

Tesis de Doctorado
PEDECIBA BIOLOGÍA

Mayo, 2011

Comunidades de diazotrofos asociados a
maíz: efecto del genotipo de la planta y de la
fertilización nitrogenada

Andrea Rodríguez Blanco

Tutora: Dra. Lillían Frioni

Co-tutora: Dra. Margarita Sicardi

Microbiología, Depto. Biología Vegetal

Facultad de Agronomía, UDELAR

Montevideo, Uruguay

Contenido	Página
Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción General	
1. Fijación biológica de N ₂	7
2. Bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas en gramíneas.....	8
3. Métodos de estudio de la FBN en gramíneas.....	15
4. El cultivo de maíz	24
5. Antecedentes de fijación biológica de N ₂ en maíz.....	26
6. Bibliografía.....	29
Objetivos	52
Estrategia experimental	53
Capítulo I: Efecto de la fertilización nitrogenada y del genotipo de la planta sobre el número y diversidad de diazotrofos asociados a maíz	56
1. Introducción.....	57
2. Materiales y Métodos.....	60
3. Resultados.....	65
4. Discusión.....	75
5. Bibliografía.....	82
Capítulo II: Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias diazotrofas asociadas a maíz	90
1. Introducción.....	91
2. Materiales y métodos.....	93
3. Resultados.....	99
4. Discusión.....	110
5. Bibliografía.....	119
Capítulo III: Colonización y promoción del crecimiento vegetal en variedades de maíz inoculadas con bacterias diazotrofas seleccionadas	131
1. Introducción.....	132
2. Materiales y métodos	135
3. Resultados.....	142
4. Discusión.....	157
5. Bibliografía.....	167
Conclusiones generales	176

ABREVIATURAS

AIA: ácido indol acético

ARDRA: Amplified 16S rDNA restriction analysis

FBN: fijación biológica de nitrógeno

GTG- PCR: Amplificación utilizando como primer la secuencia repetida (GTG)₅

N0: plantas de maíz crecidas sin agregado de N

N40: plantas de maíz crecidas con el agregado del equivalente a 40 kg N/ha

N80: plantas de maíz crecidas con el agregado del equivalente a 80 kg N/ha

NMP: número más probable

PGPB: bacterias promotoras del crecimiento vegetal

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

T-RFs: fragmentos terminales marcados

RESUMEN

El cultivo de maíz requiere grandes cantidades de fertilizante nitrogenado para obtener un buen rendimiento. Desafortunadamente, gran parte del fertilizante aplicado al cultivo no es utilizado por la planta, lo que contribuye a la contaminación de los suelos y aguas con nitrato. En este contexto, el proceso natural de fijación biológica de nitrógeno, realizado por las bacterias diazotrofas, tiene un papel importante ya que constituye un aporte no contaminante de nitrógeno. En los últimos años, para minimizar el uso de fertilizantes y potenciar el desarrollo de una agricultura sustentable, se ha apostado al uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal como una alternativa más favorable desde el punto de vista económico y ambiental. La colonización de la planta por las bacterias es afectada por varios factores tanto bióticos como abióticos, y el conocimiento del efecto de estos factores sobre la comunidad de bacterias diazotrofas resulta fundamental para comprender los mecanismos que influyen en la asociación. En términos de potencial agronómico, esta información puede contribuir a mejorar la interacción planta-microorganismo y a desarrollar con éxito prácticas de inoculación a partir de diazotrofos especialmente seleccionados.

El presente trabajo de tesis se centró en las comunidades de bacterias fijadoras de N_2 asociadas a maíz. Se estudió el efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre el número y diversidad de la comunidad de diazotrofos, las características de la población cultivable, el efecto de la inoculación con bacterias seleccionadas en la promoción del crecimiento de plantas de distintas variedades y la colonización de las raíces. El trabajo se dividió en 3 etapas o capítulos que se resumen a continuación.

Para determinar el efecto del genotipo de maíz y de la fertilización nitrogenada sobre las comunidades de diazotrofos se realizó un ensayo en condiciones controladas (cámara de cultivo) con plantas de maíz (*Zea mays* L.) de las variedades NK940 y PAU871 crecidas en suelo:arena no estéril con 40, 80 Kg de $N \cdot ha^{-1}$ y sin fertilización nitrogenada durante 45 días.

En el capítulo I se analizó el efecto de ambos factores sobre el número de diazotrofos cultivables utilizando el método de NMP y sobre la diversidad de la comunidad bacteriana empleando el método independiente del cultivo *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) amplificando el gen *nifH*. La densidad microbiana y la diversidad de la comunidad diazotrofa fueron mayores en el suelo rizosférico que en el interior de los tejidos de las plantas; evidenciando que las comunidades endófitas representan una submuestra de las comunidades rizosféricas y apoyando la hipótesis de que los endófitos son seleccionados por la planta a partir del conjunto de bacterias de la rizósfera. En las comunidades endófitas se observó un efecto del genotipo de la planta; la variedad NK940 presentó una comunidad endófitas más diversa y más abundante que la variedad PAU871.

Se determinó también efecto positivo de la fertilización nitrogenada ya que las plantas fertilizadas presentaron mayor número y diversidad de diazotrofos endófitos de raíz. Ambos factores ejercieron menor efecto sobre las comunidades rizosféricas, que no presentaron cambios significativos en los parámetros número y diversidad (medida mediante el índice de Shannon). Todas las muestras analizadas presentaron dos fragmentos terminales marcados (T-RFs) con elevada abundancia dentro de la comunidad. Estos fragmentos coincidieron con T-RFs correspondientes a los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter*, aislados en este trabajo (capítulo II). El análisis de *cluster*, formó 4 grupos según la variedad y el origen de la muestra (suelo rizosférico o raíz), cada uno de ellos incluyó muestras fertilizadas y no fertilizadas, lo que indica que la fertilización nitrogenada fue el factor que menos influyó en el agrupamiento de las muestras. Los análisis multivariados revelaron que las comunidades diazotróficas de los suelos rizosféricos de ambas variedades de maíz presentaron mayor similitud entre ellas que las comunidades endófitas de raíz de ambas variedades. Los resultados permiten concluir que el genotipo vegetal y la fertilización nitrogenada ejercieron mayor efecto en las comunidades endofíticas de raíz que en las rizosféricas y que el genotipo de la planta ejerció mayor efecto que la fertilización nitrogenada.

En el capítulo II se presentan los resultados de la caracterización e identificación de diazotrofos rizosféricos y endófitos de raíces y tallos de ambas variedades de maíz crecidas con y sin fertilización nitrogenada. Se obtuvieron 257 aislamientos capaces de crecer en medio sin N combinado y mediante la técnica de PCR se detectó la presencia del gen *nifH* en el 41% de esos aislamientos. Se formó una colección de 106 bacterias capaces de crecer en medio sin N combinado y de amplificar el gen *nifH*. El mayor número de aislamientos se obtuvo de la variedad NK940. En relación al sitio de donde se aislaron, la colección está integrada principalmente por aislamientos de raíz, seguida por los de suelo rizósferico y tallo. El número de aislamientos obtenidos de plantas sin fertilizar fue similar al obtenido de plantas fertilizadas. Los aislamientos fueron agrupados según su perfil de ARDRA y se realizó la secuenciación parcial del gen 16S rRNA de cepas representantes de cada uno de los grupos. Las cepas estudiadas se identificaron dentro de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Ochrobactrum* y *Achromobacter*. La población cultivable asociada a estas variedades de maíz fue poco diversa y estuvo dominada por aislamientos de los géneros *Enterobacter* y *Pseudomonas*. La técnica de rep-PCR utilizando la secuencia (GTG)₅ permitió detectar elevada diversidad intra especie y evidenció la presencia de aislamientos de la misma cepa en muestras de suelo rizosférico, e interior de raíces y tallos de la misma planta, así como de plantas de la misma variedad pero con distinto nivel de fertilización nitrogenada. Los aislamientos presentaron variabilidad en las características

promotoras del crecimiento vegetal: producción de ácido indol acético, solubilización de fosfato tricálcico e inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en cultivos duales.

En el capítulo III se estudió el efecto de la inoculación con 8 cepas seleccionadas en la promoción del crecimiento de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 y la capacidad infectiva y colonización de los tejidos de la raíz. Se observó una marcada diferencia en la respuesta a la inoculación entre ambas variedades, independientemente del sistema de crecimiento de las plantas (condiciones gnotobióticas o macetas con suelo no estéril). Un efecto positivo en la biomasa aérea de la variedad PAU871 fue consecuencia de la inoculación con la mayoría de las cepas, mientras que en NK940 el efecto fue variable. La cepa *Raoultella terrigena* 10R fue la única que estimuló significativamente el crecimiento en la variedad PAU871 en los ensayos realizados. La aplicación de la técnica de T-RFLP en las plantas de la variedad PAU871 crecidas en macetas con suelo:arena determinó que la comunidad de endófitos de raíces de plantas inoculadas con la cepa 10R fue la que presentó mayor diferencia con las comunidades del tratamiento control y con el resto de las plantas inoculadas. Sin embargo, las comunidades de suelo rizosférico de las plantas inoculadas con la cepa 10R fueron 90% similares a las del control. Los aislamientos evaluados presentaron una actividad hidrolítica moderada sobre los polímeros pectina y carboximetil celulosa, que podría contribuir al ingreso de las bacterias a la planta. Los resultados del estudio de colonización con las cepas *Pseudomonas* sp. 79S (aislada de rizósfera de NK940) y *Enterobacter* sp. 59T (obtenida de tallo de PAU871) marcadas con *gusA*, mostraron que ambas cepas son capaces de colonizar las raíces de plantas de la variedad PAU871 con predominio en las raíces laterales jóvenes. Se observó actividad GUS principalmente en la zona de la epidermis y con menor intensidad en la zona de la corteza. No se detectaron diferencias entre ambas cepas en el número de bacterias presentes en la superficie ni en el interior de las raíces en etapas iniciales del crecimiento radical.

Este trabajo ha permitido verificar que la interacción del maíz con diazotrofos está fuertemente influenciada por múltiples factores, entre los cuales el genotipo de la planta constituye un factor determinante. Los resultados obtenidos aportan conocimientos que permitirán avanzar en la comprensión de los factores que regulan las interacciones planta-microorganismo.

INTRODUCCIÓN

Fijación biológica de Nitrógeno en gramíneas

La mayor reserva de nitrógeno en la biosfera es el nitrógeno molecular (N₂) de la atmósfera, sin embargo el N₂ no puede ser asimilado directamente por las plantas y se vuelve disponible gracias al proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). Este proceso es único entre los procariotas, y se estima que contribuye entre 90 y 130 Tg N por año al ecosistema terrestre (Galloway *et al.*, 1995) y entre 100 y 200 Tg N por año al ecosistema marino (Karl *et al.*, 2002).

La FBN es la conversión enzimática del N molecular en amonio, catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual se puede resumir con la siguiente ecuación (Franche *et al.*, 2009)

$$\text{N}_2 + 16 \text{ MgATP} + 8 \text{ e}^- + 8 \text{ H}^+ \longrightarrow 2 \text{ NH}_3 + \text{ H}_2 + 16 \text{ MgADP} + 16 \text{ Pi}$$

La nitrogenasa es un complejo enzimático altamente conservado entre los procariotas fijadores de N₂, también llamados diazotrofos. La nitrogenasa más común, referida como Mo-nitrogenasa o nitrogenasa convencional está formada por dos metaloproteínas: una subunidad grande de 220 KDa (componente I) y otra pequeña de 68 KDa (componente II). El componente II o nitrogenasa-reductasa, es un homodímero (α:α) unidas por un grupo prostético único de 4Fe-4S codificada por el gen *nifH* (por lo que este componente se denomina a veces hierro-proteína) (Rosconi *et al.*, 2006). El componente I o nitrogenasa propiamente dicha es un tetramero (α:α:β:β) codificada por los genes *nifD* y *nifK*, que contiene dos grupos P (P-clusters), uno, (8Fe-7S) y el otro, (Mo:7Fe-9S): homocitrato, que constituye el cofactor conocido como FeMoCo (cofactor hierro molibdeno) a nivel del cual ocurre la reducción del N₂. Por ello, a este componente también se le conoce como molibdeno-hierro-proteína (Hu *et al.* 2007; Newton 2007; Rubio and Ludden 2008; Zheng *et al.* 1998).

La transcripción de los genes estructurales *nifH*, D y K que codifican para la nitrogenasa (Peters *et al.*, 1995) es estrictamente regulada, respondiendo a niveles de oxígeno molecular y nitrógeno fijado, para minimizar el consumo innecesario de energía (Dixon y Kahn, 2004). Se ha establecido que para el completo ensamblaje

de la nitrogenasa se requiere de la expresión de otros genes *nif* (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*) involucrados en la síntesis y maduración de los componentes (Hu *et al.* 2007; Rubio y Ludden, 2005; Rubio y Ludden, 2008; Zheng *et al.*, 1998).

Algunas bacterias, como *Azotobacter* y muchos de los diazotrofos fotosintéticos (incluyendo algunas cianobacterias) poseen una forma adicional de nitrogenasa cuyos cofactores contienen vanadio (Vanadio-nitrogenasa) o solo hierro (Fe-nitrogenasa) (Rubio y Ludden 2005; Newton 2007).

La capacidad de fijar N₂ está distribuida en la mayoría de los Phylum del dominio *Bacteria* y dentro de los metanogénicos del dominio *Archea* (Balandreau, 1983; Henson *et al.*, 2004; Postgate, 1981; Schmid y Hartmann, 2007; Young 1992). Sin embargo, la mayoría de los diazotrofos que contribuyen al crecimiento vegetal de las gramíneas no inoculadas no han sido identificados aún (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005). La identificación de nuevos géneros y especies de diazotrofos ha sido durante mucho tiempo obstaculizada por las limitaciones metodológicas, debido a la falta de disponibilidad de herramientas taxonómicas y filogenéticas adecuadas y a la dificultad de probar la capacidad de fijar N₂.

Bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas en gramíneas

El proceso de FBN ha sido extensamente estudiado en las simbiosis nodulares rizobio-leguminosa y frankia-no leguminosa (actinorrícicas) (Frache *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos cultivos de importancia agronómica como el maíz, arroz, trigo, sorgo, caña de azúcar, que pertenecen a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), no son capaces de formar estructuras simbióticas altamente especializadas, sino que establecen relaciones menos estrictas con bacterias rizosféricas y endófitas (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005). En algunos géneros dentro de las *Gramineae*, como es el caso de algunas variedades de caña de azúcar, se han detectado niveles sustanciales de FBN sin inoculación (Boddey, 1995). Por otro lado, existe evidencia de que otras gramíneas como *Paspalum notatum* cv. batatais, *Spartina alterniflora*, *Leptochloa fusca*, y *Ammophila arenaria* (Dalton *et al.*, 2004) son capaces de crecer

en suelos limitados en N, donde la FBN contribuye sustancialmente a sus las necesidades de N.

Las bacterias rizosféricas

Son aquellas que se encuentran en la rizósfera, término que fue introducido por Hiltner en 1901 para designar al suelo que rodea a las raíces y que se encuentra bajo la influencia de la planta (Rovira, 1991). La proliferación de las bacterias en la capa de suelo adherida a la superficie de las raíces fue descubierta a finales del siglo XIX en la misma época del descubrimiento de la FBN, adjudicado a los científicos alemanes Hellriegel y Wilfarth, quienes en 1886 señalaron que las leguminosas que poseían nódulos en las raíces eran capaces de utilizar el N₂ gaseoso. Dos años más tarde, en 1888, el microbiólogo holandés Beijerinck obtuvo un aislamiento bacteriano de un nódulo y en 1903 Lipman aisló *Azotobacter* spp. (Franche *et al.*, 2009).

La población de diazotrofos está generalmente enriquecida en la rizósfera en comparación al suelo no rizosférico (Balandreau y Knowles, 1978) ya que la rizodeposición es una fuente importante de energía y nutrientes para los microorganismos (Van Veen *et al.*, 1989). Además, dado que el proceso de FBN es energéticamente costoso y sensible al O₂, es razonable asumir que en la rizósfera los diazotrofos encuentran ventajas competitivas frente a otros microorganismos del suelo (aporte de materia orgánica y baja tensión de oxígeno) (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005).

Las bacterias endófitas

Según la definición de Quispel (1992), los endófitos son microorganismos que viven sin causar daño aparente en el interior de las células o tejidos de las plantas durante una parte de su ciclo de vida. En las últimas décadas, diazotrofos endófitos han sido aislados de varias plantas en diferentes partes del mundo (Albino *et al.*, 2006; Chowdhury *et al.*, 2007; Mirza *et al.*, 2001; Muthukumarswamy *et al.*, 1999; Parion-Llanos *et al.*, 2010; Yanni *et al.*, 1997). La diversidad de endófitos encontrada varía con el hospedero, algunos son ubicuos y otros presentan cierta especificidad (Rothballer *et al.*, 2009). Sin embargo, el término especificidad debería ser reservado sólo para aquellos endófitos que son capaces de colonizar solo un hospedero

(Schulz y Boyle, 2006). Cuando la interacción es menos específica se aconseja emplear el término “preferencia de hospedero”, en algunos casos ocurre una adaptación mutua entre el microorganismo y su huésped (Rothballer *et al.*, 2009).

Las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes y especialmente de carbono son mayores en el interior de las plantas y además el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizosféricos (James, 2000; Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2001). Además, las bacterias endófitas se encuentran mejor protegidas que las rizosféricas de las condiciones ambientales adversas (Döbereiner, 1993). Finalmente, considerando que las bacterias endófitas se ubican en contacto íntimo con las plantas, podrían brindar beneficios más directos a su hospedero en comparación con las bacterias rizosféricas (Sevilla y Kennedy, 2000).

A la hora de seleccionarlas como promotores del crecimiento vegetal, las bacterias endófitas poseen ventajas respecto a los microorganismos rizosféricos (Dong *et al.*, 2001). Deaker y Kennedy (2001) utilizando una fusión *nifH-lacZ* en *Azospirillum brasilense* Sp7-S, mutante capaz de colonizar endofíticamente las raíces de trigo, mientras que la cepa salvaje es rizosférica, demostraron que a pesar de que la nitrogenasa se expresó fuertemente en la rizósfera de trigo, los niveles de FBN fueron mayores en plantas inoculadas con la cepa endófitas.

Las bacterias endófitas diazotróficas se multiplican y diseminan dentro de los tejidos vegetales sin causar daño. A diferencia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde se conoce en detalle la comunicación entre las bacterias y su huésped, en el caso de las bacterias endófitas y las gramíneas esto constituye un área que ha comenzado a estudiarse más recientemente (Vargas *et al.*, 2003).

Hurek y Reinhold-Hurek, (2003) resumen las posibles vías de entrada de *Azoarcus* sp. a las raíces y su localización dentro de los tejidos vegetales (Fig.1).

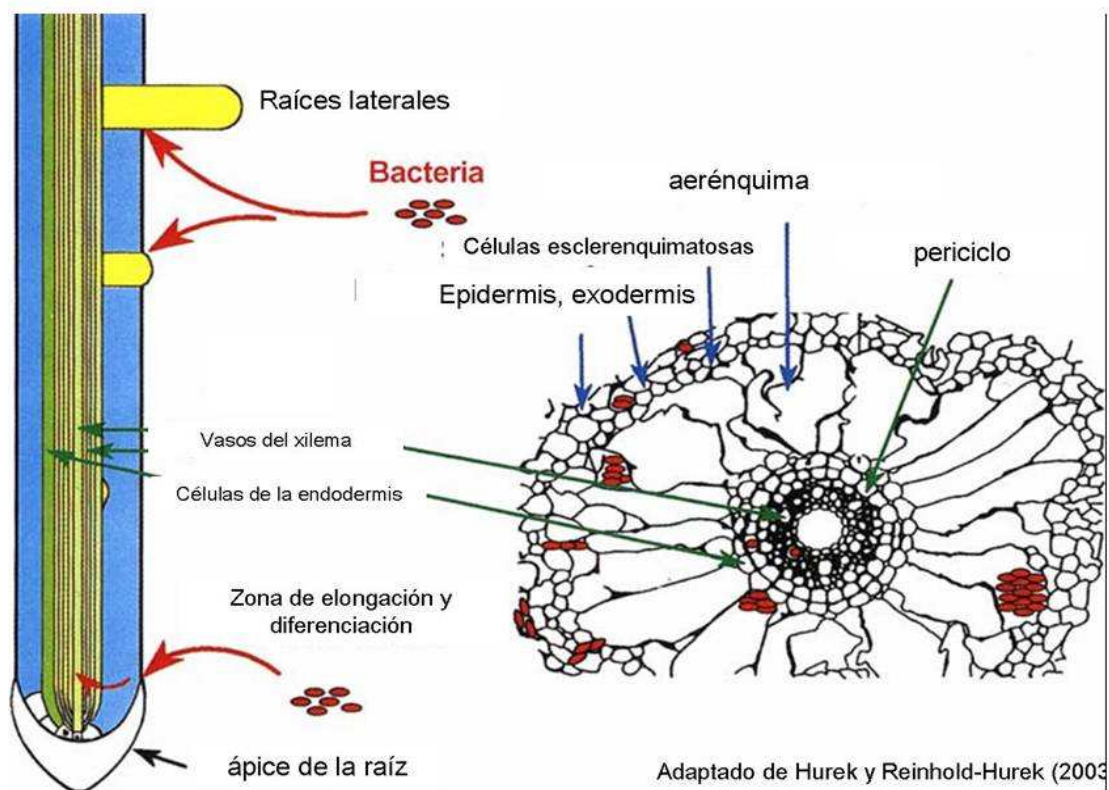


Figura 1: esquema de las posibles vías de entrada y localización de las bacterias endófitas en las raíces.

