post siembra (DPS) se tomaron muestras de raíces y de parte aérea, formando un pool con varias plantas del mismo tratamiento. Las muestras se desinfectaron superficialmente con dos lavados consecutivos con hipoclorito de sodio al 5%, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril durante 5 minutos cada vez, y se homogeneizaron en licuadora. Se colocaron 5 g de muestra en 45ml de solución salina (NaCl 0,9%) y se prepararon diluciones seriadas para el recuento en los diferentes medios: heterótrofos totales en placas de LGI, *Azospirillum* en viales de NFb (NMP) y *Herbaspirillum* en viales de JNFb (NMP). Mientras que se determinó la presencia de *Azotobacter* en placas de ASBY. Las placas y viales se incubaron por 5 días a 30°C y se observaron diariamente.

Muestras de los viales con medio semi sólido que presentaron formación de película se re aislaron a medio sólido. Las colonias con morfología típica de *A. brasilense*, *H. seropedicae*, *A. chroococum*, G6B y G16A fueron re-aisladas y purificadas. Se realizó la restricción del gen 16S rDNA (ARDRA) para su caracterización molecular, comparando los perfiles de las cepas inoculadas con los de los aislamientos obtenidos en los medios sólidos luego de la selección por morfología de las colonias, según se describió en la sección de materiales y métodos de esta tesis.

2.3 Medidas de promoción de crecimiento y rendimiento de las plantas inoculadas.

Se colectaron plantas de los diez tratamientos y los cuatro bloques (40 macetas) a los 30 y 45 días de sembradas. Se determinó peso fresco al momento de la colecta por peso de raíces y parte aérea de cuatro plantas de cada tratamiento para poder calcular desviación estándar. Para la determinación de biomasa seca, se secaron las plantas en estufa de circulación forzada, a una temperatura constante de 65°C durante 48 horas y se determinó su masa.

Se determinó el incremento de masa respecto al control sin inocular como: $I = [(M \cdot 100) / m] - 100$, siendo M la masa del tejido a evaluar y m la masa del tejido del control sin inocular.

III. RESULTADOS

3.1 Tasa de germinación.

La evaluación de germinación de las semillas de arroz (*Oryza sativa* var. Olimar) determinó que existe gran variabilidad entre las cuatro parcelas evaluadas: la parcela 1 presentó un porcentaje de germinación de 50%, la parcela 2 de 40%, la parcela 3 de 70%, mientras que la parcela 4 una tasa de germinación del 80%. La presencia de hongos fue mayor en la parcela 2, seguido por la 1. Esto es concordante con las bajas tasas de germinación en estas parcelas. Debido a estos resultados se decidió realizar los ensayos en invernadero con un pool de semillas de las parcelas 3 y 4.

3.1 Recuperación de bacterias inoculadas.

A los treinta y cuarenta y cinco días post siembra (DPS) se realizó la colecta de raíces y parte aérea de las plantas con el fin de determinar el recuento total en medios específicos y si las bacterias inoculadas se encontraban asociados a los tejidos de la planta. Los resultados de los recuentos de bacterias obtenidas en placas de LGI y viales de NFb y JNFb se muestran en la Tabla 3.1.

En placas de LGI se obtuvieron unas pocas morfologías, algunas de las cuales se visualizaron en todos los tratamientos, inclusive en el control negativo sin inocular, por lo cual se corresponden a la población endófito propia del cultivo.

El recuento de heterótrofos en LGI varió entre Log 6,38 y 7,32 UFC/g peso fresco en raíz y Log 5,29 y 6,47 UFC/g peso fresco en parte aérea entre los diferentes tratamientos en el primer muestreo. Para el segundo muestreo (45 DPS) el recuento en LGI para los diferentes tratamientos fue mayor en raíz pero menor en parte aérea comparado con el obtenido a los 30 DPS.

Tabla 3.1. Número de bacterias detectadas en raíces y parte aérea de arroz a los 30 y 45 días post siembra (DPS) en placas de LGI y viales de NFb y JNFb.

	Número de células/ g raíz (log)						Número de células/ g parte aérea(log)					
	30 DPS			45 DPS			30 DPS			45 DPS		
	LGI	NFb	JNFb	LGI	NFb	JNFb	LGI	NFb	JNFb	LGI	NFb	JNFb
Ap	nd	6,37	nd	nd	5,60	nd	nd	nd	nd	4,90	nd	
Herb	nd	nd	6,25	nd	nd	6,25	nd	nd	5,39	nd	nd	5,50
G6B	6,45	nd	nd	7,12	nd	nd	6,27	nd	nd	5,79	nd	nd
G16A	6,46	nd	nd	7,26	nd	nd	6,11	nd	nd	4,98	nd	nd
G6B + Ap	nd	7,02	nd	6,79	4,91	nd	-	5,60	nd	4,73	3,87	nd
G6B + H	6,38	nd	5,61	6,71	nd	5,82	6,47	nd	5,23	0,95	nd	5,10
G16A + Ap	6,59	6271	nd	6,60	4,52	nd	5,71	4,87	nd	4,43	3,24	nd
G16A + H	6,49	nd	6,16	6,90	nd	5,99	5,41	nd	<2,0	4,25	nd	<2,0
C-	7,32	4,40	4,40	7,77	5,62	5,62	5,29	4,00	4,07	5,95	3,02	4,07

1- Ap-*A. brasilense*; 2- Herb- *H. seropedicae*; 3- C- control sin inocular; 4- nd – no determinado.

El recuento de diazótrofos capaces de crecer en NFb y en JNFb a los 30 DPS fue mayor en los tratamientos inoculados que en el control sin inocular, reflejo de la asociación de las cepas inoculadas al cultivo. No se obtuvo crecimiento en los viales de JNFb sembrados con muestras de parte aérea del tratamiento G16A+ H en ninguno de los muestreos.

En las dos colectas se verificó la presencia de *A. chroococum* asociada a raíces de las plantas inoculadas con este microorganismo, pero no en las hojas. Al tratarse de una bacteria de vida libre, con capacidad de asociarse y promover el crecimiento vegetal, *A. chroococum* no coloniza los tejidos aéreos en forma de endófito (Tabla 3.2).