Los pasos iniciales de la colonización parecen ser similares a los de las bacterias rizosféricas, involucrando una colonización superficial en el sitio de emergencia de las raíces o la zona de elongación y diferenciación. En el caso de las bacterias endófitas, éstas se localizan mayoritariamente en los espacios intercelulares, pero también se ha observado localización intracelular en células muertas. Otra característica es la dispersión sistémica de las bacterias, que pueden encontrarse en los vasos del xilema y en los tallos, como se ha descrito en caña de azúcar inoculada con *G. diazotrophicus* (James y Olivares 1998).

Principales géneros de diazotrofos asociados a las gramíneas

Los diazotrofos no simbióticos son genéticamente diversos y pertenecen a las subdivisiones alfa, beta y gamma proteobacteria (Kennedy *et al.*, 2004).

Dentro de la subdivisión alfa proteobacterias podemos citar a *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Gluconoacetobacter*, y *Rhizobium*. Entre los fijadores libres, se destacan las especies del género *Azotobacter*; se trata de microorganismos heterótrofos aeróbicos que dependen del adecuado suministro de fuentes carbonadas para su desarrollo y se encuentran en diversos ambientes, como suelo, agua y sedimentos (Aquilanti *et al.*, 2004). Ensayos en campo han demostrado que bajo ciertas condiciones ambientales, la inoculación con *Azotobacter* produce efectos significativos en el rendimiento de gramíneas (Denarié y Blanchère, 1966; Jackson *et al.*, 1964; Rovira, 1965). Döbereiner *et al.* (1972), determinaron aportes entre 15 y 90 kg N/ha/año en la asociación específica entre *Azotobacter paspali* y *Paspalum notatum* cv. Batatais.

Azospirillum es uno de los géneros más estudiados entre los microorganismos del suelo; se caracterizan por ser bacterias aeróbicas, heterótrofas, que fijan N₂ bajo condiciones de microaerofilia (Roper y Ladha, 1995). El género fue descrito por Tarrand *et al.* (1978) y en el año 2007 se reconocían 7 especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile* y *A. doebereineriae*. (Schmid y Hartmann 2007). Las especies de *Azospirillum* presentan amplia distribución ecológica y se encuentran naturalmente asociadas con una gran diversidad de plantas, son capaces de crecer en la rizósfera de gramíneas (Kennedy y Tchan, 1992), aunque pueden asociarse a plantas no gramíneas (Döbereiner y Pedrosa 1987). En general se trata de microorganismos rizosféricos aunque ciertas cepas pueden penetrar las raíces y crecer endofíticamente (Schank *et al.* 1979; Summer, 1990). A pesar de que las especies de *Azospirillum* son capaces de fijar N₂, éste no parece ser el principal mecanismo por el que estas bacterias promueven el desarrollo vegetal, sino que se ha establecido que son capaces de producir auxinas, sustancias antimicrobianas y sideróforos (Pandey y Kumar, 1989; Tapia-Hernández *et al.*, 1990).

Gluconoacetobacter diazotrophicus es una bacteria endófito que crece mejor en sustratos ricos en sacarosa (James *et al.*, 1994), como la caña de azúcar. Este microorganismo ha sido objeto de múltiples investigaciones y es considerado un modelo de asociación endófito entre los diazotrofos y las gramíneas (Triplett, 2007). Los niveles de N derivados de la FBN detectados en caña de azúcar son muy altos (entre 60-80% del contenido de N); y *G. diazotrophicus* parece ser el responsable de

la FBN (Boodey *et al.*, 1991). El rango de hospederos de *G. diazotrophicus* es amplio ya que se ha detectado que habita el interior de plantas como remolacha, sorgo dulce, café, ananá y mijo africano (Paula *et al.*, 1991; Jimenez Salgado *et al.*, 1997; Loganathan *et al.*, 1999; Tapia-Hernandez *et al.*, 2000), sin embargo no parece ser endófito de cultivos de importancia agronómica como el arroz, trigo y maíz. A pesar de que ensayos de inoculación han demostrado promoción del crecimiento vegetal en maíz (Riggs *et al.*, 2001), el número de bacterias detectadas en los tejidos resultó muy bajo (Triplett, 2007).

Los rizobios son microorganismos simbióticos capaces de fijar N₂ en asociaciones nodulares con las leguminosas, pero también han sido aislados como endófitos de plantas de maíz en rotaciones con *Phaseolus vulgaris* (Gutierrez-Zamora y Martínez-Romero 2001) y de plantas de arroz en rotaciones con tréboles (Yanni *et al.*, 1997). La técnica de ¹⁵N demostró que el aumento del contenido de N en las planta de arroz inoculadas con rizobios no se debía a la FBN (Biswas *et al.*, 2000a), sino al hecho de que ciertas cepas de rizobios son capaces de promover el crecimiento y rendimiento de los cultivos por cambios fisiológicos o morfológicos en las raíces (Biswas *et al.*, 2000b).

Dentro de la subdivisión β proteobacteria encontramos los géneros: *Azoarcus*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum*. *Azoarcus* sp es un bacteria endófito, gram negativa, originalmente aislada del pasto Kallar (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) pero que también es capaz de colonizar plantas de arroz tanto en condiciones de laboratorio como en el campo (Hurek *et al.*, 1994). *Azoarcus* sp. BH72 penetra el rizoplasma y luego coloniza la raíz de forma intercelular. Además de la corteza, esta bacteria es capaz de encontrarse en los vasos del xilema, pero no existen evidencias de colonización intracelular en células vivas (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). *Azoarcus* sp. BH72 parece encontrarse en un modo no cultivable dentro de las plantas inoculadas (Hurek *et al.*, 2002). Este estado no cultivable *in planta*, ha dificultado el conocimiento del número de células presentes en los tejidos vegetales luego de unos días de la inoculación y del número de células necesario para que ésta bacteria ingrese a la planta. Por otro lado no se conoce la capacidad de esta bacteria de sobrevivir en el suelo.

Burkholderia es un género que comprende 29 especies, varias de ellas actúan como diazotrofas (Estrada- de los Santos *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 2002). Algunas de las especies han sido descritas como rizosféricas o asociativas (Baldani *et al.*, 1997; Gillis *et al.*, 1995) y otras como endófitas (Baldani *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2000).

Herbaspirillum es un diazotrofo endófito que coloniza caña de azúcar, arroz, maíz, sorgo y otros cereales (Kennedy e Islam, 2001; El-Mohandes, 1999; James *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2000; Roncato-Maccari *et al.*, 2003a). Varios estudios, tanto en condiciones controladas como en campo han demostrado que bacterias del género *Herbaspirillum* fueron capaces de promover el crecimiento de plantas de arroz dependiendo de la cepa y de la variedad (Mirza *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2000; Baldani *et al.*, 2000), así como el crecimiento de maíz (Riggs *et al.*, 2001). La FBN podría ser el mecanismo que beneficia el crecimiento de estas gramíneas, Roncato-Maccari *et al.*, (2003b) demostraron expresión de genes *nif* en los tejidos de varias gramíneas inoculadas con *Herbaspirillum seropedicae*.

Dentro de la subdivisión γ proteobacteria encontramos los géneros: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y otros. Varios géneros de enterobacterias han sido aislados en asociación con los vegetales, se postula que probablemente el uso de residuos orgánicos en los cultivos ha llevado al desarrollo de una microflora adaptada a las condiciones existentes en el ecosistema animal-suelo-planta (Kennedy *et al.*, 2004). Diazotrofos del género *Klebsiella* fueron aislados por primera vez de plantas de maíz por Palus *et al.*, (1996). La cepa *K. pneumoniae* 342 (Chelius y Triplett 2000a) ha sido objeto de múltiples investigaciones y es considerada un modelo como diazotrofo (Triplett, 2007). Esta cepa fue capaz de producir el componente II de la nitrogenasa (*NifH*) en plantas suplementadas con sacarosa. Ensayos de inoculación demostraron que esta cepa fue capaz de entrar en todos los huéspedes ensayados incluyendo *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, y *Triticum aestivum* (Dong *et al.*, 2003b). Los resultados de Riggs *et al.*, (2002) sugieren que esta cepa es capaz de promover el crecimiento vegetal mediante un mecanismo independiente de la FBN, probablemente por producción de fitohormonas.

Varios test fisiológicos y moleculares sugieren que Kp342 es una cepa de la especie *K. pneumoniae* aunque los resultados sugieren que no es un patógeno humano

(Dong *et al.*, 2003a). Al igual que con otros diazotrofos pertenecientes a la familia de las enterobacterias, se deben realizar estudios que comprueben que estos microorganismos no representan un riesgo para la salud humana (Triplett, 2007).

Métodos de estudio de la FBN en gramíneas

Métodos para medir la FBN

Durante más de 40 años de investigación en FBN no simbiótica, se han utilizado distintos métodos para medir este proceso en asociación con los vegetales. En sus comienzos la FBN ha sido evaluada mediante la técnica de Reducción del Acetileno (ARA) (Hardy *et al.*, 1968) que se basa en la capacidad de la enzima nitrogenasa de reducir otros compuestos con triple enlace además del N₂, como por ejemplo el acetileno, y permite detectar y cuantificar el etileno producido. Esta técnica se usa para una determinación rápida de la actividad nitrogenasa, puede aplicarse tanto en cultivos puros, como en raíces, suelos o ensayos en invernáculo (Bergersen, 1980). Es muy útil para una preselección de sistemas con FBN en condiciones establecidas pero no se aconseja actualmente para cuantificar el aporte de N. En un sistema ARA positivo seguramente ocurre FBN pero la afirmación contraria no puede hacerse ya que la FBN es un proceso muy sensible a diferentes condiciones abióticas y además la técnica solo permite realizar medidas en un corto período de tiempo ya que la actividad nitrogenasa decae luego de varios minutos de exposición al acetileno (Van Bemmelen y Bohlool, 1980). La capacidad de fijar N₂ de bacterias aisladas es con frecuencia difícil de probar, por el hecho de que un gran número de aislamientos de sistemas no-simbióticos no expresan frecuentemente la nitrogenasa en vida libre. Por lo tanto, el ensayo de reducción de acetileno sólo se emplea a título comparativo entre sistemas fijadores (Francheteau *et al.*, 2009).

Para relacionar la actividad enzimática con la cantidad de N₂ atmosférico incorporado a la planta se utilizan las técnicas isotópicas del ¹⁵N que permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera y proporcionan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento dado (Barea, 1991; Danso, 1995). El uso de técnicas usando como trazador ¹⁵N permitió demostrar efectivamente la FBN.

El N tiene dos isótopos con las mismas propiedades químicas que presentan ligeras diferencias físicas causadas por sus masas atómicas; el ^{14}N es abundante y liviano y el ^{15}N es menos abundante y pesado. La concentración de isótopos estables de un compuesto o material se representa como la relación molecular del isótopo pesado respecto al isótopo liviano. La abundancia de isótopos estables se expresa relativa a un estándar internacional, y se denomina delta.

δ : es el valor delta de la muestra para N en partes por mil (‰).

$$\delta \text{ (‰)} = \left[\left(\frac{R_m}{R_s} \right) - 1 \right] \times 1000$$

R_m : relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de la muestra.

R_s : relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ del aire.

La FBN puede estimarse con técnicas basadas en abundancia natural ó usando fertilizantes enriquecidos en ^{15}N . La metodología consiste en determinar el valor isotópico de N de plantas fijadoras y no fijadoras (referencia) creciendo en un mismo sitio. Para ambas técnicas la planta referencia elegida debe ser la que mejor refleje el valor isotópico del N proveniente del suelo (abundancia natural) ó de la mezcla suelo + fertilizante (enriquecimiento) en un sitio dado.

La concentración de ^{15}N en el aire es muy estable ($0.3663 \pm 0.0004\%$) y se le denomina abundancia natural (Létolle, 1980) que expresada como delta es igual a cero. Las técnicas que trabajan a nivel de abundancia natural, se basan en la leve variación existente en la relación de los isótopos estables de N (^{15}N y ^{14}N), debido al fraccionamiento isotópico que ocurre durante los procesos físicos, químicos y biológicos en que interviene dicho elemento (Dawson y Brooks, 2001). Los microorganismos y plantas que crecen fijando N_2 presentan un valor de $\delta^{15}\text{N}$ negativo o cercano a cero; mientras que las plantas que crecen utilizando mayoritariamente el N del suelo presentan valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$ (Boddey *et al.*, 2001).

La técnica de abundancia natural ha sido empleada en numerosas gramíneas para medir la fijación no simbiótica, con resultados muy diversos; ha sido utilizada en plantas del género *Paspalum* demostrando la existencia de FBN asociada (Martinelli *et al.*, 1992), en caña de azúcar (Boddey *et al.*, 2001; Yoneyama *et al.*, 1997) así como en otras plantas no pertenecientes a la familia de las gramíneas como la palma africana (de Carvalho *et al.*, 2008).

Por otro lado, la técnica de dilución isotópica de ^{15}N se basa en adicionar un compuesto marcado con ^{15}N al suelo, y luego asumir que, tanto la planta fijadora como otra no fijadora (referencia) obtendrán nitrógeno de ese suelo con el mismo enriquecimiento isotópico de ^{15}N (Chalk 1985). Ésta técnica ha sido utilizada para medir el % de N derivado de la FBN en varias gramíneas como *Paspalum notatum* (Boodey *et al.*, 1983), *Panicum maximum* (Miranda *et al.*, 1990) y en cultivos como el maíz (Montañez *et al.*, 2009), arroz (Baldani *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2008) y caña de azúcar (Mirza *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002).

Boddey *et al.*, (2000) discuten el empleo de la técnica de abundancia natural de ^{15}N para medir la FBN en árboles y arbustos y examinan los principales problemas a considerar para la aplicación de esta metodología. Unkovich y Baldock, (2008) revisaron ambas técnicas isotópicas y su aplicación en la cuantificación del proceso de FBN en sistemas no simbióticos. Uno de los problemas existentes ha sido encontrar una planta de referencia adecuada, por lo que muchas veces el uso de las técnicas isotópicas de ^{15}N para estimar la FBN es restringido (Boddey *et al.*, 2003). Este método requiere que la planta referencia y la planta fijadora presenten similitudes en: 1) distribución radical, 2) patrón de extracción de N y 3) preferencia por las diferentes formas de N mineral y orgánico del suelo (Högberg, 1997).

Otra de las técnicas isotópicas es la de reducción del $^{15}\text{N}_2$, se basa en colocar la planta en un sistema cerrado donde la atmósfera es reemplazada por una atmósfera de $^{15}\text{N}_2:\text{O}_2$ y luego determinar el ^{15}N incorporado por la planta por la reducción del N_2 marcado en la atmósfera. Si bien esta técnica ha sido aplicada para medir la FBN (Elbeltagy *et al.*, 2001; Fűrnkranz *et al.*, 2008; Ruschel *et al.*, 1975; Sevilla *et al.*, 2001), el uso de gas con ^{15}N es impracticable a nivel de campo (Giller y Merckx, 2003; Matsui *et al.*, 198; Wood y McNeill, 1993).

Métodos para detectar y analizar las poblaciones de diazotrofos endófitos

Según Rothballer *et al.*, (2009) son tres las estrategias generalmente empleadas para estudiar a los microorganismos endófitos en los tejidos vegetales:

- i) el aislamiento a partir de tejido superficialmente desinfectado,
- ii) la amplificación por PCR de genes marcadores de los microorganismos presentes en los tejidos vegetales,

iii) el marcado de los microorganismos por métodos inmunológicos, fluorescentes, cromogénicos, etc.

i) Aislamiento

Las poblaciones de diazotrofos endófitos cultivables se encuentran en el rango de 10^6 a 10^8 bacterias por gramo de raíces (Barraquio *et al.*, 1997; Engelhard *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2009; Reinhold *et al.*, 1986). Para su aislamiento se desinfectan superficialmente los tejidos vegetales, como las raíces, tallos y hojas. Generalmente, para remover los contaminantes de la superficie se utiliza hipoclorito de sodio (Loganathan *et al.*, 1999) o cloramina T (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993). Después, las plantas se enjugan abundantemente en condiciones de esterilidad para eliminar el desinfectante. Reinhold-Hurek y Hurek (1998), revisaron varios procesos de desinfección y su eficacia en el aislamiento de endófitos. Döbereiner (1995), propuso la siembra de trozos de raíces, tallos y hojas desinfectados superficialmente en medios semisólidos sin N combinado, para el aislamiento de diazotrofos endófitos. Otro método es el descrito por Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado (2001), en el cual 1g de tejido desinfectado superficialmente se macera con solución salina estéril, se realizan diluciones seriadas y se siembra cada dilución en frascos con medios semisólidos sin nitrógeno. Cuando se requiere conocer la densidad de bacterias asociadas a la planta generalmente se recurre al método del número más probable (MPN), a partir de diluciones decimales del macerado original, alícuotas de cada dilución son inoculadas por triplicado o quintuplicado en los medios de cultivo apropiados (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2001).

Una metodología reiterada en la literatura para obtener aislamientos de endófitos probablemente diazotrofos, es la de utilizar diferentes medios de cultivo semisólidos sin nitrógeno combinado. Los medios semisólidos proporcionan un gradiente de oxígeno que permite el crecimiento de bacterias fijadoras según sus necesidades de oxígeno. En algunos casos, conociendo los requerimientos de carbono de alguna bacteria en particular se recomienda suplementar el medio con esa fuente de carbono a los efectos de aislar la bacteria específica. Por ejemplo, *Azospirillum* spp. crece bien con ácidos orgánicos como málico y succínico y *G. diazotrophicus* crece preferentemente en altas concentraciones de sacarosa (Cavalcante y Döbereiner, 1988).

Finalmente, luego del enriquecimiento en medio semisólido sin N combinado, se emplea el mismo medio sólido con extracto de levadura, a los efectos de obtener cultivos puros (Jha *et al.*, 2009) o de lo contrario se usan otros medios de cultivo que posean nitrógeno combinado.

Las bacterias aisladas pueden ser re-inoculadas en las plantas y si son capaces de cumplir con el postulado de Koch entonces son denominados verdaderos endófitos (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998).

ii) Métodos basados en la amplificación del gen nifH

El estudio de las comunidades de diazotrofos utilizando las metodologías convencionales de microbiología, que implican el aislamiento y desarrollo de un microorganismo en un medio de cultivo ha sido limitado, ya que sólo se conoce una pequeña fracción de los microorganismos. Los métodos dependientes del cultivo pueden llevar a una subestimación de la diversidad microbiana porque, un microorganismo puede ser cultivado solo después de que las condiciones fisiológicas de su nicho son conocidas y éstas se reproducen experimentalmente (Ward *et al.*, 1990). Esto lleva a la conclusión de que para realizar una descripción más exacta de la comunidad de endófitos es necesario apelar a las técnicas independientes del cultivo (Chelius y Tripplet, 2001).

Los métodos más utilizados están basados en la amplificación por PCR de biomarcadores como el gen *nifH*, lo que permite demostrar la presencia de fijadores de N₂ en el ambiente, y evaluar la diversidad bacteriana sin aislar las cepas, considerando por lo tanto a la población no cultivable (Ueda *et al.* 1995; Elbeltagy *et al.* 2001; Hamelin *et al.*, 2002; Roesch *et al.*, 2008).

Este gen que codifica para la subunidad hierro-proteína de la enzima nitrogenasa, se encuentra altamente conservado en los diazotrofos (Young, 1992; Zehr *et al.*, 2003). Además, al tratarse de un gen funcional, posee la ventaja de que proporciona evidencia de fijación potencial de N₂ (Young, 1992) y dado que es el gen más estudiado dentro del operon *nif*, las bases de datos poseen un número elevado de secuencias tanto de organismos cultivables como no cultivables de diversos

ambientes (Ueda *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 2003; Zehr *et al.*, 2003; Demba Diallo *et al.*, 2004; Yeager *et al.*, 2004).

Se encuentran disponibles varios *sets* de *primers* universales para amplificar el gen *nifH* (ej. Okhuma *et al.*, 1996; Piceno *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 1995; Widmer *et al.*, 1999; Zehr y McReynolds, 1989), los cuales amplifican fragmentos de diazotrofos no relacionados.

Franke *et al.* (1998) y Widmer *et al.*, (1999) utilizaron la amplificación del gen *nifH* para detectar diazotrofos en suelo, Ueda *et al.*, (1995) y Lovell *et al.*, (2000) para detectar fijadores endófitos en plantas y Zehr *et al.*, (1998) y Ohkuma *et al.*, (1996) detectaron la presencia de bacterias fijadoras de N₂ en océanos y en termitas mediante la amplificación de genes *nifH*.

Para evaluar la diversidad de la población de diazotrofos se emplean técnicas que permiten la amplificación y posterior resolución de amplicones de similar tamaño, pero que difieren en su secuencia. Estas diferencias en la secuencia son detectados mediante técnicas como el DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1993) o su equivalente TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1998) y T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Liu *et al.*, 1997, Marsh, 1999). Estos procedimientos permiten acceder a la comunidad total y evaluar los cambios en su diversidad genética frente a perturbaciones ambientales o cambios en la estructura comunitaria en el tiempo.

Dentro de las técnicas independientes del cultivo, el método de *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms* (T-RFLP) (Liu *et al.*, 1997), fue desarrollado para el análisis de comunidades bacterianas de muestras ambientales. Este método se ha empleado en ecología microbiana para el estudio de comunidades de bacterias endófitas de varias especies vegetales (Reiter *et al.*, 2002, Sessitsch *et al.*, 2001). Empleando como indicador el gen *nifH*, el T-RFLP se ha aplicado para el estudio de comunidades fijadoras de N₂ (Förnkrantz *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2003; Yeager *et al.*, 2004).

Otro abordaje es el análisis de las poblaciones funcionales de diazotrofos. Estudios realizados mediante transcripción reversa y amplificación (RT-PCR) de *nifH* cDNA de

muestras de ARN, han permitido la evaluación de la expresión de genes de la enzima nitrogenasa. La transcripción del gen *nifH* en los diazotrofos está directamente relacionada con la actividad funcional de la nitrogenasa (Merrick y Edwards, 1995), por lo que se utiliza ampliamente como herramienta molecular para monitorear la actividad de los microorganismos en su ambiente natural (You *et al.*, 2005).

Algunos de los trabajos que emplearon esta técnica incluyen los realizados por Hurek *et al.*, (2002) quienes aislaron una secuencia *nifH* poly(A) mRNA de raíces del pasto Kallar inoculadas con *Azoarcus* sp. BH72 y demostraron que esta bacteria endófito estaba metabólicamente activa y expresaba la nitrogenasa en la planta. Knauth *et al.*, (2005) aplicaron un método basado en el análisis mediante T-RFLP de productos de RT-PCR de *nifH*-mRNA por el cual obtuvieron el perfil de la comunidad de diazotrofos endófitos de arroz que expresaban el gen *nifH*. Los autores señalan que el perfil de la comunidad de diazotrofos presentes en las plantas no coincidía con el perfil de la comunidad de diazotrofos activos. Resultados similares fueron obtenidos por Zhang *et al.*, (2007) que utilizaron secuencias de genes *nifH* y diseñaron un *microarray* basado en sondas cortas que permitió analizar la diversidad (utilizando ADN) y la actividad (utilizando mRNA) de diazotrofos endófitos de raíces de arroz. Los resultados mostraron que de la población de diazotrofos presentes sólo una pequeña porción eran activos fijadores de N₂. Estos estudios demuestran la utilidad de los métodos basados en mRNA y la importancia de estudiar la diversidad funcional y de eventualmente poder identificar diazotrofos claves en determinados ambientes.

iii) Marcado de microorganismos

Para determinar la colonización o localización de los microorganismos en los tejidos vegetales es necesario utilizar marcadores. Los marcadores deben cumplir con ciertos requisitos: ser específicos del microorganismo en estudio, estables en el suelo o planta y en el tiempo, no deben afectar el comportamiento de la bacteria y deben ser fácilmente detectables en un amplio rango de condiciones ambientales (Gamalero *et al.*, 2003). Dentro de los marcadores podemos distinguir marcadores serológicos y moleculares.

La base del uso de marcadores serológicos son las reacciones antígeno-anticuerpo. Los inmunoensayos se basan en la detección y cuantificación de las reacciones antígeno-anticuerpo cuya detección es posible mediante la conjugación de una molécula señal (fluorocromo, enzima o radioisótopo) al anticuerpo. El aspecto crítico de las técnicas inmunológicas es la especificidad de los anticuerpos utilizados. Pueden ser utilizados anticuerpos policlonales o monoclonales, estos últimos resultan más costosos de obtener pero son más específicos (Gamalero *et al.*, 2003). Las técnicas inmunológicas son útiles para la detección, enumeración y localización de una cepa dada en un ambiente como puede ser el suelo o la planta (Gamalero *et al.*, 2003). Rothballer *et al.*, (2008) obtuvieron un antisuero policlonal contra las cepas Mb11 y GSF30 de *Herbaspirillum frisingense* que permitió la inmunolocalización de estas bacterias en asociación con *Miscanthus x giganteus*.

Dentro de los marcadores moleculares podemos citar varios como la resistencia a antibióticos (Glandorf *et al.*, 1992; Van Elsas *et al.*, 1986), los marcadores cromogénicos (*xyE*, *gusA*, *lacZ*) (Marek-Kozaczuk *et al.*, 2000; Roger *et al.*, 2004), los luminiscentes (*luxAB*, *luc*) (Ma *et al.*, 2001; Rattray *et al.*, 1995; Turnbull *et al.*, 2001), los fluorescentes (*gfp*) (Lowder y Oliver, 2001; Normander *et al.*, 1999) y el uso de sondas específicas (Werner *et al.*, 1996).

La resistencia a antibióticos ha sido ampliamente utilizada en ecología microbiana. A pesar de que se han utilizado plásmidos y transposones para introducir resistencia a antibiótico en las bacterias (De Lorenzo, 1994; Prosser, 1994), muchos estudios se han realizado utilizando la resistencia espontánea que genera mutantes resistentes. La resistencia a antibióticos es usualmente utilizada para monitorear las bacterias introducidas en la rizósfera o en el interior de las plantas ya que las bacterias son detectadas simplemente mediante recuento en placas (Marek-Kozaczuk *et al.*, 2000), lo cual resulta un método simple, sensible y barato. Sin embargo el gen de resistencia puede estar localizado en el cromosoma y ocasionar cambios genéticos que podrían afectar el comportamiento ecológico de la bacteria marcada (Blot *et al.*, 1994; Mahaffee *et al.*, 1997).

Los genes *xyE*, *lacZ* y *gusA* codifican para enzimas que en presencia de un sustrato reaccionan generando la formación de un pigmento que permite localizar la bacteria

marcada. Entre estos marcadores cromogénicos, el gen *gusA* ha sido ampliamente utilizados en las interacciones plantas-microorganismos para estudiar la colonización y localización de las bacterias dentro de la planta, más precisamente ha sido aplicado en el estudio de diazotrofos en asociación con gramíneas (Govindarajan *et al.*, 2007; James *et al.*, 2002; Loganathan y Nair, 2003; Rouws *et al.*, 2010). A pesar de su amplio uso, varias desventajas han sido discutidas en referencia a esta metodología (Jansson, 1998), principalmente el hecho de que para su detección se requiere el agregado de un sustrato y que el producto de ese gen es medido luego de varias horas, durante las cuales puede no ser estable o difundir (Gamalero *et al.*, 2003).

Otro método es la transferencia de genes de bioluminiscencia a las bacterias en estudio incorporándole la capacidad de emitir luz. Se han clonado genes de bioluminiscencia procariotas de *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi* (Belas *et al.*, 1982; Engebrecht *et al.*, 1983), y genes eucariotas de *Photinus pyralis* (De Wet *et al.*, 1985). La limitante para la expresión de estos genes es que requieren oxígeno, y sólo cuando éste está presente la emisión de luz permite la determinación de la actividad microbiana así como su localización (Molin y Givskov, 1999).

Otro marcador atractivo para monitorear las bacterias en asociación con los vegetales es la proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie *et al.*, 1994). Varios de los microorganismos diazotrofos endófitos de gramíneas han sido marcados utilizando GFP con el objetivo de conocer como ocurre el proceso de colonización y su localización en la planta (Liu *et al.*, 2006; Njoloma *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2004). Las ventajas y desventajas de este marcador han sido discutidas por Errampalli *et al.*, (1999). Las principales ventajas son: se trata de una proteína estable y resistente a las proteasas, fácilmente detectable, que no requiere de sustratos exógenos y que permite la detección incluso de una única célula en tiempo real. Dentro de las desventajas podemos citar que la expresión de GFP puede variar en las diferentes especies bacterianas y la incapacidad de trabajar en condiciones anaeróbicas.

Las bacterias también pueden ser monitoreadas mediante sondas especie o cepa específicas que permiten la hibridación con una determinada secuencia de la bacteria. Las sondas generalmente son unidas covalentemente a fluorocromos como

la fluoresceína, Texas red, Cy3 o Cy5 (Amann *et al.*, 2001) que permiten su visualización. Assmus *et al.*, (1995) describieron la localización *in situ* de *Azospirillum brasilense* en la rizósfera de trigo. Jha *et al.*, (2009) emplearon la hibridación *in situ* utilizando diversas sondas género y especie específicas para identificar a los microorganismos asociados a plantas de arroz.

Las bacterias marcadas con fluorescencia (ya sea con anticuerpos fluorescentes, GFP o sondas fluorescentes) pueden ser detectadas mediante observación en un microscopio epifluorescente con un filtro adecuado. El mayor problema radica en el ruido de fondo proveniente de la muestra (partículas de suelo o tejido vegetal). En los últimos años con el desarrollo de la microscopía confocal (*Confocal laser scanning microscopy*- CLSM) se han realizado importantes avances en este sentido. La CLSM permite la visualización de las células microbianas marcadas con una alta resolución; además permite generar imágenes tridimensionales y procesar digitalmente esas imágenes. Tal vez la mayor ventaja radica en que el microscopio confocal permite la detección de la señal del plano que se encuentra en foco, lo que reduce el ruido producido por otros materiales como el tejido vegetal o partículas de suelo. Además, utilizando diferentes canales, permite la detección de poblaciones bacterianas diferentes. Los trabajos de Liu *et al.*, (2006); Rothballer *et al.*, (2008); Singh *et al.*, (2011) y Verma *et al.*, (2004) son ejemplo de aplicación de esta tecnología en el estudio de las bacterias endófitas.

El cultivo de maíz

Los cereales como el maíz, arroz y trigo que pertenecen a la familia de las *Poaceae* son fuente de alimento para aproximadamente 6.5 billones de personas en el mundo (Bhattacharjee *et al.*, 2008). El maíz, es además un cereal de consumo animal, el cual es utilizado en la alimentación a corral de novillos en los sistemas intensivos de engorde (Vaz *et al.*, 2006) o en la fabricación de raciones para la alimentación de aves y cerdos. Además, se ha observado un renovado interés en su cultivo para la producción de bioetanol y de biodiésel, éste último como subproducto de la producción de aceite vegetal de maíz (Marland y Turhollow, 1991). En América, Brasil y Estados Unidos son los principales países productores de bioetanol. A diferencia de Brasil donde el bioetanol se produce principalmente en base a caña de

azúcar, en Estados Unidos es producido a partir del grano de maíz con un rendimiento promedio de 372 litros de bioetanol por cada tonelada de maíz (Honty y Gudynas, 2007).

Las plantas de maíz requieren de 9-11 t de N para producir 1 t de biomasa (Anuar *et al.*, 1995). En el suelo, el contenido de nitrógeno es relativamente bajo y es removido en cantidades superiores al resto de los nutrientes, por lo que frecuentemente es el limitante del crecimiento vegetal (Frioni, 1999). Por lo tanto, para lograr un buen rendimientos en los cultivos son esenciales las aplicaciones de fertilizante nitrogenado. El aumento exponencial de la población mundial ha traído consigo la necesidad de aumentar la producción de cereales y con ello el aumento del uso de fertilizantes. Según la FAO en el año 2007 la producción de fertilizante nitrogenado alcanzó los 130 Tg (millones de toneladas) y se espera que continúe creciendo (FAO, 2008). Por ejemplo, en Asia el uso de los fertilizantes nitrogenados ha aumentado de 1.5 Tg en 1961 a 47 Tg por año en 1996 (Dawe, 2000). El incremento de la utilización de fertilizantes en los últimos años ha traído dificultades económicas y ambientales a nivel mundial. Para fijar por el método de Haber Bosch los 130 Tg de fertilizantes que cada año en promedio son aplicados por el hombre a los suelos, se requieren altas cantidades de combustibles fósiles (Mosier *et al.*, 2002). El encarecimiento de estos combustibles, el costo de producción y de transporte provocan en países como el nuestro, un aumento en los precios de los cereales que llegan al consumidor (Reis *et al.*, 2000).

Generalmente, la urea es la fuente de nitrógeno más empleada y diversos factores hacen que menos del 50% sea utilizada por la planta (Choudhury y Khanif, 2001; Garabet *et al.*, 1998; Halvorson *et al.*, 2002). La baja eficiencia de la fertilización se debe a la volatilización del NH_3 , desnitrificación y pérdidas por lavado (Bijay-Singh *et al.*, 1995; De Datta y Buresh, 1989). La volatilización y la desnitrificación polucionan el ambiente por la emisión de gases como NO, N_2O y NH_3 , por otro lado las pérdidas por lavado de NO_3^- causan toxicidad en las aguas (Shrestha y Ladha, 1998). La contaminación derivada del uso indiscriminado de fertilizantes en la agricultura, es hoy en día uno de los grandes problemas medioambientales. A nivel mundial, existe una gran preocupación por el aumento de la concentración de nitratos en las aguas

superficiales y subterráneas, que posee efecto en la salud humana y produce deterioro en los ecosistemas acuáticos al favorecer la eutrofización de las aguas.

En este contexto, la asociación de las plantas con bacterias fijadoras de N₂ se visualiza como una alternativa de solución a los problemas económicos y ambientales del cultivo de maíz. Estas bacterias permiten aportar nitrógeno a partir de una fuente renovable de este elemento que es el aire y lo hacen de forma autorregulable, sustituyendo parcialmente el uso de nitrógeno químico. De esa manera, se busca incrementar el rendimiento del cultivo mediante el aporte de nitrógeno en forma económica y ecológicamente sustentable potenciando la fijación biológica de este elemento (Döbereiner, 1993).

Antecedentes de fijación biológica de N₂ en maíz

El conocimiento de la diversidad y la riqueza de diazotrofos constituye un importante paso en la comprensión del proceso de la FBN en gramíneas (Hong *et al.*, 2006), y en este caso especialmente, en el cultivo de maíz. Durante las últimas décadas, en asociación con el maíz se han aislado diazotrofos de los géneros *Azospirillum* (Chritansen-Weniger y Vanderleyden 1994), *Klebsiella* (Chelius y Triplett 2000a; Dong *et al.*, 2001); *Pantoea* (Rijavec *et al.*, 2007), *Herbaspirillum* y *Bacillus* (Chelius y Triplett 2000b; Palus *et al.*, 1996), *Enterobacter* (Mehnaz *et al.*, 2010), *Paenibacillus azotofixans* (Seldin *et al.*, 1998), *Rhizobium* (Gutierrez-Zamora y Martínez-Romero 2001; Montañez *et al.*, 2009), *Rahnella* (Montañez *et al.*, 2009) y *Burkholderia* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Perin *et al.*, 2006).

Mediante métodos independientes del cultivo se ha demostrado que existe una gran diversidad de diazotrofos asociados a maíz. El trabajo de Roesch *et al.*, (2008) se basó en analizar un gran número de muestras de suelo rizosférico, raíces y tallos de plantas de maíz crecidas en 6 áreas de campo de Brasil. Los resultados demostraron que la mayoría de las secuencias pertenecieron a las *Proteobacterias*, siendo las subdivisiones α - proteobacteria y β - proteobacteria las más abundantes en el suelo rizosférico y tallos, mientras que las γ -proteobacteria fueron abundantes en el suelo rizosféricos decreciendo en abundancia en las raíces y tallos.

Mediante la técnica de dilución isotópica de ^{15}N se ha establecido la contribución del proceso de FBN al cultivo de maíz; García de Salomone *et al.*, (1996) determinaron niveles significativos de FBN en dos cultivares de maíz inoculados con una mezcla de cepas de *Azospirillum*; resultados similares fueron obtenidos por El-Komy *et al.*, (1998) que señalaron niveles de entre 26-31% Ndda (Nitrógeno derivado de la atmósfera) en plantas inoculadas en invernáculo con *Azospirillum lipoferum* y de 17% en plantas inoculadas con *A. brasilense*. Por otro lado, Montañez *et al.*, (2009) encontraron entre un 12-33% Ndda en distintas variedades de maíz creciendo en suelo sin inocular.

Las bacterias diazotrofas se asocian a los diferentes cultivares de maíz promoviendo el crecimiento vegetal no sólo por fijación de N_2 , sino también por la producción de varias sustancias con carácter estimulante del crecimiento (Zahir *et al.*, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2003). En maíz, varios autores han demostrado el efecto benéfico de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en el rendimiento y crecimiento vegetativo (Mishra *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1998; Radwan, 1998). Por otro lado, pruebas de inoculación con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp. mostraron aumentos significativos de la productividad de grano/ha de cultivo, así como incrementos en el peso seco radical y en parámetros de la parte aérea (Bellone *et al.*, 1999; Fulchieri y Frioni, 1994; James, 2000). Dobbelaere *et al.*, (2001) señalaron que la inoculación con *A. brasilense* en experimentos en macetas producía un incremento entre 21-90% en el rendimiento de granos, dependiendo del tipo de suelo; y en ensayos a campo producía un aumento del 33% en el rendimiento de granos. Por otro lado, Riggs *et al.*, (2001) observaron que cuando se inoculaban semillas de maíz con *H. seropedicae* en ensayos en invernáculo el rendimiento aumentaba entre un 49-82% con la aplicación de fertilizante nitrogenado, mientras que en ausencia de fertilizante el incremento fue solo del 16%. Estos autores también señalaron un aumento del 19.5% en el rendimiento de maíz en ensayos a campo donde se aplicó fertilizante nitrogenado; lo que indica que además de la FBN participan otros mecanismos que mejoran la capacidad de la planta de usar el fertilizante y por lo tanto promueven el crecimiento vegetal.

En Uruguay, en los últimos años el área sembrada de maíz ha aumentado de 39.000 hectáreas en 2003 a 96.000 hectáreas en 2010; en base a la información correspondiente a la zafra 2009/10 ocupa el tercer lugar entre los cultivos después de la soja y el trigo (DIEA, 2009/10). Como fue mencionado anteriormente, el cultivo de este cereal presenta problemas tanto económicos como ambientales. La asociación de la planta con bacterias fijadoras de N₂ se visualiza como una alternativa de solución a los problemas económicos y ambientales del cultivo de maíz.

El Laboratorio de Microbiología del Suelo (LMS) de la Facultad de Ciencias ha iniciado la investigación sobre FBN en el cultivo de maíz con la ejecución durante el período 2004-2006 de un proyecto titulado “Fijación de nitrógeno en variedades comerciales de maíz (*Zea mays* L.) en Uruguay”, con la financiación del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA, Austria, Viena). En este proyecto se trabajó con 19 variedades de maíz en las que se demostró la contribución de la FBN mediante la técnica de dilución isotópica de ¹⁵N y se constituyó una colección de diazotrofos endófitos aislados de diferentes variedades (Montañéz *et al.*, 2009). Este trabajo demostró que existen diferencias entre los genotipos de maíz en el nivel de FBN y que además los niveles de FBN variaron en los distintos genotipos en la respuesta a la fertilización nitrogenada.