Durante el primer muestreo, en placas de LGI se detectó la presencia de G6B en raíces de los tratamientos G6B y G6B +H, y hojas de G6B, G6B +H y G6B + Ap. Cabe aclarar que se perdieron los recuentos de raíces del tratamiento G6B + Ap debido a la presencia mayoritaria de actinomicetes. En el segundo muestreo se detectaron colonias similares a G6B sólo en las raíces de los

tratamientos G6B y G6B + Ap y en hojas de los tratamientos G6B, G6B + H y G6B + Ap (Tabla 3.2).

G16A fue recuperada en alto número en raíces y parte aérea de los tres tratamientos que contenían este microorganismo durante el segundo muestreo, pero no fue recuperada durante el muestreo realizado a los 30 DPS (Tabla 3.2).

En viales de NFb se recuperó *A. brasilense* a partir de muestras de raíces y parte aérea de los tratamientos Ap y G16A +Ap. Mientras que *H. seropedicae* se recuperó en viales de JNFb en muestras de los tratamientos H y G16A +H (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Recuperación de las bacterias inoculadas en ensayos de invernadero.

TRATAMIENTO	30DPS				45DPS			
	Raíces		P. aérea		Raíces		P. aérea	
<i>Azotobacter</i>	+		-		+		-	
<i>Azospirillum</i>	+		+		+		+	
<i>Herbaspirillum</i>	+		+		+		+	
G6	+		+		+		-	
G16	-		-		+		+	
G6 + Azo	*	*	-	-	+	-	-	-
G6 + Herb	+	-	+	-	-	-	-	-
G16 + Azo	-	+	+	+	+	+	+	+
G16 + Herb	-	+	-	+	+	+	+	+

DPS- días pos siembra.

+. cepa encontrada

-. cepa no encontrada

3.2 Biomasa de parte aérea y rendimiento del cultivo.

a. *Primer muestreo.* A los 30 DPS se realizó la primer colecta de plantas y se determinó peso fresco y peso seco de las mismas (Tabla 3.3).

El tratamiento con *A. chroococum* fue el que produjo los mayores incrementos de peso fresco y seco de raíces (1,85 y 0,09g/planta) y parte aérea (2,79 y 0,46g/planta) de las plantas tratadas ($P < 0.05$).

El peso fresco de parte aérea y raíz del tratamiento G6B+H fue el que mostró las medidas más bajas, aunque sin diferencias significativas con el control no inoculado. En las medidas de peso seco, los registros mas bajos se obtuvieron para la parte aérea del tratamiento G6B+Ap (0,41g/planta) y las raíces de G16A+Ap (0,08g/planta), siendo estas medidas significativamente menores a las obtenidas de plantas inoculadas con *A. chroococum*, aunque sin diferencias significativas con el control.

La Figura 3.1 muestra el incremento de masa respecto al control de los diferentes tratamientos, en un modo práctico de visualizar los resultados. En la mayoría de los casos cuando se detectó un aumento de masa en la raíz también se detectó en parte aérea, aunque en menor medida. La única excepción fue la inoculación con G16A y *H. seropedicae*, la cual produjo un aumento en el peso de raíces pero no así de la parte aérea.

Las medidas de peso fresco y peso seco siguen la misma tendencia, lo cual refleja que en este momento del desarrollo todos los tejidos son activos, no detectándose aún la presencia de raíces de sostén.

El bajo rendimiento obtenido para el tratamiento G6B +H se podrá correlacionar con la ausencia de aislamientos de *H. seropedicae* en viales de JNFb sembrados con raíces y parte aérea de este tratamiento.

Es de destacar el efecto positivo que tuvo sobre el rendimiento de las plantas de arroz la inoculación de la cepa G6B, el cual fue similar al obtenido en la inoculación simple de *H. seropedicae* (31 y 32% de aumento de peso fresco de raíces, respectivamente).

Tabla 3.3. Rendimiento, peso fresco y seco de raíz y parte aérea a los 30 DPS.

Tratamiento	Peso fresco (g/planta)		Peso seco (g/planta)	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
At	2,79 a	1,85 a	0,46 a	0,09 a
Ap	2,54 ab	1,39 ab	0,42 ab	0,10 ab
H	2,38 ab	1,14 bcd	0,40 ab	0,07 ab
G6B	2,24 ab	1,13 bcd	0,38 ab	0,08 ab
G16A	1,67 ab	0,53 cd	0,28 ab	0,04 b
G16A+Ap	2,32 ab	1,08 bcd	0,43 ab	0,08 ab
G16A+H	2,17 ab	1,07 bcd	0,37 ab	0,06 ab
G6B+Ap	2,38 ab	1,17 bc	0,41 b	0,08 ab
G6B+H	1,43 b	0,48 d	0,26 ab	0,08 ab
C-	2,18 ab	0,87 bcd	0,37 ab	0,06 ab

Expresado en gramos de tejido. At- *A. chroococum*, Ap- *A. brasilense*, H- *H. Seropedicae*. Letras iguales representa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

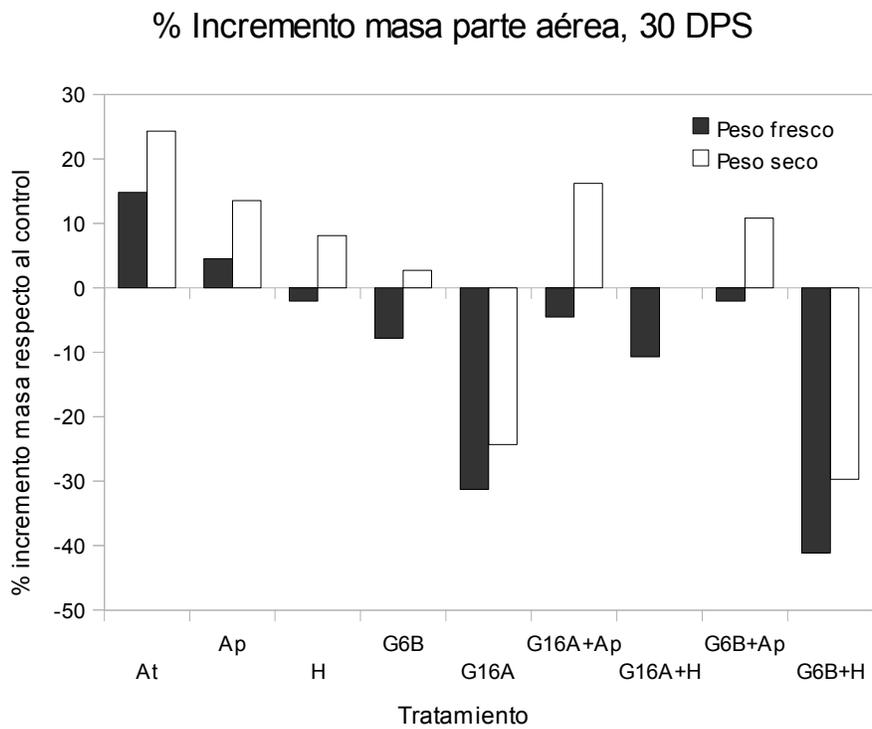
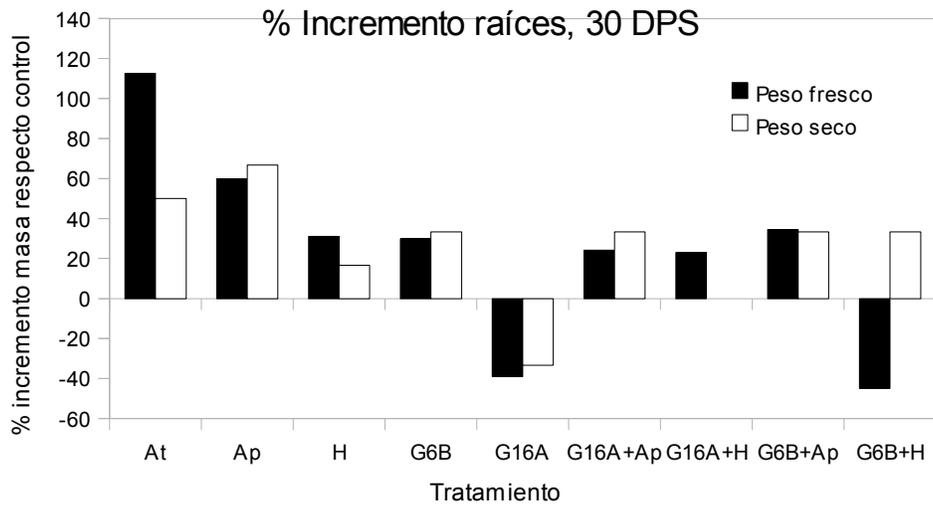


Figura 3.1. Porcentaje de incremento de masa respecto al control sin inocular de los diferentes tratamientos a los 30 DPS, calculado como $I = [(M \cdot 100) / m] - 100$, siendo M la masa del tejido a evaluar y m la masa del control sin inocular.

b. Segundo muestreo. En el segundo muestreo, realizado a los 45 DPS y luego de la inundación de las macetas, las diferencias significativas entre los tratamientos se observan únicamente en las medidas de los pesos secos de las raíces. Esto puede deberse a que la inundación promueve la formación de aerénquima, y en esta etapa del desarrollo ya se dio la formación de raíces de sostén, las cuales no tienen un rol fisiológico para la planta. Esto se visualiza por la gran diferencia entre el peso fresco y seco de raíces (Tabla 3.4).

No fue posible ver el efecto positivo de la inoculación con *A. brasilense* (Figura 3.2), mientras que los incrementos de masa provocados por los tratamientos At, H, G6B, G6B+Ap y G16A+Ap fueron similares en este segundo muestreo (Tabla 3.4 y figura 3.2).

Tabla 3.4. Peso fresco y seco de raíces y parte aérea a los 45 DPS.

Tratamiento	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
At	7,52 ab	5,95 a	1,29 ab	0,41 ab
Ap	6,52 ab	3,78 abc	0,96 ab	0,24 abc
H	7,52 ab	4,97 ab	1,33 ab	0,38 abc
G 6	8,68 ab	5,99 abc	1,31 ab	0,30 ab
G 16	8,82 ab	2,59 abc	1,33 ab	0,26 ab
G16A+Ap	6,28 ab	6,62 a	1,13 ab	0,41 ab
G16A+H	3,62 ab	2,66 bc	0,63 ab	0,15 bc
G6B+Ap	8,99 a	6,86 abc	1,41 a	0,32 a
G6B+H	2,99 b	1,49 c	0,43 b	0,09 c
C-	6,10 ab	4,84 abc	0,96 ab	0,34 abc

Expresado en gramos de tejido. At- *A. chroococum*, Ap- *A. brasilense*, H- *H. Seropedicae*. Letras iguales representa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

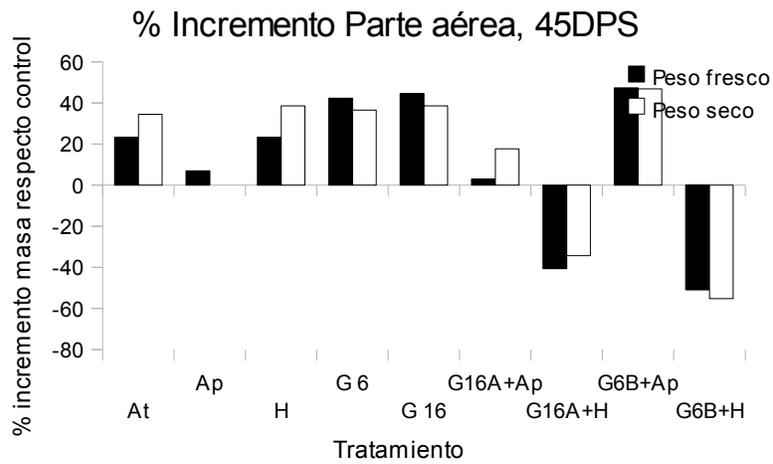
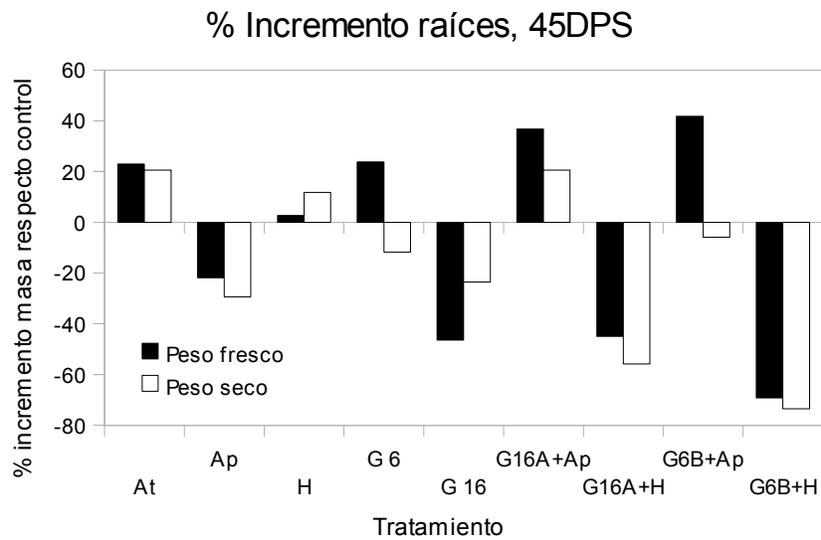