La presente tesis de Doctorado se desarrolló en relación a esta línea de investigación y se centró en el estudio del efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre la comunidad de bacterias diazotrofas asociados a maíz, a nivel de la rizósfera o como endófitos. La colonización de las plantas de maíz por diazotrofos puede estar afectada por factores bióticos como abióticos, la investigación sobre el efecto de distintos factores así como sobre aspectos básicos de la fisiología de los diazotrofos ayudará en un futuro inmediato a comprender los mecanismos que influyen en el establecimiento de una comunidad diazotrófica endófito eficiente en la promoción del crecimiento del cultivo de maíz, que pueda ser empleada eficientemente como inoculante por los técnicos agropecuarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Albino U., Saridakis D. P., Ferreira M. C., Hungria M., Vinuesa P., Andrade G. 2006. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant Soil* 287:199–207.
- Amann R., Fuchs B., Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 231–236.
- Anuar A.R., Shamsuddin Z.H., Okon Y. 1995. Contribution of legume-N by nodulated groundnut for growth of maize on an acid soil. *Soil Biol. Biochem.* 27: 595-601.
- Aquilanti L., Favilli, F. Clementi, F. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1475-1483.
- Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R., Hartmann A. 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotide probes and scanning confocal microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013–1019.
- Balandreau J. 1983. Microbiology of the association. *Can. J. Microbiol.* 29:851–85
- Balandreau J., Knowles R. 1978. The rhizosphere. En: Interactions between non-pathogenic soil organisms and plants Y. R. Dommergues y S. V. Krupa (Eds.), Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co. pp. 243-268.
- Baldani J.I., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S.R., Döbereiner J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29: 911–922.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertil. Soils* 30: 485–491.
- Barea, J. 1991. Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de ^{15}N . En Fijación de N y micorrizas. J. Olivares y J. Barea (Ed.). Fijación y movilización

- biológica de nutrientes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, RAYCAR, S. A., Madrid, España Vol. II. pp 105-124.
- Barraquio W.L., Revilla L., Ladha J.K. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194: 15–24.
- Belas R., Mileham A., Cohn D., Hilmen M., Simon M., Silverman M. 1982. Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. *Science* 218: 791–793.
- Bellone C.H., Carrizo de Bellone S., Jaime M.A., Manlla A.M. y Monzón de Ascorregui M.A. 1999. Respuesta de los cultivares de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con distintos aislamientos de *Azospirillum* spp. II Reunión Científico Técnica – Biología del Suelo – Fijación biológica del nitrógeno. Universidad Nacional de Catamarca – Facultad de Ciencias Agrarias 283-286p
- Bergersen F. 1980. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Willey and Sons, Chichester
- Bhattacharjee R.B., Singh A., Mukhopadhyay S.N. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:199–209
- Bijay-Singh, Yadvinder-Singh y Sekhon, G.S. 1995. Fertilizer-N use efficiency and nitrate pollution of groundwater in developing countries. *J. Contaminant Hydrology* 20: 167–184.
- Biswas J.C., Ladha J.K., Dazzo F.B. 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Science Society of America Journal* 64: 1644–1650.
- Biswas J.C., Ladha J.K., Dazzo F.B., Yanni Y.G., Rolfe B.G. 2000b. Rhizobial inoculation influences seedling vigour and yield of rice. *Agronomy Journal* 92: 880–886

- Blot M., Hauer B., Monnet G. 1994. Tn5 bleomycin resistance gene confers improved survival growth advantage in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 242: 595–601
- Boddey R.M., Urquiaga S., Reis V., Döbereiner J. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil 137: 111–117.
- Boddey R.M., Chalk P.M., Victoria R.L., Matsui E., Döbereiner J. 1983. The use of ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated nitrogen fixation nutrition of *Paspalum notatum* cv. Batatais. Can. J. Microbiol. 29:1036–1045
- Boddey R.M. 1995. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. Crit. Rev. Plant Sci. 14:263–279
- Boddey R.M., Polidoro J.C., Resende A.S., Alves B.J.R., Urquiaga S. 2001. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. Aust. J. Plant Physiol. 28:889–895
- Boddey R.M., Urquiaga S., Alves B.J.R., Reis V. 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. Plant Soil 252: 139-149.
- Boddey R.M., Peoples M.B., Palmer B., Dart P.J. 2000. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. Nutrient Cycling in Agroecosystems 57: 235–270.
- Caballero-Mellado J., Martinez-Aguilar L., Paredes.Valdez G., Estrada De Los Santos P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., and N₂ fixing rizospheric and endophytic species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1165-1172.
- Cavalcante V. y Döbereiner J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. Plant Soil 108: 23-31.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802–805.

- Chelius M.K., Triplett E.W. 2000a. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. Appl. Environ. Microbiol. 66: 783-787.
- Chelius M.K., Triplett E.W. 2000b. Diazotrophic endophyte associated with maize. En: Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett EW (Ed) Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp 779-792
- Choudhury A.T., Khanif Y.M. 2001. Evaluation of the effects of nitrogen and magnesium fertilization on rice yield and fertilizer nitrogen efficiency using ¹⁵N tracer technique. J. Plant Nutrition 24: 855–871.
- Chowdhury S.P., Schmid M.I, Hartmann A., Tripathi A.K. 2007. Identification of Diazotrophs in the Culturable Bacterial Community Associated with Roots of *Lasiurus indicus*, a Perennial Grass of Thar Desert, India. Microbial Ecol. 54: 82–90
- Chritansen-Weniger C., Vanderleyden J. 1994. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellular established in maize (*Zea mays*) para-nodules. Biol. Fert. Soils 17:1-8.
- Dalton D.A., Kramer S., Azios N., Fusaro S., Cahill E., Kennedy C. 2004. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. FEMS Microbiol Ecol. 49:469–479
- Danso, S.K.A. 1995. Assessment of biological nitrogen fixation. Fertilizer Research 42:33-41.
- Dawe D. 2000. The potential role of biological nitrogen fixation in meeting future demand for rice and fertilizer. En: The quest for nitrogen fixation in rice J. K. Ladha and P. M. Reddy (Eds.) Makati City, The Philippines: International Rice Research Institute. pp. 1-9
- Dawson T.E., Brooks P.D. 2001. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. En: Stable Isotope Techniques in the Study of Biological

- Processes and Functioning of Ecosystems. Unkovich M., Pate J., McNeill A., Gibbs D.J. (Eds.). Kluwer. Dordrecht. Holanda p.1-18.
- Deaker R., Kennedy I.R. 2001. Improved potential for nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7-S associated with wheat nifH expression as a function of oxygen ressure. *Acta Biotechnologica* 21: 3–17.
- De Carvalho A.L.V., Alves B.J.R., Baldani V.L.D., Reis V.M. 2008. Application of ¹⁵N natural abundance technique for evaluating biological nitrogen fixation in oil palm ecotypes at nursery stage in pot experiments and at mature plantation sites. *Plant Soil* 302: 71-78
- De Datta S.K., Buresh R.J. 1989. Integrated nitrogen management in irrigated rice; *Advances in Soil Science* 10: 143–169.
- De Lorenzo V. 1994. Designing microbial systems for gene expression in the field. *Trends Biotechnol.* 12: 365–371.
- Demba Diallo M., Willems A., Vloemans N., Cousin S., Vandekerckhove T.T., de Lajudie P., Neyra M., Vyverman W., Gillis M., Van der Gucht K. 2004. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ. Microbiol.* 6: 400–415.
- Denarie' J., Blanchere H. 1966. Inoculation de graines de vegetaux cultives a` l'aide de souches bacteriennes. *Annales de l' Institut Pasteur Suppl.* 3: 57–74.
- DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias. 2009/2010. Anuario Estadístico Agropecuario 2010. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. www.mgap.gub.uy/DieaAnterior/Anuario2010/xls/210_053.xls
- Dixon R. y Kahn D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 612-631.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener

- S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust. J. Plant Physiol. 28:871–879
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22 : 107 .149.
- Döbereiner J. 1993. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis 13:1-13.
- Döbereiner J., Day J.M., Dart P.J. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol. 71:103–116
- Döbereiner J., Pedrosa F.O. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. Science Tech, Madison and Springer Verlag, Berlin
- Dong Y., Chelius M. K., Brisse S., Kozyrovska N., Kovtunovych G., Podschun R. 2003a. Comparisons between two *Klebsiella*. The plant endophyte *K. pneumoniae* 342 and a clinical isolate, *K. pneumoniae* MGH78578. Symbiosis 35: 247-259.
- Dong Y., Iniguez A. L., Triplett E. W. 2003b. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. Plant Soil 257: 49-59.
- Dong Y., Glasner J.D., Blattner F.R., Triplett E.W. 2001. Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumonia* 342, by microarray hybridation with *Escherichia coli* K12 open reading frames. Appl. Environ. Microbiol. 67:1911- 1921.
- Elbeltagy A.K., Sato N.T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl. Environ. Microbiol. 67:5285–5293

- El-Komy H.M.A., Moharram T.M.M., Safwat M.S.A. 1998. Effect of *Azospirillum* inoculation on growth and N₂ fixation of maize subjected to different levels of FYM using 15N-dilution method. En: Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Malik, K.A., Mirza, M.S., Ladha, J.K. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 49–59.
- El-Mohandes M.A.O. 1999. The use of associative diazotrophs with different rates of nitrogen fertilization and compost to enhance growth and N₂-fixation of wheat. Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo 50: 729–753.
- Engbrecht J., Nealson K.H., Silverman M. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. Cell 32: 773–781.
- Engelhard M., Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. Environ. Microbiol. 2: 131–141.
- Errampalli D., Leung K., Cassidy M.B., Kostrzynska M., Blears M., Lee H., Trevors J.T. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. J. Appl. Microbiol. Meth. 35: 187–199.
- Estrada-de los Santos P., Bustillos-Cristales R., Caballero-Mellado J., 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2790–2798.
- FAO. 2008. Current world fertilizer trends and outlook 2011/ 2012. Food and agricultural organization of the United Nations, Rome
- Franché C., Lindström K., Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil 321:35–59
- Franke I., Fegan M., Hayward A. 1998. Nucleotide sequence of the *nifH* gene coding for nitrogen reductase in the acetic acid bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Lett. Appl. Microbiol. 26: 12–16

- Frioni, L. 1999. Procesos microbianos en los ciclos biogeoquímicos. En: Procesos microbianos. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (Ed). Tomo I; pp. 149-162.
- Frioni L. 2006. Ciclo biológico del nitrógeno. En: Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Ed); pp. 169-190.
- Fuentes-Ramírez L.E., Jiménez-Salgado T., Abarca-Ocampo I.R., Caballero-Mellado J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant Soil 154:145-150.
- Fulchieri M., Frioni L. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biol. Biochem. 26: 921-923
- Fürnkranz M., Wanek W., Richter A., Abell G., Rasche F., Sessitsch A. 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. The ISME Journal 2: 561–570
- Galloway J.N., Schlesinger W.H., Levy H.I., Michaels A.F., Schnoor J.L. 1995. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. Global Biogeochem Cycles 9: 235–252
- Gamalero E., Lingua G., Berta G., Lemanceau P. 2003. Methods for Studying Root Colonization by Introduced Beneficial Bacteria. Agronomie 23: 407–418.
- Garabet S., Ryan J., Wood, M. 1998. Nitrogen and water effects on wheat yield in a Mediterranean-type climate. II. Fertilizer-use efficiency with labelled nitrogen; Field Crops Research 58: 213–221.
- Garcia de Salomone I.E., Döbereiner J., Urquiaga S., Boddey R.M. 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. Biol. Fert. Soils 23:249-256

- Giller K., Merckx R. 2003. Exploring the boundaries of N₂ fixation in cereals and grasses: an hypothetical framework. *Symbiosis* 35: 3–17.
- Gillis M., Tran Van V., Bardin R., Goor M., Hebbar P., Willems A., Segers P., Kersters K., Heulin T., Fernandez M.P., 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 274–289.
- Glandorf D.C.M., Brand I., Bakker P.A.H.M. 1992. Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in field. *Plant Soil* 147: 135–142.
- Govindarajan M., Balandreau J., Kwon S-W., Weon H.Y., Cunthipuram L. 2007. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. *Microbial Ecol.* 55:21-37.
- Gutierrez-Zamora M.L., Martínez-Romero E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and Maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* 91:117-126.
- Halvorson A.D., Follett R.F., Bartolo M.E., Schweissing F.C. 2002. Nitrogen fertilizer use efficiency of furrow-irrigated onion and corn. *Agronomy Journal* 94: 442–449.
- Hamelin J., Fromin N., Tarnawski S., Teyssier-Cuvelles S., Aragno M. 2002. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. *Environ. Microbiol.* 4:477–481.
- Hardy R.W., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. 1968. The C₂H₂-C₂H₄ assay for N₂ fixation : Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- Henson B.J., Watson L.E., Barnum S.R. 2004. The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *nifD*. *J. Mol. Evol.* 58:390–399
- Högberg P. 1997. ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. *Tansley review no 95. New Phytol.* 137: 179–203.

- Hong S.H., Bunge J., Jeon S.O., Epstein S.S. 2006. Predicting microbial species richness. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:117–122
- Honty G. y Gudynas E. 2007. Agrocombustibles y desarrollo sostenible en América Latina y el Caribe. Observatorio del Desarrollo. <http://www.agrocombustibles.org/conceptos/AgroCombustiblesClaesOdelD07.pdf>
- Hu Y., Fay A.W., Lee C.C., Ribbe M.W. 2007. P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10424–10429.
- Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.*
- Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2005. Molecular Ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria. En: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. Werner D. and Newton W.E. (Eds.). Springer, Netherlands, pp 173-198
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., Van Montagu M., Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176: 1913–1923.
- Hurek T., Handley L. L., Reinhold-Hurek B., and Piche Y. 2002. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 233- 242.
- Jackson R.M., Brown M.E., Burlingham S.K. 1964. Similar effects on tomato plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibberellins. *Nature* 203: 851–852.
- James E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65:197-209
- James E.K., Gyaneshwar P., Barraquio W.L., Mathan N., Ladha J.K., 2000. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: Ladha, J.K., Reddy, P.M. (Eds.), *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, pp. 119–140.

- James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N. *et al.* 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 894–906.
- James E.K., Olivares F.L. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs; *Crit. Rev. Plant. Sci.* 17: 77-119.
- James E.K., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani J.I., Döbereiner J., 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Botany* 45: 757–766.
- Jansson J.K. 1998. Reporter genes for monitoring microbial cell activity and/or the environment. An opinion, MAREP (Marker/Reporter genes in microbial ecology): A concerted action: European Commission Biotechnology Programme, DGXII, Borås, Sweden.
- Jha B., Thakur M., Gontia I., Albrecht V., Stoffels M., Schmid M., Hartmann A. 2009. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European J. Soil Biol.* 45: 62-72
- Jiménez-Salgado T., Fuentes-Ramírez L.E., Tapia-Hernández A., Mascarua-Esparza M. A., Martínez-Romero E., Caballero-Mellado J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3676-3683.
- Karl D., Bergman B., Capone D., Carpenter E., Letelier R., Lipschultz F. 2002. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochem* 57/58: 47–98.
- Kennedy I.R., Islam N., 2001. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 41: 447–457.
- Kennedy I.R., Chouhury A.T.M.A., Kecskés M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems; can their potential for plant growth promotion be latter exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36:1229-1244

- Kennedy I.R., Tchan Y., 1992. Biological nitrogen fixation in non leguminous field crops: recent advances. *Plant Soil* 141: 93–118.
- Knauth S., Hurek T., Brar D., Reinhold-Hurek B. 2005. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* 7:1725–1733.
- Liu X., Zhao H., Chen S. 2006. Colonization of Maize and Rice Plants by Strain *Bacillus megaterium* C4. *Cur. Microbiol.* 52: 186–190
- Loganathan P., Nair S. 2003. Crop-specific endophytic colonization by a novel, salt-tolerant, N₂-fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* sp. from wild rice. *Biotech. Lett.* 25: 497–501.
- Loganathan P., Sunita R., Parida A. K., Nair S. 1999. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *J. Appl. Microbiol.* 87: 167-172.
- Lovell C.R., Piceno Y.M., Quattro J.M. 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3814– 3822.
- Lowder M., Oliver D.J. 2001. The use of modified GFP as a reporter for metabolic activity in *Pseudomonas putida*. *Microbial Ecol.* 41: 310–313.
- Ma W., Zalec K., Glick B.R. 2001. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growthpromoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26, *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 137–144.
- Mahaffee W.F., Bauske E.M., Van Vuurde J.W.L., Van der Wolf J.M., Van der Brink M., Kloepper J.W. 1997. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of rhizobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1617–1622.

- Marek-Kozaczuk M., Kopcinska J., Lotocka B., Golinowski W., Skorupska A. 2000. Infection of clover by plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* studied by mTn5-*gusA*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 1–11
- Marland G. y Turhollow A.F. 1991. CO₂ emissions from the production and combustion of fuel ethanol from corn energy. *International Journal* 16:1307-1316.
- Martinelli L. A., Victoria R. L., Trivelin P. C. O., Devol A. H., Richey J. E. 1992. ¹⁵N natural abundance in plants of the Amazon river floodplain and potential atmospheric N₂ fixation. *Oecologia* 90: 591-596
- Matsui E., Vose P.B., Rodrigues N.S., Ruschel A.P. 1981. Use of ¹⁵N-enriched gas to determine N₂ fixation by undisturbed sugar cane plant in the field. *En: Associative N₂ Fixation*. P.B. Vose, A.P. Ruschel (Eds.). CRC press, Boca Raton, Florida, USA. Vol II, pp. 153–161.
- Mehnaz S., Kowalik T., Reynolds B., Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biol. Biochem.* 42: 1848-1856
- Merrick M., Edwards R. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microb. Rev.* 59: 604-622.
- Miranda C.H.B., Urquiaga S., Boddey R.M. 1990. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Soil Biol. Biochem.* 22: 657-663.
- Mirza M.S., Rasul G., Mehnaz S., Ladha J.K., So R.B., Ali S., Malik K.A., 2000. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. *En: The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. Ladha J.K., Reddy P.M. (Eds.). International Rice Research Institute, Los Baños, pp. 191–204.
- Mirza M.S., Ahmad W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normand P., Malik K.A. 2001. Isolation, partial characterization, and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47–54

- Mishra O.R., Tomar U.S., Sharama R.A., Rajput A.M. 1995. Response of maize to chemicals and biofertilizers. *Crop Research* 9: 233–237.
- Molin S., Givskov M. 1999. Application of molecular tools for *in situ* monitoring of bacterial growth activity. *Environ. Microbiol.* 1: 383–391.
- Montañez A., Abreu C., Gill PR., Hardarson G., Sicardi M. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biol. Fertil. Soils* 45:253-263
- Mosier A. R., Bleken M. A., Chaiwanakupt P., Ellis E. C., Freney J. R., Howarth R. B., Matson P. A., Minami K., Naylor R., Weeks K. N., Zhu Z. L. 2002. Policy implications of human accelerated nitrogen cycling. *Biogeochemistry*: 57/58: 477–516.
- Muñoz-Rojas J. y Caballero-Mellado J. 2001. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. En *Microbios en línea*. Martínez Romero, E., Martínez Romero, J. (Eds). México, pp. 157-176. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap9/>
- Muthukumarasamy R., Revathi G., Lakshminarasimhan C. 1999. Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. *Trop Agric* 76:171–178
- Newton W.E. 2007. Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. En: *Biology of the nitrogen cycle*. Bothe H., Ferguson S.J, Newton W.E. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp 109–130.
- Njoloma J., Tanaka K., Shimizu T., Nishiguchi T., Zakria M., Akashi R., Akao S. 2006. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. *Biol. Fertil. Soils* 43: 137–143.
- Normander B., Hendriksen N.B., Nybroe O. 1999. Green fluorescent protein marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4646–4651.

- Ohkuma M, Noda S, Usami R, et al. 1996. Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol 62: 2747–2752
- Oliveira A.L.M., Urquiaga S., Döbereiner J., Baldani J.I. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. Plant Soil 242:205–215
- Palus JA., Borenman J., Ludden PW., Triplett EW. 1996. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea miltarians* Itlis and Dochley. Plant Soil 186:135-142
- Pandey A., Kumar S., 1989. Potential of *Azotobacters* and *Azospirilla* as biofertilizers for upland agriculture: a review. Journal of Scientific and Industrial Research 48: 134–144.
- Pandey A., Sharma E., Palni L., 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the sikkim Himalaya. Soil Biol. Biochem. 3: 379–384.
- Pariona-Llanos R., Ibañez de Santi Ferrara F., Soto Gonzales H.H., Ramos Barbosa H. 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European J. Soil Biol. 46 :387-393
- Paula M. A., Reis V. M., Döbereiner J. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batatas*), sugar cane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). Biol. Fert. Soils 11: 111-115.
- Perin I., Martinez-Aguilar L., Castro-Gonzalez R., Estrada De Los Santos P., Cabellos-Avelar T., Guedes H.V., Reis V.M., Caballero-Mellado J. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field grown maize and sugarcane. Appl. Environ. Microbiol. 72:3103-3110
- Peters J.W., Fisher K., Dean D.R. 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. Annu. Rev. Microbiol. 49: 335-366.