Figura 3.2. Porcentaje de incremento de masa respecto al control sin inocular de los diferentes tratamientos a los 45 DPS. $I = [(M \cdot 100) / m] - 100$, siendo M la masa del tejido a evaluar y m la masa del control sin inocular. a- parte aérea, b- raíces.

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

4.1 Recuperación y recuento de bacterias inoculadas.

Para la mayoría de los tratamientos, los recuentos en raíz fueron mayores que en la parte aérea. Esto podría deberse a que los cambios drásticos que experimentan las hojas en sus condiciones físicas (temperatura, humedad, exposición a radiación UV) imponen una restricción en el número y diversidad de bacterias capaces de colonizar y sobrevivir en estos tejidos. Por otro lado, las raíces ofrecen una gran variedad de nutrientes para las bacterias presentes en la rizósfera, las cuales pueden asociarse, al menos temporalmente, con este tejido.

La recuperación de las cepas inoculadas se vio en todos los tratamientos de inoculación simple. Se ha demostrado que algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum* son fuertemente atraídos por los exudados radicales del cultivo de arroz (Rives et al. 2007).

En los ensayos de co- inoculación con *H. seropedicae* o *A. brasilense* y la cepa G6B no fue posible recuperar a la primera, lo que muestra que existió una interacción entre estas bacterias al momento de colonizar la planta de arroz que determinaron la exclusión de la cepa PGP.

4.2 Biomasa de parte aérea y rendimiento del cultivo.

La inoculación con *Azotobacter* fue la que produjo el mayor aumento de peso fresco en las raíces: 113% respecto al control sin inocular. Los resultados obtenidos por Zayas *et al.* (2008) muestran que la inoculación del suelo con *Azotobacter* mejora notablemente el crecimiento y el desarrollo de plantas de lechuga. Los autores señalan que esto puede estar relacionado con su efecto biofertilizante y con la capacidad de esta bacteria para sintetizar determinadas sustancias, que actúan como bioestimulantes del crecimiento vegetal, tales como: aminoácidos, vitaminas, fosfolípidos, ácidos grasos, auxinas, giberelinas y citoquininas; compuestos que son capaces de incrementar el vigor general de las plantas y acelerar los procesos de floración, fructificación y la producción de

materia seca. Por su parte, la inoculación de semillas de maíz con *Azotobacter* provocó un aumento en la producción de granos (Hussain *et al.* 1987).

La inoculación con *A. brasilense* y *H. seropedicae* resultó en un aumento de masa de 60% y 32% en raíz respectivamente a los 30DPS. El efecto positivo de la cepa *H. seropedicae* puede atribuirse a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la cual se ha verificado en ensayos de inoculación de plantas de arroz con ^{15}N (Baldani *et al.* 2000). Por su parte, el efecto positivo de la inoculación con *A. brasilense* se ha visualizado en varios cultivos, entre los que se destacan: arroz (Pedraza *et al.* 2009, Rodrigues *et al.* 2008), tomate (Ribaudo *et al.* 2006) y cactus (Puente & Bashan 1993).

La aplicación de *A. brasilense* con G6B y G16A produjo un aumento de la masa (peso fresco) de raíces a los 30DPS del 34 y 24% respectivamente, sin diferencias significativas frente a los ensayos de inoculación simple con estas mismas bacterias. En la aplicación de *A. brasilense* con G16A fue posible recuperar las cepas inoculadas en las plantas de arroz. Se ha reportado que la inoculación de *Azospirillum* sola o con *B. japonicum*, promueven la germinación de las semillas y el crecimiento inicial de plántulas de soja y maíz (Cassan *et al.* 2009).

En cambio, la co- inoculación de *H. seropedicae* presentó diferentes efectos sobre el cultivo: *H. seropedicae* con G16A provoca un aumento del 23% en el peso fresco de raíces a los 30DPS, mientras que *H. seropedicae* con G6B determina un bajo rendimiento, siendo de -34% respecto al control. En este último tratamiento, no fue posible recuperar de raíces ni de parte aérea colonias de *H. seropedicae*. Esto significaría que la interacción entre la cepa G6B y *H. seropedicae* repercute negativamente sobre el desarrollo del cultivo de arroz y sobre la capacidad invasora de *H. seropedicae*.

ANEXO 2

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla 1. Log₁₀ del número de bacterias heterótrofas totales y productoras de sideróforos aisladas de suelo y bacterias endófitas aisladas de grano y tejidos frescos de arroz (*Oryza sativa*) en diferentes estadios del desarrollo del cultivo.

Estadio de desarrollo	Muestra	Número de bacterias heterótrofas (Log UFC g ⁻¹ peso fresco) ^a	
		Totales	Productoras de Sideróforos
Macollaje	suelo	7.33 a A	4.58 ab B
	raíz	6.03 bc A	4.74 a B
	hoja	4.95 c A	3.44 b B
Inundación	raíz	4.93 c	3.98 b
	hoja	5.50 c	4.65 ab
Embarrigado	raíz	5.28 bc	5.03 a
	hoja	5.00 c	4.77 ab
Llenado de grano	suelo	6.48 a A	5.41 a B
	raíz	4.84 c	4.61 ab
	hoja	5.53 bc	5.52 a
Post cosecha ^b	grano	5.70 bc A	4.48 ab B

^a Promedio de tres replicados, letras iguales significa que no hay diferencias significativas; letras mayúsculas diferencias entre columnas (entre los dos grupos de bacterias), letras minúsculas diferencias entre filas (momento/ tejido) para cada grupo de microorganismo.

^b Siete meses después de la cosecha.

Tabla 2. Características de los aislamientos fermentadores de glucosa obtenidos de raíces (R) de arroz en cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

Aislamiento ^a	Origen		Dilución	OF-maltosa ^c	Sideróforos ^d	ARDRA	BOX
	Parcela ^b	Medio					
M8	R3	CAS	-3	F	++	PA1	C
M9	R3	CAS	-3	NC	+	PG	-
M10	R3	R2A	-3	F	++	PA1	J
M11	R3	R2A	-3	F	+	PF5	-
M16	R1	R2A	-4	F	+	PA1	B
M17	R1	R2A	-4	F	+	PA1	D
M42	R1	R2A	-3	F	+	PA1	C
M19	R1	CAS	-4	F	+	PA1	D
M18	R1	CAS	-4	NC	++	PG	-
M20	R1	CAS	-4	NC	+	PG	-
M45	R1	CAS	-3	NC	+	PG	-
E25	R1	CAS	-3	F	+	PA1	A
I26	R4	CAS	-3	F	++	PA1	B
L4	R2	CAS	-1	NC	++	PG	-
L7	R3	CAS	-2	F	++	PA1	K
L8	R3	CAS	-2	NC	++	PG	-

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

Tabla 3. Características de los aislamientos fermentadores de glucosa obtenidos de hojas (H) de arroz en cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

Aislamiento ^a	Origen			OF-maltosa ^c	Sideróforos ^d	ARDRA	BOX
	Parcela ^b	Medio	Dilución				
M1	H3	R2A	-4	F	+	PA1	B
M5	H3	CAS	-2	F	+	PA1	B
M15	H3	CAS	-1	F	+	PA1	I
M28	H4	CAS	-2	F	+	PA1	B
M36	H1	R2A	-4	F	+	PF5	-
M37	H1	CAS	-2	F	+++	PA1	C
E3	H1	CAS	-1	F	+	PA1	E
E1	H1	CAS	-2	F	+	PF4	-
E4	H1	R2A	-2	F	+	PF4	-
E5	H1	R2A	-2	F	+	PF4	-
E6	H1	R2A	-1	F	+	PF4	-
E7	H3	CAS	-4	F	+	PF4	-
E10	H3	R2A	-4	F	+	PF4	-
E13	H4	CAS	-3	F	+	PF4	-
E14	H4	CAS	-2	F	+	PF4	-
E15	H4	CAS	-1	F	+	PF4	-
E17	H4	R2A	-3	F*	+	PF4	-
I31	H1	CAS	-2	F	+	PA1	D
I35	H1	CAS	-3	F	+	PA1	B
I36	H1	R2A	-2	F	+	PA1	C
I42	H2	CAS	-3	F	++	PA1	C
I43	H2	CAS	-3	F	+	PA1	G
I44	H2	CAS	-2	F	++	PA1	C
I45	H2	CAS	-2	F	+	PA1	E
I47	H2	R2A	-3	F	-	PA1	B
I57	H4	CAS	-2	F	+	PA1	E
L23	H1	CAS	-3	F	+	PA1	A
L24	H1	CAS	-3	F	+	PA1	A
L25	H1	CAS	-3	F	+	PA1	A
L38	H1	R2A	-3	F	+	PA1	H
L39	H1	R2A	-3	F	+	PA1	A
L29	H2	CAS	-2	F	+	PA1	A
L28	H2	CAS	-2	F	+	PF3	-

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

Continuación Tabla 3. Características de los aislamientos fermentadores de glucosa obtenidos de hojas (H) de arroz en cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

Aislamiento ^a	Origen			OF-maltosa ^c	Sideróforos ^d	ARDRA	BOX
	Parcela ^b	Medio	Dilución				
L43	H2	R2A	-4	F	+++	PA1	A
L42	H2	R2A	-4	F	++	PF3	-
L30	H3	CAS	-3	F	+	PA1	E
L32	H3	CAS	-3	F	+	PA1	G
L45	H3	R2A	-4	F	++	PA1	E
L44	H3	R2A	-4	F	+++	PF3	-
L47	H3	R2A	-4	F	+++	PF3	-
L34	H4	CAS	-2	F	+	PA1	E
L50	H4	R2A	-3	F	+++	PF3	-
L51	H4	R2A	-3	F	+++	PF3	-

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

Tabla 4. Características de los aislamientos no fermentadores de glucosa obtenidos de raíces (R) de arroz en cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

Aislamiento ^a	Origen			OF-glucosa ^c	Sideróforos ^d	Oxidasa	ARDRA ^e
	Parcela ^b	Medio	Dilución				
M7	R3	CAS	-3	O	+++	-	F
M21	R4	CAS	-3	O	+++	-	F
M22	R4	CAS	-3	O	++	-	F
M26	R4	R2A	-4	O	++	+	I
M40	R2	R2A	-4	O	+++	+	U
M43	R2	CAS	-3	O	+++	-	U
M44	R2	CAS	-3	O	++	+	U
M46	R2	CAS	-4	O	++++	+	B
E26	R1	CAS	-3	O	+++	+	U
E27	R1	CAS	-3	O	+++	+	U
E28	R1	CAS	-3	O	++	-	U
E29	R1	CAS	-3	O	++	+	U
I1	R1	CAS	-2	O	++	-	U
I2	R1	CAS	-2	O	++	-	J
I4	R1	CAS	-2	O	++	+	U
I8	R2	CAS	-2	O	++	-	F
I12	R2	CAS	-2	O	++	-	F
I16	R3	CAS	-1	O	++	-	U
I19	R3	CAS	-2	NC	++	+	C
I20	R3	CAS	-2	NC	+++	+	C
I24	R4	CAS	-3	O	++	+	B
I25	R4	CAS	-3	NC	++	-	U
I27	R4	CAS	-3	O	+	+	I
L 1	R1	CAS	-1	NC	+++	-	U
L 2	R1	CAS	-1	NC	-	+	C
L 3	R2	CAS	-1	O	++	+	A
L 5	R2	CAS	-2	O	+++	+	A
L 6	R3	CAS	-3	O	+++	-	J
L 9	R1	R2A	-1	O	+	-	U
L 10	R1	R2A	-2	NC	+	-	U
L 11	R1	R2A	-2	NC	++	-	K

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

^e U, perfil único.