- Piceno Y.M., Noble P. A., Lovell C. R. 1999. Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microb. Ecol.* 38: 157-167.
- Postgate J. 1981. Microbiology of the free-living nitrogenfixing bacteria, excluding cyanobacteria. En: Current perspectives in nitrogen fixation. Gibson A.H., Newton W.E. (Eds) Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam, pp 217–228
- Prosser J.I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiol.* 140: 5–17.
- Quispel, A. 1992. A search for signals in endophytic microorganisms. En: Molecular signals in plant-microbe communications. CRC press. Verma, D. P. S. (Ed.), Boca Raton. p 471-491
- Radwan F.I. 1998. Response of some maize cultivars to VA-mycorrhizal inoculation, biofertilization and soil nitrogen application. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 43: 43–56
- Rattray E.A.S., Prosser J.I., Glover L.A., Killham K. 1995. Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2950–2957.
- Reinhold B., Hurek T., Niemann E.G., Fendrik I. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520–526.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol* 6:139–144
- Reinhold-Hurek B., Hurek T., Gillis M., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters K., De Ley J., 1993. *Azoarcus* gen Nov., a nitrogen fixing Proteobacteria associated with the roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*) (L. Kunth.), and description of two species *Azoarcus indigenus* sp.nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 574–588.

- Reis V.M., Baldani J.I., Baldani V.L.D., Döbereiner J., 2000. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 227–247.
- Riggs P.J., Chelius M.K., Iniguez A.L., Kaeppler S.M., Triplett E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:829–836
- Riggs P. J., Moritz R. L., Chelius M. K., Dong Y., Iniguez A. L., Kaeppler S. M. 2002. Isolation and characterization of diazotrophic endophytes from grasses and their effects on plant growth. En: *Nitrogen Fixation: Global Perspectives, Proceedings of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation*. T. R. Finan, M. R. O'Brian, D. B. Layzell, J. K. Vessey, W. E. Newton (Eds.), Wallingford, UK: CABI Publishing pp. 263-267.
- Rijavec T., Lapanje A., Dermastia M., Rupnik M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can. J. Microbiol.* 53: 802-808
- Rodrigues E.P., Rodrigues L.S., Martinez de Oliveira A.L., Baldani V.L.D., dos Santos Teixeira K.R., Urquiaga S., Reis V.M. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effect on growth yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* doi:10.1007/s11104-00079476-1
- Roesch L.F.W., Camargo F.A.O., Bento F.M., Triplett E.W. 2008. Biodiversity of diazotrophs within the soil, root and stem of field grown maize. *Plant Soil* 302:91–104
- Roger W.P., Jon R.S., Morgan J.A., Winstanley C., Saunders V.A. 2004. *XyE* as a marker gene for microorganisms. En: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D., Van Elsas J.D. (Eds.), Springer.
- Roncato-Maccari, L. D. B., Ramos, H. J. O., Pedrosa, F. O., Alquini, Y., Chubatsu, L. S., Yates, M. G. 2003a. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. *Symbiosis* 35: 261-270.

- Roncato-Maccari, L. D. B., Ramos, H. J. O., Pedrosa, F. O., Alquini, Y., Chubatsu, L. S., Yates, M. G. 2003b. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in graminaceous plants. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 39-47.
- Roper M.M., Ladha J.K., 1995. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. Plant Soil 174: 211–224
- Rosconi F., Souza E., Pedrosa F., Platero R., González C., González M., Batista S., Gill P. y Fabiano E. 2006. Iron depletion affects nitrogenase activity and expresión of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae* FEMS Microbiol. Lett. 258: 214-219.
- Rothballer M., Eckert B., Schmid M., Fekete A., Schloter M., Lehner A., Pollmann S., Hartmann A. 2008. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. FEMS Microbiol. Ecol. 66: 85–95.
- Rothballer M., Schmid M., Hartmann A. 2009. Diazotrophic Bacterial Endophytes in *Gramineae* and Other Plants. Microbiol. Monogr. 8: 273–302.
- Rouws L.F.M., C.H.S.G. Meneses, H.V. Guedes, M.S. Vidal, J.I. Baldani, S. Schwab 2010. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. Lett. Appl. Microbiol. 51: 325–330.
- Rovira A.D. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. Ann. Revi. Microbiol. 19: 241–266.
- Rovira A.D. 1991. Rhizosphere research, 85 years of progress and frustration. En: The rhizosphere and plant growth. Keister D.L., Cregan P.B. (Eds). Kluwer Academic, The Netherlands, pp 3–13.
- Rubio L.M., Ludden P.W. 2005. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. J Bacteriol 187:405–414.
- Rubio L.M., Ludden P.W. 2008. Biosynthesis of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase. Annu. Rev. Microbiol 62:93–111.

- Ruschel A.P., Henis Y., Salati E. 1975. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. *Soil. Biol. Biochem.* 7: 181–182.
- Schank S.C., Smith R.L., Weiser G.C., Zuberer D.A., Bouton J.H., Quesenberry K.H., Tyler M.E., Milam J.R., Littel R.C. 1979. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. *Soil Biol. Biochem.* 11:287–295
- Schmid M, Hartmann A. 2007. Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic α and β Proteobacteria. En: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Elmerich C., Newton W.E. (Eds). Springer, Dordrecht, pp 41–71
- Schulz B., Boyle C. 2006. What are endophytes? En: Microbial Root Endophytes. Schulz B, Boyle C, Sieber T.N. (Eds). Springer, Berlin, Heidelberg. *Soil Biology* 9: 1–13
- Seldin L., Rosado A.S., Cruz D.W., Nobrega A., Elsas J.D., Paiva E. 1998. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3860–3868.
- Sevilla, M., Burris R. H., Gunapala N., Kennedy C. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*⁻ mutant strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:359–366.
- Sevilla M., Kennedy C. 2000. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: Triplett EW (Ed) Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Horizon Scientific, Norwich, UK, pp 737–760
- Shrestha R.K. y Ladha J.K. 1998. Nitrate in groundwater and integration of nitrogen-catch crop in rice-sweet pepper cropping system. *Soil Science Society of America Journal* 62: 1610–1619.

- Singh M. K., Singh D. P., Mesapogu S., Babu B.K., Bontemps C. 2011. Concomitant colonization of *nifH* positive endophytic *Burkholderia* sp. in rice (*Oryza sativa* L.) promotes plant growth. World J. Microbiol. Biotechnol. DOI 10.1007/s11274-011-0664-z
- Sumner M.E., 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. Advances in Soil Science 12: 53–123.
- Tan Z., Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. Environ. Microbiol. 2: 1009-1015.
- Tapia-Hernández A., Mascarúa-Esperza M.A., Caballero-Mellado J. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. Microbios 64:73–83
- Tapia-Hernández A., Bustillos-Cristales M.R., Jiménez-Salgado T., Caballero-Mellado J., Fuentes-Ramírez L. E. 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microbial Ecol. 39: 49-55.
- Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group with description a new genus, Azospirillum gen nov and two species, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb nov and Azospirillum brasilense sp nov. Can. J. Microbiol. 24:967–980
- Triplett E.W. 2007. Prospects for significant nitrogen fixation in grasses from bacterial endophytes. En: Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations, C. Elmerich and W. E. Newton (eds.) Springer pp 303–314.
- Turnbull G.A., Morgan J.A.W., Whipps J.M., Saunders J.R. 2001. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonization of wheat roots. FEMS Microbiol. Ecol. 36: 21–31.

- Ueda T., Suga Y., Yahiro N. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. J. Bacteriol. 177: 1414–1417.
- Unkovich M. , Baldock, J. 2008. Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian agriculture. Soil Biol. Biochem. 40: 2915-2921
- Van Berkum P., Bohlool B. B.. 1980. Evaluation of Nitrogen Fixation by Bacteria in Association with Roots of Tropical Grasses. Microbiol. Rev. 44:491-517
- Vandamme P., Goris J., Chen W.-M., Vos de P., Willems A. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. 25: 507–512.
- Van Elsas J.D., Dijkstra J.M., Govaert J.M., Van Veen J.A. 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into soil of different texture in field microplots. FEMS Microbiol. Ecol. 38: 151–160.
- Van Veen J. A., Merckx R., Van de Geijn S. C. 1989. Plant and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. Plant Soil 115: 179–188.
- Vargas C., De Padua V. L. M., Nogueira E. D., Vinagre F., Masuda H. P., Da Silva F. R. 2003. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: A genomic approach. Symbiosis 35: 159-180.
- Vaz D., Olivera L., Cozzolino D. 2006. Ensilaje de maíz como componente de la dieta en la fase de terminación de novillos. Revista INIA 7: 5-8
- Verma S.C., Singh A., Chowdhury S. P., Tripathi A.K. 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. Biotech Lett. 26: 425–429.
- Ward D. M., Weller R., Bateson M. M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345: 63-65.

- Werner D., Batinic T., Feder I.S., Kosch K., Redecker D., Schulz U., Streit W., Fleischman P.V. 1996. Competitiveness of symbiotic and antagonistic soil bacteria development of reporter gene fusions and specific gene probes. Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Washington, DC. pp. 44–48.
- Widmer F., Shaffer B. T., Porteous L. A., Seidler R. J. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. Appl. Environ. Microbiol. 65: 374–380.
- Wood M., McNeill A.M., 1993. $^{15}\text{N}_2$ measurement of nitrogen fixation by legumes and actinorhizals: theory and practice. En: Plant Nutrition – from Genetic Engineering to Field Practice. Barrow N.J. (Ed.) Kluwer Academic Publishers. pp. 435–438
- Yanni Y.G., Rizk R.Y., Corich V., Squartini A., Ninke K., Philip- Hollingsworth S., Orgambide G., de Bruinj F., Stoltzfus J., Buckley D., Schmidt T.M., Mateos P.F., Ladha J.K., Dazzo F.B. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. Plant Soil 194:99–114.
- Yeager C.M., Kornosky J.L., Housman D.C., Grote E.E., Belnap J., Kuske C.R. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. Appl Environ. Microbiol. 70: 973–983.
- Yoneyama T., Muraoka T., Kim T.H., Dacanay E.V., Nakanishi Y. 1997. The natural ^{15}N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). Plant Soil 189: 239–244.
- You M., Nishiguchi T., Saito A., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. 2005. Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum* endophyte in wild rice species: daily rhythm during the light-dark cycle. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8183-8190.

- Young P. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: Biological nitrogen fixation. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J (Eds). Chapman and Hall Inc, New York. pp 43–86
- Zahir Z.A., Abbas S.A., Khalid M., Arshad M. 2000. Substrate dependent microbially derived plant hormones for improving growth of maize seedlings. Pakistan Journal of Biological Sciences 3: 289 .291.
- Zehr J.P., McReynolds L.A. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium* spp. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2522–2526.
- Zehr J.P., Mellon M.T, Zani S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of Nitrogenase (*nifH*) genes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3444–3450
- Zhang L., Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2007. A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms. Microbiol. Ecol. 53:456–470
- Zheng L., Cash D.L., Flint D.H., Dean D.R. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBAfdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. J Biol Chem 273:13264–1327272

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la asociación entre bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas y las plantas de maíz y evaluar el efecto de factores bióticos y abióticos como el genotipo vegetal y la fertilización nitrogenada sobre esta interacción.

Objetivos específicos

Determinar el efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre la densidad y diversidad de la comunidad de diazotrofos asociados a maíz.

Aislar e identificar bacterias diazotrofas de suelo rizosférico y de raíces y tallos de plantas de dos variedades de maíz, con y sin fertilización nitrogenada.

Evaluar las características promotoras del crecimiento vegetal de los aislamientos obtenidos.

Determinar el efecto de la inoculación con bacterias diazotrofas seleccionadas en el crecimiento de plantas de maíz de distintas variedades en condiciones controladas y determinar los cambios provocados por la inoculación en el número y estructura de la comunidad de diazotrofos rizosféricos y endófitos.

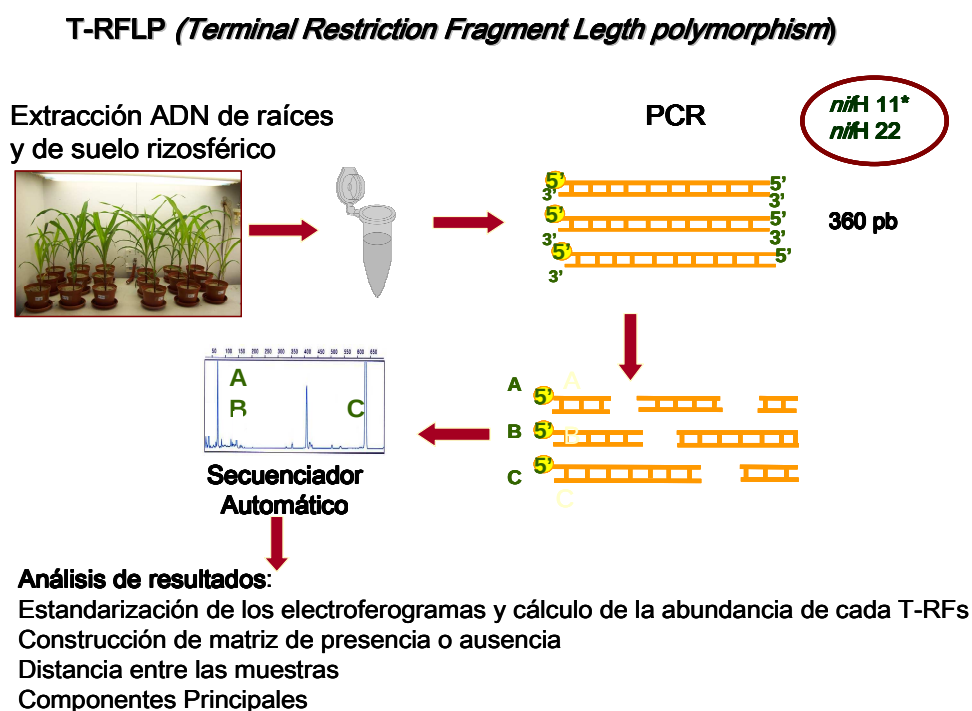
Estudiar la capacidad de penetración al hospedero, la dinámica de la colonización y la localización de las bacterias en las raíces de las plantas de maíz en condiciones controladas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo se dividió en 3 etapas que se describen a continuación. Cada una de estas etapas se desarrollan como capítulos de la presente Tesis.

1ª Etapa: Efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre la densidad y diversidad de diazotrofos asociados a maíz

Para determinar el efecto del genotipo de maíz y de la fertilización nitrogenada sobre las comunidades de bacterias fijadoras de N₂ presentes en suelo rizosférico y en raíces y tallos, se realizó un ensayo en condiciones controladas (cámara de cultivo) con plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas en suelo:arena no estéril (1/1) con 0, 40, 80 Kg N.ha⁻¹ como sulfato de amonio, durante 45 días. Se analizó el efecto de ambos factores sobre el número de diazotrofos cultivables por determinación del número más probable (NMP) y sobre la diversidad de la comunidad bacteriana mediante el método independiente del cultivo *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) amplificando el gen *nifH*. La figura presenta el esquema de la técnica aplicada.



El método de T-RFLP está basado en la amplificación por PCR de una región del genoma, utilizando uno de los iniciadores marcado con un fluoróforo en el extremo terminal 5'. Los productos de la reacción son digeridos con una enzima de restricción y los fragmentos resultantes son separados en un secuenciador automático que detecta el largo de los fragmentos terminales marcados. El método proporciona distintos perfiles dependiendo de la composición de la comunidad de la muestra. Los electroferogramas obtenidos permiten describir la diversidad microbiana en términos de: i) riqueza de biotipos, dados por el número de fragmentos terminales de diferente tamaño y ii) abundancia de cada biotipo, expresada por la fluorescencia relativa de cada fragmento.

2ª etapa: Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas de plantas de maíz de ambas variedades crecidas con y sin fertilización nitrogenada.

Para el aislamiento de diazotrofos rizosféricos se utilizaron diluciones de suelo y para endófitos raíces y tallos desinfectados superficialmente. Se emplearon 3 medios semisólidos sin N combinado. De los aislamientos obtenidos se seleccionaron aquellos capaces de crecer luego de repetidos repiques en medio sin N combinado y que dieron positiva la amplificación de gen *nifH*. Para agrupar los aislamientos según su perfil genético se empleó la técnica de *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA). Para identificar los aislamientos a nivel de género/especie se realizó la secuenciación parcial del gen 16S rRNA de cepas representantes de cada grupo. Con la finalidad de determinar la diversidad intra especie se utilizó la técnica de rep-PCR empleando la secuencia iniciadora (GTG)₅. Además de la fijación biológica de N₂, los aislamientos se evaluaron por otras características promotoras del crecimiento vegetal como la capacidad de producir ácido indol acético (AIA) *in vitro*, solubilizar fosfato tricálcico en medio de cultivo sólido y de inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* en cultivos duales.

3ª Etapa: Evaluación de la capacidad de cepas seleccionadas de promover el crecimiento de dos variedades de maíz y de colonizar las raíces.

En base a los resultados obtenidos en la segunda etapa del trabajo, se seleccionaron 8 cepas como potenciales bacterias promotoras del crecimiento vegetal y se estudió su capacidad para promover el crecimiento de las dos variedades de maíz en estudio (NK940 y PAU871). Con tal propósito se realizaron dos ensayos: uno con plantas desarrolladas en condiciones gnotobióticas (ensayo en tubos) durante 15 días, en el que se evaluó el efecto de la inoculación sobre el largo de la radícula, producción de biomasa aérea y radical; y otro con plantas crecidas en macetas con suelo:arena (1/1) no estéril, durante 30 días. En este último ensayo además de determinar la biomasa aérea seca de las plantas, se determinó el efecto de la inoculación sobre el número y la estructura de la comunidad de diazotrofos rizosféricos y endófitos.

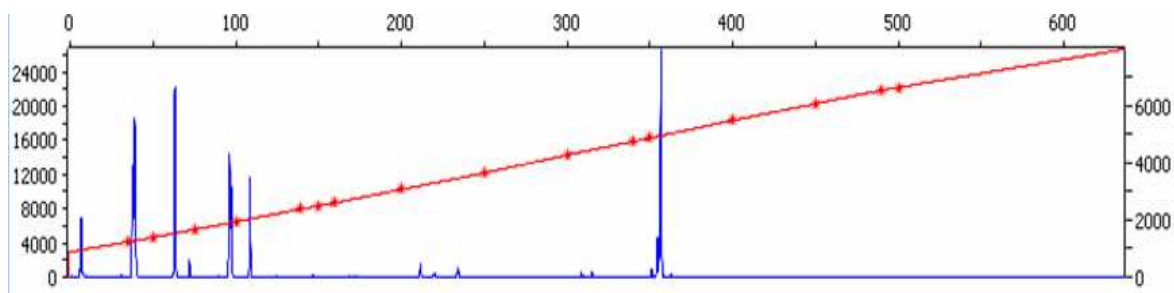
Como se ha propuesto que la capacidad de hidrolizar los polímeros que componen las paredes celulares puede estar relacionada con la capacidad infectiva y la colonización de los tejidos vegetales, se determinó la capacidad de los aislamientos de hidrolizar carboximetil-celulosa y pectina en ensayos en medio de cultivo sólido.

Para evaluar la capacidad de colonizar las raíces se marcaron dos cepas con el gen *gusA* y se inocularon plantas de maíz que crecieron en condiciones gnotobióticas durante 15 días. Para determinar el número de bacterias en las raíces de las plantas inoculadas a distintos tiempos se realizaron recuentos de viables en placa y la localización de las bacterias en la planta se determinó mediante observaciones microscópicas de las raíces de las plantas inoculadas.



CAPÍTULO I

Efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre la densidad y diversidad de diazotrofos asociados a maíz



I.1. INTRODUCCIÓN

El estudio y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por su sigla en inglés) en asociación con plantas de interés comercial ha despertado el interés de los investigadores durante las últimas décadas, por la posibilidad de aumentar su rendimiento bajo condiciones nutricionales limitantes. La atención se ha centrado en cultivos como el maíz, arroz, trigo, sorgo y otras gramíneas, fuentes de alimento para los humanos y animales. Las bacterias PGPB pueden encontrarse libres en la rizósfera de las plantas (Kloepper *et al.*, 1989) o invadir los tejidos (endófitas) (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006; Sturz y Nowak, 2000) y promover el crecimiento vegetal por el aporte de N proveniente de la fijación biológica de N₂ (FBN) o mediante otros mecanismos (Kloepper *et al.*, 2003).