Continuación Tabla 4. Características de los aislamientos no fermentadores de glucosa obtenidos de raíces (R) de arroz en cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

Aislamiento ^a	Origen			OF-glucosa ^c	Sideróforos ^d	Oxidasa	ARDRA ^e
	Parcela ^b	Medio	Dilución				
L 12	R1	R2A	-2	NC	+	+	U
L 13	R1	R2A	-2	NC	++	+	K
L 14	R2	R2A	-1	NC	+	-	H
L 15	R2	R2A	-2	NC	+	-	U
L 16	R2	R2A	-2	NC	-	-	H
L 17	R3	R2A	-3	NC	-	+	E
L 18	R3	R2A	-3	NC	-	-	U
L 19	R3	R2A	-3	NC	-	-	U
L 20	R3	R2A	-3	NC	-	-	U

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

^e U, perfil único.

Tabla 5. Características de los aislamientos no fermentadores de glucosa obtenidos de hojas (H) de arroz en cuatro momentos del desarrollo del cultivo.

Aislamiento ^a	Origen			OF-maltosa ^c	Sideróforos ^d	Oxidasa	ARDRA ^e
	Parcela ^b	Medio	Dilución				
M2	H3	R2A	-3	O	+	-	U
M4	H3	CAS	-2	O	++	-	B
M14	H2	CAS	-1	Nc A	+++	+	U
M32	H4	R2A	-3	O	+	-	G
E8	H3	CAS	-4	O	++	+	U
E11	H3	R2A	-4	NC	+	+	U
E16	H4	CAS	-1	O	-	-	F
E18	H4	R2A	-3	Nc	+	-	U
E20	H4	R2A	-2	O	+	-	G
I32	H1	CAS	-2	O	++	-	D
I34	H1	CAS	-2	O	+	-	U
I50	H3	CAS	-1	O	+++	-	F
I52	H3	CAS	-1	O	++	-	U
I56	H4	CAS	-2	O	+++	-	F
I60	H4	R2A	-2	O	+	+	U
L21	H1	CAS	-3	NC	++	-	G
L22	H1	CAS	-3	NC	-	-	U
L26	H1	CAS	-3	NC	-	-	U
L27	H1	CAS	-3	O	+++	-	D
L31	H3	CAS	-3	O	++	+	U
L35	H4	CAS	-2	O	-	+	U
L36	H4	R2A	-4	NC	-	+	U
L37	H4	R2A	-4	NC	++	+	U
L40	H2	R2A	-3	NC	-	-	U
L41	H2	R2A	-3	NC	no crece	+	E
L46	H3	R2A	-4	NC	-	+	E
L48	H3	R2A	-4	NC	C. poco -	+	U
L49	H4	R2A	-3	NC	-	-	U
L52	H4	R2A	-3	O	+++	+	U

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

^e U, perfil único.

Tabla 6. Características de los aislamientos obtenidos de granos de arroz.

Aislamiento ^a	Origen			OF- glucosa ^c	OF-maltosa ^c	Sideróforos ^d	ARDRA ^e
	Parcela ^b	Medio	Dilución				
G1	1	CAS	-2	O	-	++	U
G2	1	CAS	-2	O	-	+	U
G3	1	R2A	-3	NC	-	+	U
G4	1	R2A	-3	NC	-	++	L
G5	1	R2A	-3	F	F	++	PA1
G6	2	CAS	-2	O	-	+	A
G7	2	CAS	-2	F	NC	+	PG
G8	2	CAS	-2	F	F	++	PA1
G9	2	R2A	-2	O	-	+	A
G10	2	R2A	-2	NC	-	+	U
G11	3	CAS	-3	O	-	++	D
G12	3	CAS	-3	O	-	+	U
G13	3	R2A	-3	O	-	++	U
G14	3	R2A	-3	O	-	++	U
G15	3	R2A	-3	O	-	+	U
G16	4	CAS	-2	O	-	+++	D
G17	4	CAS	-2	NC	-	+	L
G18	4	CAS	-2	F	F	+	U
G19	4	R2A	-3	F	F	+	U
G20	4	R2A	-3	O	-	+	F

^a M macollaje, I inundación, E embarrigado y L llenado de grano.

^b El número en la columna hace referencia a la parcela de la cual se obtuvo el aislamiento.

^c Resultados OF: F, fermentación, O, Oxidación, NC, no cambio.

^d Producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

^e U, perfil único.

Tabla 7. Distribución de los aislamientos productores de sideróforos según el momento y tejido del aislamiento, agrupados según la respuesta en la prueba de OF-glucosa y el nivel de producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

RAIZ						
OF- Glucosa	CAS	macollaje	inundación	embarrigado	llenado de grano	Totales
Fermentador	+	8	0	1	0	9
	++	3	1	0	3	7
	+++	0	0	0	0	0
Oxidador	+	0	0	0	0	0
	++	3	5	2	2	12
	+++	5	1	2	1	9
No Cambio	+	0	0	0	10	11
	++	0	1	0	2	1
	+++	0	3	0	2	3
Totales		19	12	5	18	56

HOJA						
OF- Glucosa	CAS	macollaje	inundación	embarrigado	llenado de grano	Totales
Fermentador	+	5	7	11	10	33
	++	0	2	0	2	4
	+++	1	0	0	5	6
Oxidador	+	2	2	3	1	8
	++	1	2	1	1	5
	+++	0	0	0	2	2
No Cambio	+	0	0	1	2	3
	++	0	0	0	2	2
	+++	1	2	0	0	3
Totales		10	15	16	25	66

Continuación Tabla 7. Distribución de los aislamientos productores de sideróforos según el momento y tejido del aislamiento, agrupados según la respuesta en la prueba de OF-glucosa y el nivel de producción de sideróforos en medio CAS-R2A.

OF- Glucosa	CAS	Grano
Fermentador	+	3
	++	2
	+++	0
Oxidador	+	6
	++	4
	+++	1
No Cambio	+	3
	++	1
	+++	0
Totales		20

Tabla 8. Distribución espacial y temporal de los endófitos productores de sideróforos.

Propiedades de los aislamientos ^a				Frecuencia ^b									
Perfil ARDRA	Prueba OF		oxidasa	Raíz ^c				Hoja ^c				Grano	TOTAL
	glucosa	maltosa		M	I	E	LL	M	I	E	LL		
PA1	F	F	nd	2	1	1	1	3	3	1	3	2	17
PG	F	NC	nd	2	0	0	2	0	0	0	0	1	5
PF3	F	F	nd	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
PF4	F	F	nd	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
PF5	F	F	nd	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
F	O	nd	-	2	1	0	0	0	2	1	0	1	7
D	O	nd	-	0	0	0	0	0	1	0	1	2	4
A	O	nd	-	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
J	O	nd	-	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
B	O	nd	+	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3
G	O	nd	+	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3
I	O	nd	+	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
C	NC	nd	+	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
E	NC	nd	+	0	0	0	1	0	0	0	2	0	3
L	NC	nd	-	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Únicos ^d	Nc ^e	nd	nc ^e	3	4	4	10	2	3	3	10	10	49
TOTAL				12	10	5	17	8	9	9	20	19	109

^a Resultados de OF: F (fermentación), O (oxidación), NC (no cambio); nd (no determinado).

^b Numero de aislamientos con el mismo perfil de ARDRA obtenidos de diferentes parcelas en un total de 3 parcelas analizadas.

^c Estadios del desarrollo: M (Macollaje), E (Embarrigado), I (Inundación), LL (Llenado de grano).

^d Patrones únicos que fueron detectados en un solo muestreo (momento/tejido).

^e Nc no corresponde. Aunque la mayoría de los aislamientos son oxidadores de glucosa.

Tabla 9. Niveles de producción de sideróforos, ácido indol acético y resultado de reducción de acetileno en medio semisólido sin N de cepas seleccionadas representativas de los perfiles de ARDRA.

Aislamiento	Perfil ARDRA ^a	Origen ^a	Sideróforos ^b	IAA (mg/m.DOI) ^c	ARA ^d
G6	A	Grano	++	1,257 ± 0.009	+
I32	D	Hoja/ inundación	++	0,892 ± 0.010	-
L27	D	Hoja/ llenado de grano	+++	0,258 ± 0.001	-
G16	D	Grano	+++	0,894 ± 0.041	-
M46	B	Raíz/Macollaje	+++	0.154 ± 0.005	-
I24	B	Raíz/Inundación	+++	0,187 ± 0.001	-
I20	C	Raíz/Inundación	+++	0,174 ± 0.004	+
I2	J	Raíz/Inundación	++	1,024 ± 0.022	-
M26	I	Raíz/Macollaje	++	0.452 ± 0.015	-
I27	I	Raíz/Inundación	+	0.550 ± 0.019	-
M7	F	Raíz/Macollaje	+++	1,084 ± 0.041	-
I8	F	Raíz/Inundación	++	0,386 ± 0.002	-
I50	F	Hoja/Inundación	+++	0.432 ± 0.035	-
E8	F	Hoja/Embarrigado	++	0,308 ± 0.001	-
G20	F	Grano	++	0,364 ± 0.004	-
M8	Pa1	Raíz/Macollaje	++	0,735 ± 0.145	-
I26	Pa1	Raíz/Inundación	++	0,192 ± 0.002	-
E3	Pa1	Hoja/Embarrigado	+	0,257 ± 0.001	-
I42	Pa1	Hoja/Inundación	++	0,155 ± 0.001	-
L23	Pa1	Hoja/ llenado de grano	+	0,457 ± 0.001	-
G8	Pa1	Grano	++	0,500 ± 0.003	-
M11	Pf5	Raíz/Macollaje	+	0,554 ± 0.003	-
M18	Pg	Raíz/Macollaje	++	0,921 ± 0.021	+
G7	Pg	Grano	++	0,417 ± 0.005	-
Azb39	Nc	Nc	++	0,945 ± 0.019	+
A. amazonense	Nc	Nc	++	0,825 ± 0.010	+
Herbaspirillum	Nc	Nc	++	2,402 ± 0.060	+

^a Nc no corresponde.

^b Producción en medio CAS-R2A. + halo de 1 a 3mm, ++ de 3 a 6mm, +++ más de 6mm de halo.

^c Los resultados mostrados son promedios de duplicados de crecimiento de los cultivos, acompañados por la correspondiente desviación estándar.

^d Ensayo de reducción de acetileno. + resultado positivo, - resultado negativo.

ANEXO 3

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Por orden alfabético.

1- ASBY:

Manitol	10,0g
K ₂ HPO ₄	0,2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,2g
CaCO ₃	5,0g
NH ₄ NO ₃	1,0g
Agar	15,0g

Completar 1L con agua destilada. Ajustar el pH a 7,2-7,5. Autoclavar y repartir en placas estériles.

2- BATATA AGAR (Baldani *et al.* 1980):

Para preparar un litro de medio BATATA pesar 200g de papas, pelarlas, lavarlas, cortarlas y hervirlas durante media hora. En paralelo colocar 2,5g de ácido málico en 50ml de agua destilada, 2 gotas de Azul de Bromotimol, y solución 0,5% en 0,2N de KOH para ajustar el pH. Adicionar KOH hasta alcanzar un pH de 6,8-7 (color verde). Agregar 2,5g de azúcar cristal, 2ml de solución de micronutrientes (composición de solución de micronutrientes cada 200ml: 0,2g NaMoO₄.2H₂O, 0,235g MnSO₄.H₂O, 0,28g H₃BO₃, 8mg CuSO₄. 5H₂O, 24mg ZnSO₄.7H₂O) y 1ml de solución de vitaminas (composición de solución de vitaminas cada 100ml: 10mg Biotina, 20mg Pyridoxol-HCl).

Después de hervida, filtrar la papa con algodón y juntar el filtrado a la solución anterior. Completar los 1000ml con agua destilada y adicionar 15g de agar.

3- CAS con base en R₂A (modificado de Schwyn et al. 1987):

Medio base:

Agua destilada 450 ml

Pipes 7.5 g

Ajustar el pH a 6.8

Agregar posteriormente:

Casaminoácidos 1.25 g

R2A deshidratado 9.1 g

Fundir y repartir por 90 ml.

Colorante, preparar por separado y en el orden indicado las siguientes soluciones:

CAS 30.2 mg

Agua destilada 20 ml

FeCl₃, 1mM en HCl 10mM 5 ml

CTAB 36.5 mg

Agua destilada 20 ml

Autoclavar por separado el medio base y la solución colorante. Luego de templar las soluciones agregar asepticamente 5 ml de vitaminas BCyT 10x al colorante y 10 ml de éste a cada frasco de medio base. Repartir en placas por 20 ml. El producto final debe ser un medio sólido, de color azul oscuro; si quedara verde puede deberse a un mal ajuste del pH.