La colonización de la planta por las bacterias es afectada por varios factores tanto bióticos como abióticos, y el conocimiento del efecto de estos factores sobre la comunidad de bacterias diazotrofas resulta fundamental para comprender los mecanismos que influyen en la asociación. En términos de potencial agronómico, esta información puede contribuir a mejorar la interacción planta-microorganismo y a desarrollar con éxito prácticas de inoculación a partir de diazotrofos especialmente seleccionados.

Dentro de los factores bióticos se ha demostrado la influencia del genotipo de la planta sobre la FBN. Los primeros estudios de FBN en plantas no leguminosas, liderados por Döbereiner *et al.*, (1972) confirmaron en una gramínea forrajera, *Paspalum notatum*, la existencia de actividad nitrogenasa en el cultivar batatais, mientras que el cv. pensacola presentó una actividad casi nula. La FBN en el cv. batatais fue confirmada y cuantificada por Boddey *et al.*, (1983). Miranda *et al.*, (1990) estudiaron la FBN en diferentes genotipos de *Panicum maximum* y demostraron que el porcentaje de N derivado de la atmósfera varió entre 16 y 39% del N total incorporado, con diferencias significativas entre los distintos genotipos. Más recientemente, Reis *et al.*, (2001) encontraron diferencias significativas en la

FBN asociada a diferentes genotipos de gramíneas como *Pennisetum purpureum* y *Brachiaria spp.* y Roesch *et al.*, (2005) identificaron genotipos de maíz más eficientes en la asimilación de N y en la asociación con bacterias diazotrofas. En el trabajo de Montañez *et al.*, (2009), realizado en Uruguay, los niveles de FBN en 10 variedades de maíz difirieron entre los distintos genotipos, en los que el N derivado de la atmósfera varió entre 12 y 33% del N total acumulado por la planta.

Entre los factores abióticos, el uso de fertilizante nitrogenado puede afectar la FBN y las asociaciones planta-microorganismos (Siqueira y Franco, 1988). Varios estudios han demostrado que la FBN se reduce cuando la planta crece con cantidades suficientes o elevadas de N en el suelo. En caña de azúcar, Vose *et al.* (1981) demostraron que niveles elevados de N mineral causan un descenso significativo en las medidas de reducción de acetileno (ARA) y que probablemente ese efecto es consecuencia de la inhibición de la expresión y/o actividad de la enzima nitrogenasa (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; Martin y Reinhold-Hurek, 2002). Montañez *et al.*, (2009) también observaron que en algunas de las variedades de maíz el porcentaje de N derivado de la atmósfera disminuyó cuando la planta se desarrolló con el equivalente a 50 Kg de N/ha. Otros estudios señalan que altas dosis de nitrógeno aplicadas a los cultivos afectan a las poblaciones endófitas fijadoras de N₂. Kirchhof *et al.*, (1997) observaron en varias gramíneas que el número de diazotrofos detectados en plantas sin fertilizar era superior al detectado en plantas fertilizadas; Fuentes-Ramírez *et al.*, (1993) y Muthukumarasamy *et al.*, (1999) señalaron que obtuvieron aislamientos de *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de caña de azúcar crecidas sin fertilizante nitrogenado o con bajas dosis, mientras que no lograron aislar este microorganismo de plantas de caña de azúcar crecidas con dosis elevadas de fertilizante nitrogenado.

La mayoría de los estudios sobre bacterias fijadoras de N₂ se han centrado en caracterizar la población cultivable. Muchos de estos microorganismos no son fácilmente cultivables por técnicas convencionales y se ha demostrado mediante la aplicación de técnicas independientes del cultivo que la diversidad existente en muestras ambientales es mayor

que la detectable mediante técnicas convencionales (Chelius y Triplett, 2001; Ueda *et al.*, 1995). Dentro de las técnicas independientes del cultivo, el método de *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms* (T-RFLP) (Liu *et al.*, 1997), fue desarrollado para el análisis de comunidades bacterianas de muestras ambientales y empleando como indicador el gen *nifH*, permite el estudio de comunidades fijadoras de N₂ (Fürnkranz *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2003; Yeager *et al.*, 2004). La técnica de T-RFLP permite detectar dentro de una muestra ambiental el número y abundancia de biotipos pero no su identidad como especie. La riqueza, una medida de la diversidad microbiana, puede ser determinada mediante la técnica de T-RFLP (Fuhrman *et al.*, 2002), y es equivalente al número total de fragmentos de restricción (T-RFs) (Hewson y Fuhrman 2007).

Los buenos rendimientos de algunas variedades de maíz con aplicaciones de bajas dosis de fertilizante nitrogenado, podrían explicarse por la contribución de microorganismos diazotrofos que habitan los tejidos de las plantas de maíz. A pesar de que se han realizado múltiples intentos para introducir bacterias diazotrofas dentro de algunas gramíneas, establecer una nueva comunidad bacteriana es un trabajo complejo considerando las múltiples interacciones que existen entre la planta y los microorganismos asociados a ella. El objetivo de este capítulo fue determinar el efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada sobre la densidad y diversidad de la comunidad de diazotrofos asociados a maíz.

I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1 Material biológico y condiciones de crecimiento de las plantas

Se emplearon dos variedades de maíz (*Zea mays* L.), NK940 y PAU871, seleccionadas por el nivel de FBN asociada y su respuesta a la fertilización nitrogenada (Montañez *et al.*, 2009). Las semillas de maíz de cada variedad se desinfectaron superficialmente con alcohol 70% (3 min) e hipoclorito de sodio 4% (5 min) y se sembraron en macetas con 2 Kg de una mezcla suelo:arena (1:1) no estéril, con las siguientes características: pH 7, 1.2 % C orgánico, 0.15 % N, 50 ppm P, 0.28 meq/100g K. En cada maceta se sembraron 3 semillas que fueron raleadas a una plántula por maceta 4 días después de la germinación. Los tratamientos fueron los siguientes: sin nitrógeno (N0), con el agregado del equivalente a 40 kg N/ha (en forma de NH_4NO_3) al momento de la siembra (N40), y con el equivalente a 80 kg N/ha (N80), aplicado en dos dosis, la mitad en la siembra y la otra mitad a los 15 días. El diseño experimental fue completamente al azar con 3 repeticiones por cada tratamiento. Las plantas fueron regadas con agua destilada y mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h luz /8 h oscuridad, con una intensidad de luz de 800 μmoles de fotones $\text{m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$, y 24°C día/22°C noche, durante 45 días.

I.2.2 Obtención y acondicionamiento de muestras de suelo, raíz y tallo

A los 45 días de la siembra se colectaron muestras de suelo rizosférico, raíces y tallos, de cada planta, a los efectos de determinar: peso fresco de la parte aérea, densidad de bacterias diazotrofas mediante recuentos de viables y diversidad de la comunidad de bacterias diazotrofas.

Las plantas se desenterraron, se sacudió la raíz y el suelo que quedó adherido se consideró suelo rizosférico. Las muestras fueron tamizadas y guardadas a 4°C durante 24 h para los recuentos y a -20°C para la extracción de ADN.

Para las determinaciones de poblaciones endófitas, las raíces y tallos de cada planta se lavaron con agua destilada para remover restos de suelo y se desinfectaron superficialmente

con alcohol 70 % (3 min) e hipoclorito de sodio al 2.5 % (15 min para las muestras de tallo y 10 min para las muestras de raíz), seguido de 3 lavados con agua destilada estéril. Toda la raíz fue cortada en forma aséptica en trozos pequeños y mezclados uniformemente. Los tallos fueron cortados en trozos de 1 cm y se tomaron dos trozos de la zona apical y dos de la zona basal que fueron pelados con bisturí, picados en trozos más pequeños y mezclados. De cada planta se separó una submuestra de raíces y tallos que fueron sumergidos en nitrógeno líquido y guardados a -20°C para la extracción de ADN; el resto de las muestras fueron utilizadas inmediatamente para los recuentos de bacterias diazotrofas.

I.2.3 Densidad de bacterias diazotrofas

El recuento de microorganismos fijadores de N₂ se realizó a partir de suelo rizosférico, raíz y tallo de las plantas de las variedades NK940 y PAU871 utilizando medio de cultivo RMR semi-sólido libre de nitrógeno con tres fuentes de carbono: manitol, sacarosa y ácido málico (Rennie, 1981).

Para el recuento de diazotrofos de suelo rizosférico, se colocó 1 g de suelo en 9 mL de NaCl 0.9% estéril y se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a la 10^{-7}). Se sembraron por triplicado 100 µL de las diluciones 10^{-3} a la 10^{-7} en frascos con 5 mL de medio RMR, que se incubaron a 28°C por 7 días.

Para el recuento de diazotrofos endófitos, se tomó 1 g de raíces o tallos que fueron molidos en mortero con 9 mL de NaCl 0.9% estéril. Del material procesado se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a la 10^{-6}) y se sembraron por triplicado 100 µL en frascos con medio RMR, que se incubaron a 28°C por 7 días. Se tomaron como positivos los frascos que evidenciaron crecimiento (turbidez, película o velo) al cabo de 7 días. Se calculó el número más probable (NMP) de diazotrofos por gramo de muestra empleando las tablas de Mac Grady (Döbereiner *et al.*, 1995).

Análisis estadístico: el NMP de diazotrofos por gramo de material fresco (raíz, tallo o suelo) fue transformado a log NMP. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Infostat, 2008).

I.2.4 Diversidad de la comunidad de diazotrofos

Para el análisis de las comunidades de bacterias diazotrofas se aplicó la técnica independiente del cultivo *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) (Liu *et al.*, 1997), amplificando el gen *nifH* que codifica para una subunidad de la enzima nitrogenasa. Dado el elevado número de muestras, esta técnica fue aplicada a muestras de suelo rizosférico y raíces de las variedades NK940 y PAU871 crecidas en macetas sin fertilización nitrogenada (N 0) y con 80 Kg N/ha (N 80).

Extracción de ADN

Las raíces previamente desinfectadas se maceraron en mortero estéril con nitrógeno líquido hasta consistencia de polvo y se conservaron en tubos Eppendorf a -20° C hasta la extracción de ADN. El suelo rizosférico se tamizó en tamiz de 2 mm y se guardó a -20°C. Para la extracción del ADN se utilizó el kit Ultra Clean Soil DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories, California, USA). Se utilizaron 350 mg de raíz molida y 250 mg de suelo. A los efectos de disminuir la heterogeneidad de la extracción de DNA, de cada planta y muestra (suelo y raíces) se realizaron dos extracciones independientes que se mezclaron al momento de realizar la amplificación.

El ADN obtenido se visualizó en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 90 V durante 45 min usando *buffer* TBE 0.5 X.

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

La amplificación del gen *nifH* se realizó mediante *nested* PCR (Yeager *et al.*, 2004). La técnica de PCR- anidada (*nested* PCR) consta de dos reacciones secuenciales, utilizando como templado para la segunda reacción el producto obtenido en la primera reacción. En la primera amplificación se utilizaron los *primers* degenerados: *nifH*19 (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') (Ueda *et al.*, 1995) y *nifH*3 (5'-ATR TTR TTN GCN GCR TA-3') (Zani *et al.*, 2000). La degeneración de los *primers* está dada por estándares convencionales, donde: K: G/T; M: A/C; R: A/G; S: C/G; W: A/T; Y: C/T; V: A/C/G; N: A/C/G/T; B: C/G/T. En la segunda amplificación se utilizaron los *primers* degenerados: *nifH*11 (5'-GAYCCNAARGCNGACTC-3') y *nifH*22 (5'-ADWGCCATCATYTCCRC-3') (Yeager *et al.*, 2004).

La primera reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ L con 2 μ L de ADN y 13 μ L de *master mix* con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X de Thermo *buffer* (Fermentas, Canadá), 4 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 μ M de cada *primer*, 1 mg/mL de BSA y 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Canadá). Como control negativo se omitió el ADN y como control positivo se utilizó ADN extraído de cuatro cepas: *Herbaspirillum hiltneri*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Brevundimonas* sp. que presentaron actividad de reducción de acetileno (Montañez *et al.*, 2009). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguido por 20 ciclos de: 45 seg de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridación a 48°C y 1 min de extensión a 72°C; seguido de una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de amplificación, fragmentos de aproximadamente 450 pb, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V por media hora en solución TBE 0.5 x. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en transiluminador con luz UV.

La segunda amplificación se realizó utilizando los *primers* NifH11 y NifH22, el primero de ellos marcado con el fluoróforo FAM en el extremo 5'. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, utilizando como molde 3 μ L de una dilución 1/10 del producto de la primera PCR y 22 μ L de *master mix* con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X de Thermo *buffer* (Fermentas, Canadá), 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.8 μ M de cada *primer*, 1 mg/mL de BSA y 1,5 U de Taq polimerasa (Fermentas, Canadá). Se realizaron los mismos controles que en la primera PCR. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguido por 35 ciclos de: 45 seg a 94 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación, fragmentos de aproximadamente 360 pb, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis y visualización de los fragmentos fueron las mismas anteriormente descritas.

De cada muestra se realizaron 5 amplificaciones independientes que se mezclaron antes de la purificación. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, Chatsworth, California) en condiciones de oscuridad. El ADN

obtenido se cuantificó en gel de agarosa 1% utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 1000 pb DNA (Fermentas, Canadá).

La digestión del producto de PCR se realizó utilizando en forma independiente las endonucleasas *Hha* I y *Alu* I, que han demostrado distinguir entre secuencias *nifH* de distintos diazotrofos (Ohkuma *et al.*, 1999). La digestión se realizó en un volumen total de 15 µL, con 100 ng de ADN (volumen entre 8- 10 µL del producto de PCR purificado), *buffer* 1X (Fermentas), 5 U de enzima (Fermentas, Canadá) y agua hasta completar el volumen. La reacción se llevó a cabo durante 5 h a 37°C en baño seco, en condiciones de oscuridad y se detuvo la reacción mediante incubación a 65°C durante 30 min.

Análisis de los T-RFs obtenidos

Los fragmentos terminales marcados (T-RFs) fueron detectados por MacroGen (Seul, Corea) utilizando un secuenciador ABI3730X (Applied Biosystem). Para calcular el largo de los fragmentos marcados se utilizó como estándar interno GS500LIZ y el programa GeneScan™ (Applied Biosystems).

Los electroferogramas obtenidos fueron estandarizados eliminando aquellos fragmentos menores a 30 pb y mayores a 360 pb. Cuando la diferencia en pb entre los picos fue mayor a 2 pb se tomaron como picos diferentes. Se calculó la abundancia de cada pico (altura de cada pico / fluorescencia total de la muestra) por Excel y se eliminaron aquellos picos con abundancia menor al 1% (Dunbar *et al.*, 2000). Se construyó una matriz de presencias y ausencias de picos y una de abundancia relativa de cada pico y se calculó el índice de riqueza (S) y el índice de diversidad de Shannon (H) (Shannon y Weaver, 1949). Estos valores fueron analizados estadísticamente por ANOVA seguido por test de Tukey utilizando el programa Infostat (2008). Se realizó el análisis de agrupamiento (*cluster*) basado en similitud de Jaccard y el análisis de componentes principales (PCA), utilizando los T-RFs que aportan al menos un 1 % a la abundancia total en el perfil T-RFLP de cada muestra utilizando el programa PAST 1.42 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

I.3. RESULTADOS

I.3.1 Respuesta de las plantas de maíz a la fertilización nitrogenada

Se determinó el peso fresco de la parte aérea de cada planta con el objetivo de evidenciar el efecto de las dosis de fertilizante nitrogenado sobre el crecimiento de las plantas de ambas variedades de maíz. La fertilización nitrogenada (N40 y N80) causó un efecto positivo en el desarrollo de las variedades NK940 y PAU871 determinado a los 45 días de la siembra (Fig. 1), sin embargo se detectaron diferencias entre ambas variedades. La biomasa aérea de las plantas de la variedad PAU871 se incrementó proporcionalmente con la fertilización nitrogenada, mientras que en la variedad NK940 no se observó diferencia significativa entre la dosis de 40 Kg N/ha y la de 80 Kg N/ha (Cuadro 1).

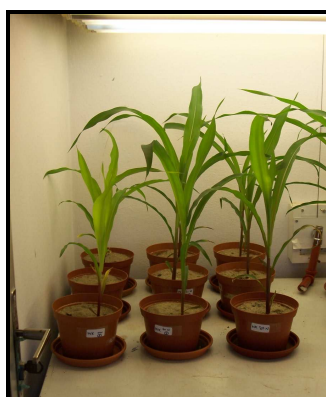


Figura 1: Plantas de maíz de la variedad NK940. Izq: plantas sin aporte de N (N0); centro: plantas con el equivalente a 40 kgN/ha (N 40); der.: plantas con el equivalente a 80 kg N/ha (N 80).

Cuadro 1: Peso fresco de la parte aérea de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas con distintas dosis de N en condiciones controladas, 45 días de la siembra

Tratamiento ^a	Peso fresco parte aérea (g.planta ⁻¹)	
	PAU871	NK940
N0	11.90 c	10.93 b
N40	28.33 b	20.03 a
N80	35.60 a	23.03 a

^a plantas de maíz crecidas sin agregado de N (N0); con el equivalente a 40 Kg N/ha (N 40); con el equivalente a 80 Kg N/ha (N80).

Los valores expresados son la media de tres repeticiones. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$)

I.3.2. Densidad de bacterias diazotrofas

Se determinaron poblaciones de bacterias fijadoras de N₂, capaces de crecer en el medio RMR semisólido sin N combinado, en plantas de las dos variedades de maíz estudiadas. Las poblaciones de bacterias diazotrofas cultivables variaron en el rango de 10³ a 10⁶ /g de muestra, siendo el valor más bajo 4x10³/g de tallo encontrado en una muestra de la variedad PAU871 N0 y el más alto 1.4 x10⁶ /g de suelo rizosférico en una muestra de la variedad NK940 N0.

La densidad de bacterias diazotrofas detectada en suelo rizosférico fue mayor que la detectada en raíces y tallos, sin diferencias significativas entre estas dos últimas (Cuadro 2). Por otro lado, las poblaciones de diazotrofos asociados a plantas de maíz de la variedad NK940 fueron estadísticamente superiores a las asociadas a la variedad PAU871 (Cuadro 2).

Cuadro 2: Densidad de bacterias diazotrofas en plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas en suelo con distintas dosis de N en condiciones controladas, 45 días de la siembra

Tratamientos ^a	Log NMP bacterias/g ^b			Medias ^c
	Rizósfera	Raíz	Tallo	
PAU871 N0	5.63	3.88	3.60	} 4.55 b
PAU871 N40	5.36	4.19	3.83	
PAU871 N80	5.33	4.98	4.17	
NK940 N0	6.31	4.60	3.72	} 5.15 a
NK940 N40	6.14	4.87	4.98	
NK940 N80	5.66	5.18	4.88	
Medias ^c	5.74 A	4.61 B	4.20 B	

^a plantas de maíz crecidas sin agregado de N (N0); con el equivalente a 40 Kg N/ha (N 40); con el equivalente a 80 Kg N/ha (N80).^b los valores expresados son la media de tres repeticiones. ^cletras diferentes indican diferencias significativas (Tukey α= 0.05). Letras mayúsculas indican diferencias entre el origen de la muestra (suelo rizosférico, raíz o tallo) y minúsculas entre variedades (PAU871 o NK940)

Cuando se analizó el número de bacterias diazotrofas según el origen de la muestra, es decir suelo, raíz o tallo, se observaron diferencias significativas entre variedades y niveles de fertilización nitrogenada en las poblaciones de raíz y tallo, mientras que no se observaron diferencias en las poblaciones de suelo rizosférico (Fig. 2 y 3). El número de bacterias fijadoras de N_2 encontradas en raíces y tallos desinfectados superficialmente se incrementó con la fertilización nitrogenada. Se evidenciaron diferencias significativas en el número de bacterias presentes entre plantas sin fertilizar (N0) y fertilizadas con la dosis más elevada (N80); sin embargo no se observaron diferencias significativas en el NMP de diazotrofos entre plantas fertilizadas con la dosis intermedia (N40) y plantas sin fertilizar o fertilizadas con N80 (Fig. 2). La densidad de diazotrofos endófitos se correlacionó de forma positiva con la dosis de N (en muestras de tallo $r^2=0.51$ y en muestras de raíz $r^2=0.56$).