4- DYGS (Rodríguez 1986):

Glucosa 2,0g

Acido málico 2,0g

Peptona bacteriológica 1,5g

Extracto de levadura 2,0g

K₂HPO₄ 0,5g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Acido glutámico	1,5g

Completar a 1L con agua destilada. Ajustar el pH a 6 para *Azospirillum* o 6.8 para *Herbaspirillum*.

5- JNFb (Döberneiner *et al.* 1995):

Ácido málico	5,0g
K ₂ HPO ₄ sol.10%	6ml
MgSO ₄ .7H ₂ O sol. 10%	18ml
NaCl sol 10%	2ml
CaCl ₂ .2H ₂ O sol 1%	1ml
FeEDTA sol 1,64%	4ml
Azul de bromotimol 0.5%	2ml
Sol. Micronutrientes a	2ml
Vitaminas b	1ml
KOH	4,5g
Extracto de levadura*	20mg

*- solo para medio sólido.

a- composición de solución de micronutrientes cada 200ml:0,2g NaMoO₄.2H₂O, 0,235g MnSO₄.H₂O, 0,28g H₃BO₃, 8mg CuSO₄. 5H₂O, 24mg ZnSO₄.7H₂O.

b- composición de solución de vitaminas cada 100ml: 10mg Biotina, 20mg Pyridoxol-HCl.

Para medio sólido adicionar 17g/l de agar, para semisólido 1,7g/l de agar. Ajustar el pH a 5,8. Color final: amarillo.

6- LGI (Magalhaes et al 1983):

Azúcar cristal	5,0g
K ₂ HPO ₄ sol.10%	2ml
KH ₂ PO ₄ sol. 10%	6ml
MgSO ₄ .7H ₂ O sol10%	2ml
CaCl ₂ .2H ₂ O sol1%	2ml
FeEDTA sol 1,64%	4ml
NaMoO ₄ .2H ₂ O sol.1%	2ml
Azul de bromotimol 0.5%	5ml
Vitaminas	1ml
Extracto de levadura*	20mg

*- sólo para medio sólido.

Composición de solución de vitaminas cada 100ml: 10mg Biotina, 20mg Pyridoxol-HCl.

Para medio solido adicionar 15g/l de agar, para semisólido 1,4g/l de agar.

En medio líquido adicionar 1g/l de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ajustar el pH a 6. Color final: amarillo verdoso.

7- LURIA BERTANI (LB) (Cho *et al.* 2007):

Triptona	10,0g
Extracto de levadura	5,0g
NaCl	10,0g
Agar	15,0g
Agua destilada	1000ml
0.5% de carboximetil celulosa	

Ajustar el pH a 7. Autoclavar, repartir en placas por 20 ml.

8- NFb (Baldani *et al.* 1980):

Acido málico	5,0g
K_2HPO_4 sol.10%	5ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sol.10%	2ml
NaCl sol 10%	1ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sol1%	2ml
FeEDTA sol 1,64%	4ml
Azul de bromotimol 0.5%	2ml
Sol. Micronutrientes a	2ml
Vitaminas b	1ml
KOH	4,5g
Extracto de levadura*	50mg

*- solo para medio sólido.

a- composición de solución de micronutrientes cada 200ml: 0,2g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,235g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,28g H_3BO_3 , 8mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 24mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

b- composición de solución de vitaminas cada 100ml: 10mg Biotina, 20mg Pyridoxol-HCl.

Para medio solido adicionar 15g/l de agar, para semisólido 1,6g/l de agar. Ajustar el pH a 6,5. Color final: verde.

9- NFbl:

Ácido málico	2.5g
Glucosa	2.5g
K ₂ HPO ₄	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.6g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.02g
Micronutrientes	2 ml
<u>NFbl cont.</u>	
Fe-EDTA	4 ml
Vitaminas	1 ml
NH ₄ Cl	1g
Agua destilada	1000 ml

Composición de solución de micronutrientes cada 200ml:0,2g NaMoO₄.2H₂O, 0,235g MnSO₄.H₂O, 0,28g H₃BO₃, 8mg CuSO₄. 5H₂O, 24mg ZnSO₄.7H₂O.

Ajustar el pH a 6. Autoclavar, luego de termostatizar el medio agregar 1ml de 0.5% de cloruro de trifenil tetrazolio cada 100ml de medio. Repartir en placas de petri por 20 ml.

10- R2A (Difco):

Extracto de levadura	0.5g
Proteosa Peptona No. 3.	0.5g
Casamino Acidos	0.5g
Dextrosa	0.5g
Almidón Soluble	0.5g
Piruvato de sodio	0.3g
KH ₂ PO ₄	0.3g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05g
Agar	15g

11- Solución salina:

Composición por litro de medio: 1ml de solución 10% de K_2HPO_4 , 0,5ml de solución 10% de $MgSO_4$, 0,2ml de solución 10% de NaCl, 1ml de solución 1% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1ml de solución 1,64% de FeEDTA y 0,5ml de solución de micronutrientes. Ajustar el pH a 6.5 con ácido sulfúrico 5%.

12- Solución fertilizante para macetas:

Para 40L de agua destilada, deionizada y esterilizada adicionar (ver composición de las soluciones en la tabla) los componentes 1, 2, 3 y 5 y disolver. Agregar 20ml de solución 6 y 40ml de solución 7. Agregar 4 al momento de aplicar el fertilizante.

Preparación de solución fertilizante para macetas de Leonard

Solución	Componentes	g/40L
1	KCl	5,96
2	K_2HPO_4	2,00
3	KH_2PO_4	4,00
4	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	13,76
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	19,72
6 ^a	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,15
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44
	$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0,40
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,02
7 ^a	$FeSO_4 \cdot 2H_2O$	5,00
	Ácido cítrico	5,00

^a disolver en 1l de agua destilada.

13- TRIPTOSA (Try) (modificado de Glikmann & Dessaux, 1995):

Peptona bacteriologica 20g/l
 K_2HPO_4 1.15g/l
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g/l

Ajustar el pH en 6.8. Repartir em tubos por 5 ml. Autoclavar.

14- WAKSMAN AGAR (Modificado de Berg *et al.* 2002):

Bacto peptona (DIFCO)	5g
Glucosa	10g
Extracto de carne	3g
NaCl	5g
Agar	20g

Disolver en 1L de agua destilada, autoclavar; repartir por 20 ml en placas de petri.