Se detectaron diferencias significativas en el NMP de bacterias endófitas entre las dos variedades, la variedad NK940 presentó mayor número de diazotrofos que la variedad PAU871 (Fig. 3). No se observaron diferencias significativas en la interacción variedad x dosis de N en las muestras analizadas (raíz, tallo o suelo rizosférico) ($p= 0.6318$).

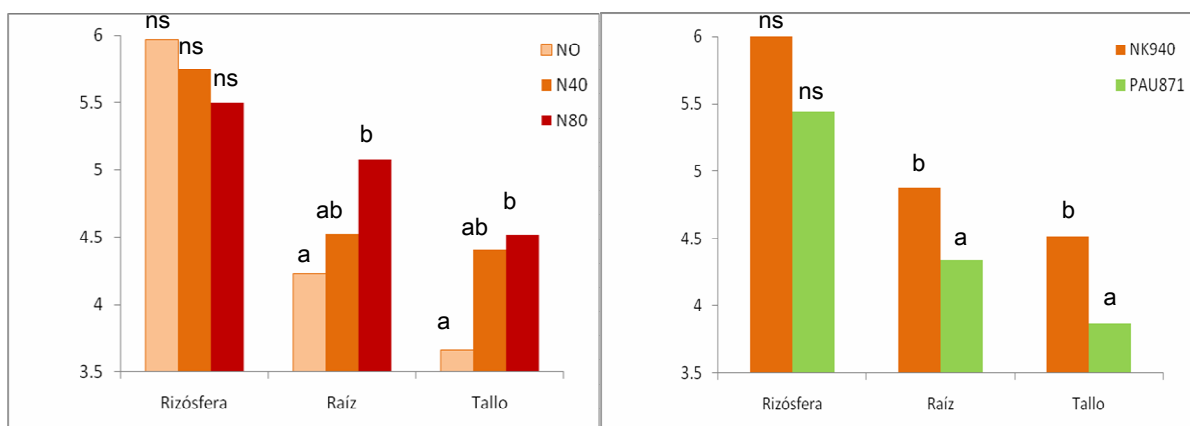


Figura 2: Densidad de bacterias diazotrofas/ g de suelo rizosférico, raíz, o tallo de plantas de maíz crecidas sin N agregado (N0); con 40 Kg N/ha (N40) y 80 Kg N/ha (N80) (n=6). Letras diferentes en cada muestra indican diferencias significativas (Tukey $\alpha= 0.05$), ns: no significativo

Figura 3: Densidad de bacterias diazotrofas/ g de suelo rizosférico, raíz, o tallo de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 (n=9). Letras diferentes en cada muestra indican diferencias significativas (Tukey $\alpha= 0.05$), ns: no significativo

I.3.3. Diversidad de la comunidad de diazotrofos

Utilizando el kit comercial se logró extraer ADN de suelo rizosférico y de raíces de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas en suelo sin N agregado (N0) y con 80 KgN/ha (N80), que permitió amplificar el gen *nifH* de todas las muestras. La primera reacción de PCR con los *primers* nifH19F y nifH3 dio como resultado la amplificación de varios fragmentos mientras que la segunda amplificación con los *primers* nifH11 y nifH22 presentó una única banda de 360 pb que coincidió con el tamaño del fragmento esperado (Fig. 4).

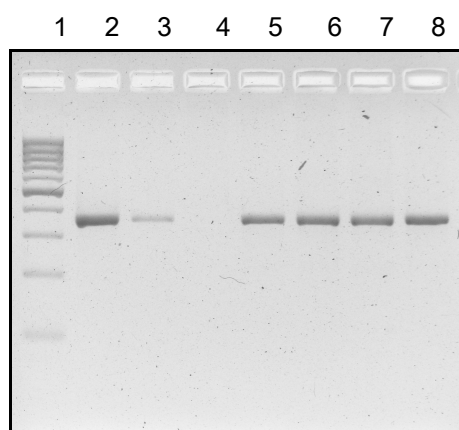


Figura 4: Producto de la amplificación del gen *nifH* con los *primers* nifH11 y nifH22. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), carril 2 y 3: controles positivos (*Herbaspirillum hiltneri* y *Enterobacter sp.*); carril 4: control negativo; carriles 5-8: muestras de suelo rizosférico de plantas de la variedad NK940

El ADN amplificado fue purificado y digerido de forma independiente con las enzimas *Acl* y *HhaI*. El número de fragmentos terminales marcados (T-RFs) obtenidos de las 24 muestras analizadas mediante la restricción con *HhaI* fue 37; mientras que con *Acl* se observaron 25 T-RFs diferentes. Luego de normalizados los datos, en todas las muestras, el perfil de la comunidad obtenido mediante la restricción con *HhaI* presentó mayor número de picos que el perfil obtenido con *Acl*. La media del número de T-RFs en cada tratamiento, expresado como el índice de riqueza (S), varió entre 5 y 13 en las muestras digeridas con *HhaI* y entre 3 y 12 en las muestras digeridas con *Acl* (Cuadro 3). Este resultado evidenciaría que la enzima *HhaI* fue más útil para discriminar a los diazotrofos presentes en estas comunidades.

Los índices de riqueza y de diversidad de Shannon fueron significativamente superiores en las comunidades de suelo rizosférico que en las de raíz (Cuadro 3); demostrando que la

diversidad de diazotrofos en el suelo rizosférico fue mayor que en el interior de las raíces de plantas de maíz de estas variedades.

Cuadro 3: Índice de riqueza (S) y de diversidad de Shannon (H) de las comunidades de diazotrofos en plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas con distintas dosis de N en condiciones controladas (n=3), analizadas mediante T-RFLP del gen *nifH* digerido con las enzimas *AluI* y *HhaI*.

Enzima de restricción	<i>AluI</i>		<i>HhaI</i>	
Tratamiento	S	H	S	H
Raíz PAU 871 N0	4	1.29	5	1.59
Raíz PAU 871 N80	3	0.99	8	2.02
Raíz NK 940 N0	5	1.44	9	2.21
Raíz NK 940 N80	6	1.73	13	2.56
Media raíz *	4.5 b	1.36 b	9 b	2.09 b
Rizósfera PAU 871 N0	10	2.33	12	2.54
Rizósfera PAU 871 N80	8	2.12	9	2.24
Rizósfera NK 940 N0	12	2.43	13	2.42
Rizósfera NK 940 N80	6	1.84	10	2.14
Media suelo rizosférico *	9 a	2.18 a	11 a	2.33 a

Los valores de S y H expresados son la media de tres repeticiones a excepción de * media de 12 muestras analizadas de suelo rizosférico o raíz. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según (Tukey $\alpha = 0.05$)

El análisis de diversidad efectuado mediante la restricción con la enzima *HhaI* en las comunidades de suelo rizosférico y en las endófitas de raíz se presentan en el cuadro 4. Los resultados con *AluI* dan la misma tendencia por lo que se presentan solo los de *HhaI*.

Cuadro 4: Índice de riqueza (S) y de diversidad de Shannon (H) de las comunidades de diazotrofos de raíz y suelo rizosférico de plantas de dos variedades de maíz, con y sin N, analizadas mediante T-RFLP del gen *nifH*.

Raíz	H^a	S^a
NK 940	2.39 A	11.2 A
PAU871	1.81 B	6.3 B
Sin N	1.90 b	7.2 b
Con N	2.29 a	10.3 a
Suelo rizosférico		
NK 940	2.28 A	11.3 A
PAU871	2.39 A	10.3 A
Sin N	2.48 a	12.5 a
Con N	2.19 a	9.2 a

^a promedio de seis muestras. ANOVA independientes, por origen de la muestra (raíz y suelo rizosférico), por variedad y por nivel de fertilización. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$). Letras mayúsculas comparación entre variedades, letras minúsculas entre niveles de fertilización nitrogenada.

Los valores de los índices de Shannon y de riqueza mostraron que las comunidades endófitas de raíz difirieron significativamente entre ambas variedades; la variedad NK940 presentó mayor diversidad genética (Cuadro 4). Las comunidades de diazotrofos endófitos de las plantas fertilizadas con N presentaron mayor diversidad que las comunidades de plantas sin fertilización. La diversidad de las comunidades de suelo rizosférico no presentó diferencias significativas entre las dos variedades ni entre plantas fertilizadas y no fertilizadas (Cuadro 4).

Dos T-RFs (biotipos) fueron comunes a todas las muestras analizadas con la enzima *HhaI* y su longitud en pares de bases fue de 177 y 225-226 (Fig. 5). Las muestras digeridas con la enzima *AclI* mostraron resultados similares, evidenciando la presencia de T-RFs correspondiente a los 97 y 358 pb (Fig. 6).

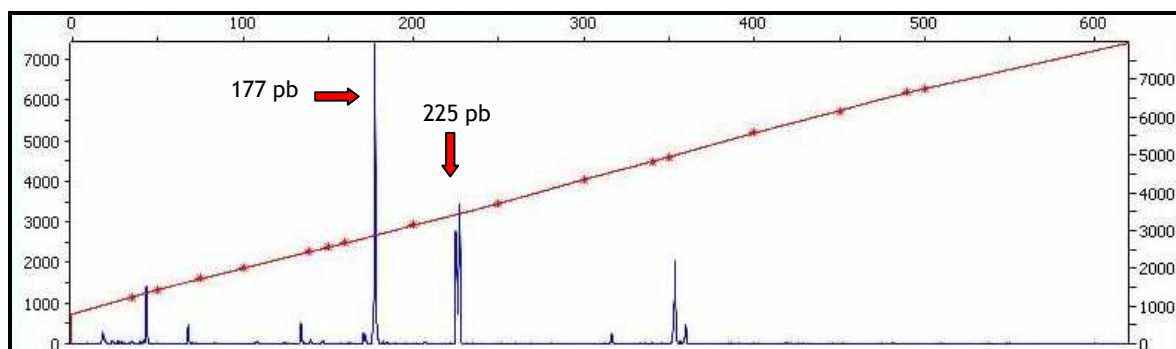


Figura 5 - Electroferograma- T-RFLP *nifH* digerido con la enzima *HhaI* de una muestra de suelo de la variedad NK 940 sin fertilización nitrogenada.

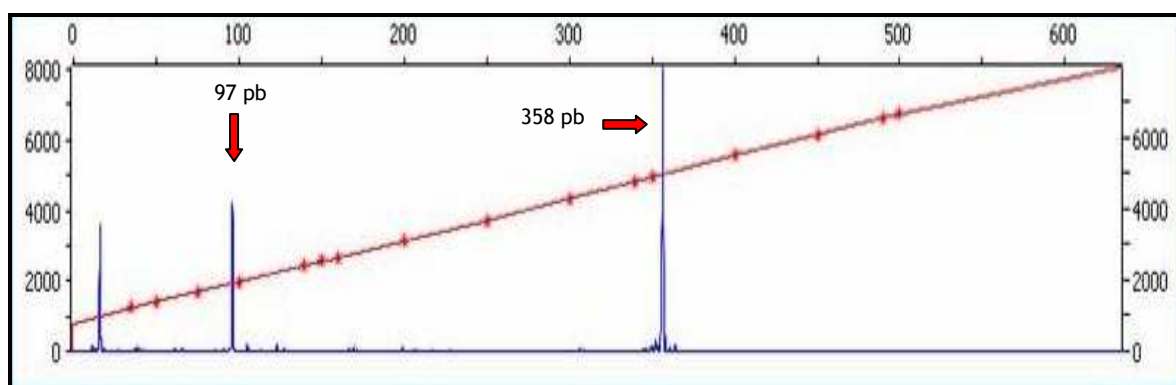


Figura 6 - Electroferograma- T-RFLP *nifH* digerido con la enzima *AclI* de una muestra de raíz de la variedad NK 940 con fertilización nitrogenada.

La abundancia, de algunos T-RFs en las muestras de suelo rizosférico o raíces de ambas variedades de maíz analizadas con la enzima *HhaI* se muestra en la Figura 7. La abundancia de los T-RFs de 177 y 225-226 pb indica que se trata de dos biotipos dominantes dentro de las comunidades de diazotrofos asociados a maíz. En el capítulo II de esta tesis se obtuvieron aislamientos de bacterias diazotrofas de estas plantas de maíz y se realizó el análisis mediante T-RFLP de cultivos puros de aislamientos de los dos géneros más abundantes. Este análisis demostró que los T-RFs que aparecen como dominantes

dentro de estas comunidades de diazotrofos concuerdan con los T-RFs de bacterias del género *Enterobacter* (225-226 pb) y *Pseudomonas* (177 pb).

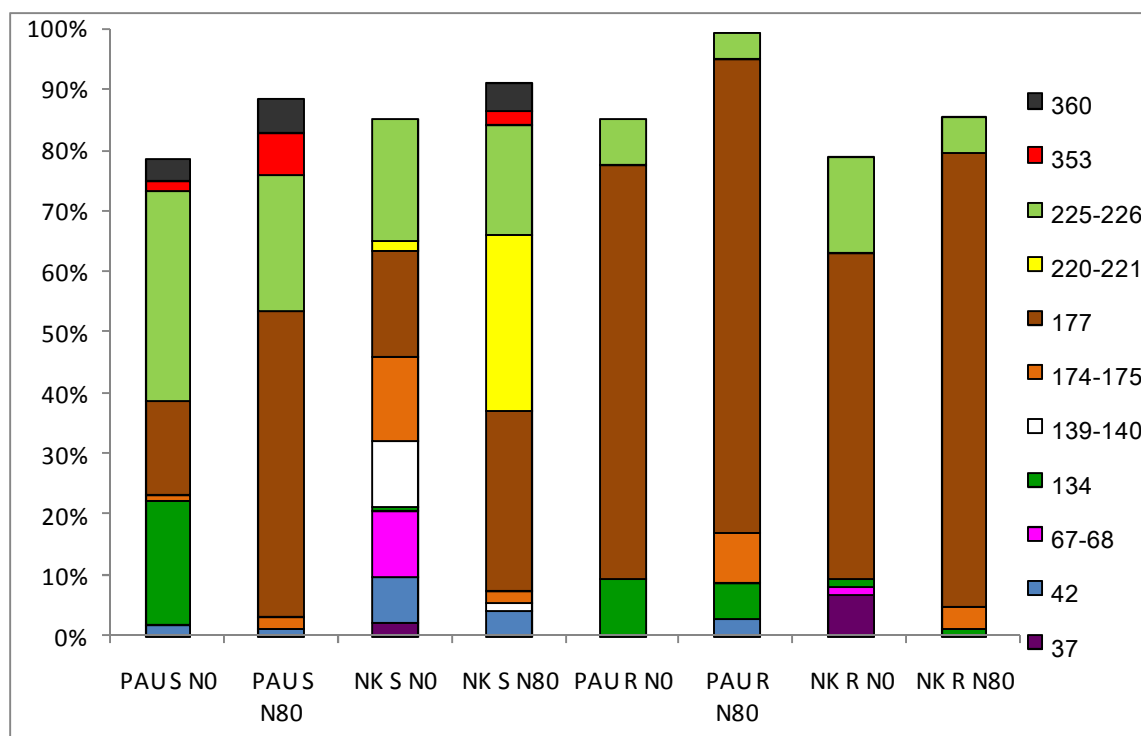


Figura 7 – Abundancia de los T-RFs generados a partir de muestras de suelo rizosférico (S) o raíz (R) de plantas de maíz de las variedades NK940 o PAU871 crecidas con 80 Kg de N/ha (N80) o sin aporte de N (N0). Las barras representan la abundancia de cada T-RFs, expresado como la media de las tres réplicas en los tratamiento. En cada tratamiento se eliminaron los T-RFs únicos.

El T-RF de 353 pb se encontró en las comunidades de suelo, independientemente de la variedad y de la fertilización nitrogenada, y estaba ausente en muestras de raíz. Los T-RFs de 139-140 pb y de 220-221 pb se detectaron sólo en muestras de suelo rizosférico de la variedad NK940, pero no en las comunidades endófitas de las plantas de esta variedad (Fig. 7).

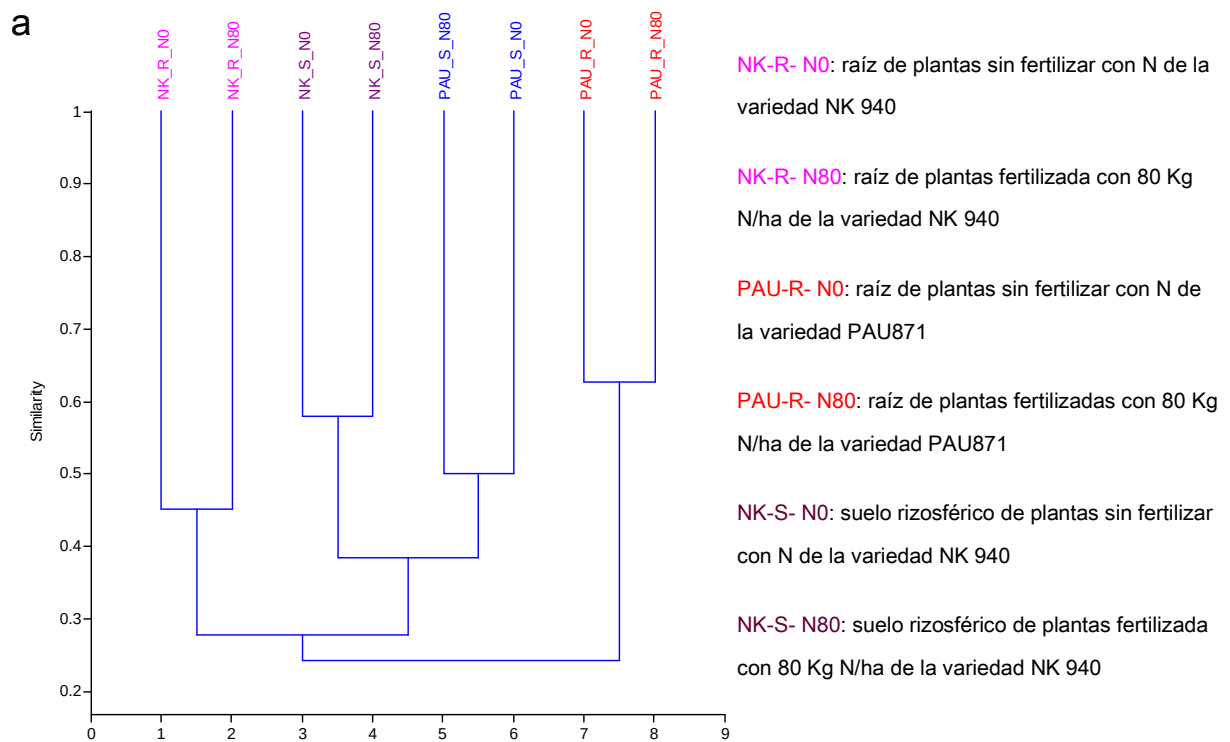
La estructura de la comunidad resultó diferente en las variedades estudiadas (Fig. 7). El biotipo de 42 pb se encontró presente en suelos de ambas variedades y en raíces de la variedad PAU871 pero estuvo ausente en raíces de la variedad NK940, mientras que los T-RFs de 37 pb y 67-68 pb solo se detectaron en plantas de la variedad NK940.

Por otro lado, la fertilización nitrogenada afectó de forma distinta a los diferentes biotipos (Fig. 7). Los T-RFs de 37 pb y de 67-68 pb se encontraron solo en muestras de la variedad NK940 sin fertilizar, mientras que el biotipo de 174-175 pb se detectó en muestras de suelo rizosférico con y sin fertilización nitrogenada así como en raíces de plantas con fertilización nitrogenada, pero no se detectó en raíces de plantas sin fertilización.

El análisis estadístico multivariado de los datos (Fig. 8) muestra la formación de 4 clusters, cada uno de ellos incluye muestras fertilizadas y no fertilizadas de la misma variedad y origen, es decir suelo rizosférico o raíz (Fig. 8a). Esto indica que la fertilización es el factor que menos influye en el agrupamiento de las muestras. Por otro lado este análisis demostró que las comunidades de suelo de ambas variedades mostraron mayor similitud entre ellas que las comunidades de raíces de ambas variedades.

En el análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 8b), el componente 1 explica el 30% de la variabilidad, el componente 2 el 28% y el componente 3 el 17%. El CP 2 divide a las muestras según la variedad (valores positivos en el eje para NK940 y negativos para PAU871), mientras que el CP 1 las divide en muestras de suelo rizosférico o de raíz.

Como se puede apreciar con ambos análisis es decir, *clusters* o PCA, las comunidades más similares fueron las de raíces de plantas de la variedad PAU871 con y sin fertilización nitrogenada, mientras que las más distantes fueron las de raíces de plantas de la variedad NK940 (Fig. 8a y 8b). Esto indicaría que el efecto de la fertilización nitrogenada fue distinto en las comunidades endófitas de ambas variedades, fue mayor el cambio provocado por la fertilización en la variedad NK940 que en PAU871.



b

3D Componentes Principales

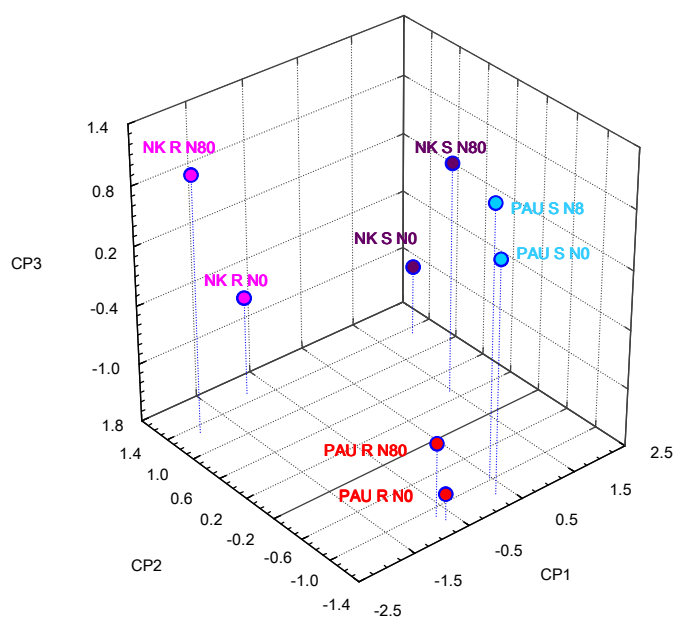


Figura 8: Análisis multivariado de los datos obtenidos por T-RFLP del gen *nifH* digerido con *HhaI* de muestras de suelo rizosférico y raíces de plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940, crecidas con distintas dosis de fertilizando nitrogenado. Se utilizó la matriz de presencia o ausencia de los T-RFs que aportan al menos un 1 % de la abundancia total en cada muestra.

I.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se determinó la densidad y diversidad de bacterias diazotrofas endófitas y rizósfericas en dos variedades de maíz crecidas en suelo con y sin fertilización nitrogenada. Tanto los recuentos de diazotrofos como la técnica de T-RFLP, utilizada para determinar la diversidad, permitieron establecer diferencias en la comunidad de bacterias fijadoras de N_2 entre los distintos tratamientos. Se evidenció que existen diferencias tanto en las poblaciones cultivables como en las totales (cultivables y no cultivables) de bacterias diazotrofas asociadas a maíz.

A pesar de que se han realizado muchos avances en el estudio de la diversidad de las bacterias fijadoras de N_2 , la comprensión de las interacciones entre la comunidad del suelo y aquellos microorganismos que viven asociados a las gramíneas es aún escasa. Los endófitos pueden tener origen en las poblaciones del suelo (Roesch *et al.*, 2008) o provenir de las semillas (Rijavec *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo mostraron que el número y diversidad de bacterias diazotrofas varió según el origen de la muestra y fueron mayores en la rizósfera en relación a las endófitas (Cuadro 2 y 3). Esto indicaría que la población de bacterias endófitas constituye una submuestra de la población presente en el suelo rizosférico. Mediante el método de T-RFLP se detectaron biotipos presentes en las muestras de suelo que no se detectaron en el interior de las raíces (Fig. 7). Si bien se desconoce a cuales microorganismos pertenecen esos biotipos, este resultado indicaría que se trata de fijadores libres que se encuentran adaptados a sobrevivir en el suelo rizosférico, pero que no poseen la capacidad de penetrar y colonizar el interior de las raíces de las dos variedades de maíz estudiadas. Estos resultados que demuestran mayor diversidad en la rizósfera que en el interior de las plantas, concuerdan con los de varios autores. Roesch *et al.*, (2008) que utilizaron 3 métodos para determinar la diversidad de diazotrofos hallaron que ésta era mayor en muestras de suelo rizosférico que en raíces y tallos de plantas de maíz. Berg *et al.*, (2005) mostraron que la comunidad de bacterias antagonistas de hongos fue más diversa en la rizósfera de plantas de papas que en el interior de las raíces y Germida *et al.*, (1998) mostraron que las poblaciones de endófitos fueron menos diversas

que las poblaciones rizosféricas de plantas de canola y que los endófitos se originaban de las poblaciones rizosféricas. Rosenblueth y Martínez-Romero (2004) evidenciaron que las cepas de *Rhizobium etli* encontradas en el interior de los tallos de maíz representaban una submuestra del total de cepas de *R. etli* encontradas en la rizósfera de *Phaseolus vulgaris*; apoyando la hipótesis de que las plantas forman asociaciones endofíticas con bacterias que existen en el suelo rizosférico.

En la rizósfera existe una selección de aquellos microorganismos capaces de sobrevivir y competir con otros; las plantas seleccionan ciertos microorganismos que son los que se alojan y colonizan el interior de sus tejidos. La diferencia detectada en la evaluación del número y diversidad entre las comunidades rizosféricas y las endófitas puede ser explicada en parte por la disponibilidad de nutrientes existente (exudados radicales) y por la respuesta de defensa del huésped. Varios estudios indican que la fijación de N₂ en plantas está limitada por la disponibilidad de fuentes de carbono (Christiansen-Weniger *et al.*, 1992; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003), por lo que la preferencia por colonizar la rizósfera está dada por la mayor disponibilidad de compuestos carbonados presentes en esta región. Por otro lado, la respuesta de defensa del huésped impide la penetración y colonización de las raíces. En plantas de sorgo se observó una fuerte respuesta de defensa frente a la invasión de *H. seropedicae* y *H. rubrisubalbicans* (James *et al.* 1997), así como en plantas de arroz inoculadas con *H. seropedicae* (James *et al.* 2002; Gyaneshwar *et al.* 2002). Estudios moleculares, también evidenciaron que la respuesta de defensa de la planta limita las poblaciones de bacterias en el interior de los tejidos (Iniguez *et al.*, 2005).

Numerosos estudios evidencian que algunas líneas y variedades de gramíneas proveen de condiciones adecuadas que estimulan y sustentan la fijación de N₂ realizada por microorganismos endófitos (Boddey *et al.*, 1995; Engelhard *et al.*, 2000; Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero 2001; Iniguez *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 1994; Shrestha y Ladha 1996; Urquiaga *et al.*, 1989). En plantas de maíz se ha observado un efecto del genotipo en la composición de la comunidad rizosférica (Aira *et al.*, 2010; Brusetti *et al.*, 2004); estas observaciones pueden ser explicadas en base a que los diferentes genotipos de maíz producen diferentes exudados radiculares (Corrales *et al.*, 2007) los que determinan la

calidad y cantidad de nutrientes en la rizósfera y por lo tanto influyen sobre la composición de la comunidad microbiana (Baudoin *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en esta tesis respecto al número y diversidad (medida mediante el índice de Shannon) mostraron que el efecto de la variedad sobre las poblaciones rizosféricas no fue significativo. Sin embargo, el genotipo de maíz influyó sobre el número y la diversidad de diazotrofos endófitos. En plantas de la variedad NK940 fue mayor que en la variedad PAU871 (Fig. 3 y cuadro 4). Por otro lado, la estructura de las comunidades asociadas a cada variedad fue distinta, porque mediante la técnica de T-RFLP se identificaron biotipos (T-RFs) que estaban presentes en plantas de una variedad y ausentes en la otra y el análisis multivariado de los datos mediante Componente Principales (Fig 8b), mostró que el componente principal 2 divide a las muestras según la variedad, indicando diferencias entre las comunidades de ambas variedades.

Otros autores, en otros cereales, encontraron resultados similares que apoyan la hipótesis de que el genotipo influye sobre la comunidad de bacterias fijadoras de N₂. Jha *et al.*, (2009) encontraron diferencias de al menos un orden de magnitud en el número de bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas de raíces de dos cultivares de arroz. Cohelo *et al.*, (2009) que determinaron la diversidad y el número de copias del gen *nifH* en dos cultivares de sorgo, encontraron que la comunidad asociada al cultivar BRS 308 fue más abundante y diversa que la asociada al cultivar BRS 310.

Los resultados de esta tesis evidenciaron que el genotipo de maíz influye y determina que microorganismos penetran y colonizan las raíces. Estos resultados apoyan la importancia de trabajar con cultivares/variedades seleccionados en base a la fijación de nitrógeno, ya que hay genotipos con diferentes capacidades de albergar bacterias diazotrofas, y por lo tanto responderían mejor a la inoculación, o simplemente a la colonización natural por bacterias diazotrofas presentes en el suelo.

El genotipo de la planta no es el único factor que determina el nivel de FBN y las poblaciones de diazotrofos en gramíneas; se han señalado otros factores que inciden sobre ésta, como el tipo y nivel de fertilización (Islam *et al.*, 2010; Pariona-Llanos *et al.*, 2010; Yim *et al.*, 2009). En este capítulo se buscó demostrar si el aporte de N que se adiciona afecta o

no a la comunidad de diazotrofos asociados a maíz. El número y diversidad de las comunidades de diazotrofos del suelo rizosférico fueron similares entre plantas crecidas con y sin nitrógeno; sin embargo, los resultados mostraron un efecto de la fertilización nitrogenada sobre la densidad y diversidad de bacterias diazótrofes endófitas de raíz (Fig. 2 y cuadro 4). Llama la atención el mayor número y diversidad detectada en las comunidades endófitas de plantas fertilizadas con N. Por otro lado, el análisis de *clusters* de los datos obtenidos de la técnica de T-RFLP nos permite afirmar que la fertilización nitrogenada, en las condiciones experimentales de este trabajo, afectó tanto a las comunidades rizosféricas como a las comunidades endófitas, ya que en todos los tratamientos las comunidades de plantas fertilizadas y no fertilizadas poseen menos del 65% de similitud (Fig. 8).

Se ha estudiado el efecto de la fertilización nitrogenada sobre las poblaciones rizosféricas y endófitas de diazotrofos asociados a cultivos de interés. En suelos se ha determinado tanto aumento como disminución en la diversidad de bacterias en función de la aplicación de N. Cohelo *et al.*, (2009) estudiaron el efecto de la fertilización con 120 Kg N/ha respecto a la fertilización con 12 Kg N/ha sobre la diversidad de diazotrofos rizosféricos, en dos cultivares de sorgo bicolor. En uno de los cultivares se observó reducción significativa en la diversidad y abundancia de las poblaciones de la rizósfera de plantas con 120 Kg N/ha respecto a las fertilizadas con 12 Kg N/ha, mientras que en el otro cultivar no se observaron diferencias en relación al nivel de fertilización. Este resultado demuestra que las comunidades asociadas a cada cultivar responden de manera diferente a altas dosis de fertilizante nitrogenado. Piceno y Lovell (2000) estudiaron el efecto a corto plazo (2 y 8 semanas) que tiene la aplicación de dosis elevadas de N y observaron estabilidad de la comunidad de diazotrofos del suelo rizosférico. La diversidad de diazotrofos en suelo sin limitaciones de C, puede aumentar cuando se fertiliza hasta con 150 Kg de N/ha (Teng *et al.*, 2009), lo que puede explicarse por una mejora en las condiciones nutricionales que permiten un buen desarrollo de cualquier especie, incluidos los diazotrofos.

Los resultados de este capítulo, relacionados al incremento del número y diversidad de diazotrofos endófitos de raíz con la fertilización nitrogenada, concuerdan con los observados por Juraeva *et al.*, (2006) que evaluaron mediante qPCR la abundancia de diazotrofos en tallo y raíz de plantas de pepino y encontraron que el número de copias del gen *nifH* presentó una correlación positiva con el nivel de fertilización nitrogenada y con el N presente

en la planta. Utilizando una metodología diferente, Yim *et al.*, (2009), demostraron que en plantas de col el número de diazotrofos rizosféricos y endófitos fue significativamente mayor en plantas fertilizadas respecto a plantas sin fertilizar. Estos resultados pueden ser explicados mediante la hipótesis propuesta por Teng *et al.*, (2009) que plantearon que una mejora en las condiciones nutricionales para la planta permite un mejor desarrollo de cualquier especie microbiana, incluidos los diazotrofos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las dos variedades de maíz estudiadas responden a la fertilización nitrogenada (Cuadro 1), mostrando mayor desarrollo con el agregado de N, por lo tanto es de esperar que las comunidades de diazotrofos asociados a ellas encuentren mejores condiciones nutricionales en plantas fertilizadas.

Sin embargo, estos resultados no concuerdan con la tendencia general citada en la bibliografía. Tan *et al.* (2003), observaron que en plantas de arroz, la fertilización produjo disminución de la diversidad y densidad de la población de diazotrofos endófitos de raíz. Estudios realizados sobre poblaciones cultivables han reportado que niveles altos de N disminuyen el nivel de FBN e inhiben la colonización de caña de azúcar por *G. diazotrophicus* (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1999). Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado (2003), estudiaron la población de tres cepas diferentes de *G. diazotrophicus* en diferentes cultivares de caña de azúcar con diferentes niveles de fertilización y concluyeron que la población disminuyó drásticamente en relación a la edad de la planta, la dosis de N utilizada, la cepa y cultivar estudiados.

Es de destacar que los resultados encontrados en la bibliografía son controvertidos y el efecto de la fertilización nitrogenada parece estar inter-relacionado con otros factores que también influyen sobre las poblaciones de bacterias fijadoras de N₂. El análisis multivariado de los datos obtenidos de la técnica de T-RFLP puso en evidencia que el efecto de la fertilización nitrogenada fue mayor en las comunidades endófitas de plantas de maíz de la variedad NK940 que en la variedad PAU871 (Fig. 8). Medeiros *et al.*, (2006) analizaron el efecto de dos fuentes de fertilizante nitrogenado en la FBN (establecida por la técnica de reducción de acetileno) y la colonización de *G. diazotrophicus* en dos variedades de caña de azúcar y observaron que a los 30 días de la aplicación la respuesta fue diferente en cada

variedad. En la variedad SP792312 se detectó inhibición de la FBN con ambas fuentes de N (amonio o nitrato), y en la variedad SP701143 la colonización y el nivel de FBN se vieron afectadas negativamente solo con la aplicación de nitrato, mientras que se observó una correlación positiva entre el nivel de fertilización con amonio y el NMP de diazotrofos y el nivel de FBN. Los autores explican estos resultados en base a diferencias en la fisiología de la planta; en la variedad SP701143 el amonio no parece ser la vía regular de asimilación de N y por lo tanto no afecta la población de diazotrofos asociados a esta variedad; sino que como en la mayoría de las plantas, el nitrato parece ser utilizado preferencialmente por esta variedad. Fuentes-Ramirez *et al.* (1999) sugirieron por primera vez que el efecto de inhibición por nitrógeno está relacionado al estado fisiológico de la planta que se altera por el aporte y acumulación de N y subsecuentemente afecta la asociación de la planta con los microorganismos. Esta hipótesis también fue planteada por Roesch *et al.*, (2006) que determinaron que la colonización de maíz por diazotrofos fue inhibida por altas dosis de N sólo en las etapas tempranas del crecimiento de las plantas (menos de 30 días desde la germinación), mientras que en etapas tardías el efecto no fue significativo o incluso se observó un aumento en el número y diversidad de las poblaciones endófitas de raíz. Dado que las dosis de N no afectaron las poblaciones de diazotrofos en todos los estadios de la planta, los cambios observados no parecen ser un efecto directo del N sobre las bacterias sino a través de la planta, debido a los cambios drásticos que ocasiona el N sobre la fisiología de las mismas (Fernández & Rosiello, 1995), que afectarían la interacción planta-microorganismo.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo añaden un interesante enfoque y perspectiva hasta ahora poco documentado en la bibliografía y es que no todos los géneros o especies de diazotrofos responden igual a la fertilización nitrogenada ya que se detectaron biotipos que aumentaron su abundancia y otros que sólo estuvieron presentes en muestras fertilizadas con N (Fig. 7). En el mismo sentido, los resultados de Muthukumarasamy *et al.*, (1999), mostraron que *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum* en caña de azúcar respondieron en forma diferente a la fertilización: mientras que la población de *A. diazotrophicus* se inhibió la de *Herbaspirillum* no se vio afectada. En los estudios de Cohelo *et al.*, (2009) y Tan *et al.*, (2003) donde la diversidad total disminuyó con

la fertilización nitrogenada se observaron genotipos bacterianos que prosperaron en condiciones de alta fertilización nitrogenada.

Los resultados de las investigaciones realizadas en cultivos muy variados, incluso algunas efectuadas en maíz, muestran tendencias variables. En resumen, se puede concluir que la fertilización nitrogenada afecta de manera variable la densidad, estructura y diversidad de la comunidad de diazotrofos asociada al cultivo de maíz. Ese efecto es consecuencia de una interacción compleja que depende de otros factores como la variedad de la planta, la composición y nivel de los exudados radicales, la edad de la planta, los mecanismos naturales de defensa a la entrada microbiana en sus tejidos, el tipo de fertilizante y las especies de diazotrofos presentes en esa comunidad. En esta tesis se aplicó la técnica de T-RFLP para evidenciar cambios en las comunidades de diazotrofos, relacionados al genotipo de la planta y nivel de fertilización nitrogenada. Ésta técnica resultó sencilla, rápida y adecuada para generar perfiles de la comunidad diazotrófica asociada a plantas de maíz sin la necesidad de obtener cultivos puros. Si bien esta técnica ha sido aplicada para el estudio de comunidades diazotrofas asociadas a otros cultivos, este es el primer estudio realizado en plantas de maíz. En las condiciones en que se realizó este trabajo, se demostró que la comunidad de bacterias diazotrofas varió con el genotipo de la planta y con el nivel de fertilización nitrogenada, con mayor énfasis en el genotipo vegetal. Las comunidades de diazotrofos en el suelo rizosférico reflejan “en parte” a las comunidades que se hallan en el interior de las raíces. Los resultados obtenidos contribuyen a dar un paso más hacia el conocimiento de las asociaciones de bacterias fijadoras de N_2 en maíz, quedan aún por dilucidar muchos aspectos como cuales son el o los factores que permiten el ingreso de algunas bacterias y de otras no al interior de los tejidos de la planta, qué géneros/especies se ven más afectados por la fertilización nitrogenada, y qué otros factores o condiciones ambientales influyen en la interacción planta-microorganismo. Un aspecto interesante a investigar es la actividad de los microorganismos diazotrofos que componen la comunidad endofita de maíz, mediante métodos moleculares como el análisis de *nifH*-mRNA, lo que permitiría aportar conocimientos sobre la actividad de estas comunidades sin la necesidad del aislamiento, dado que muchos diazotrofos detectados no han sido aún cultivados.

I.5 BIBLIOGRAFÍA

- Aira M., Gómez-Brandón M., Lazcano C., Bååth E., Dominguez J. 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol. Biochem* 42: 2276-2281
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 35: 1183-1192.
- Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora RA., 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.* 1:215-229
- Boddey R.M., Chalk P.M., Victoria R.L., Matsui E., Döbereiner J. 1983. The use of the ¹⁵N-isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. *Can J. Microbiol.* 39: 1036–1045.
- Boddey R.M., de Oliveira O.C., Urquiaga S., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani V.L.D., Döbereiner J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195-209.
- Bruseti L., Francia P., Bertolini C., Pagliuca A., Borin S., Sorlini C., Abruzzese A., Sacchi G., Viti C., Giovannetti L., Giuntini E., Bazzicalupo M., Daffonchio D. 2004. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant Soil* 266: 11-21.
- Chelius M.K., Triplett E.W. 2001 The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecol.* 41: 252–263
- Chen G., Hoglong Z., Zhang Y. 2003 Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology* 157: 393-398.

- Christiansen-Weniger C., Groneman A.F., Veen J.A. 1992 Associative N₂ fixation and root exudation of organics acids from wheat cultivars of different aluminum tolerance. *Plant Soil* 139: 167- 174.
- Coelho M., Marriel I., Jenkins S., Lanyon C., Seldin L., O'Donnell A. 2009. Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Appl. Soil Ecol.* 42:48–53.
- Corrales I., Amenó M., Poschenrieder C., Barceló J. 2007. Phosphorus efficiency and root exudates in two contrasting tropical maize varieties. *J. Plant Nutrition* 30: 887-900.
- Döbereiner J., Day J.M., Dart P.J. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* – *Azotobacter paspali* association. *J Gen Microbiol* 71: 103–116.
- Dunbar J., Lawrence O., Kuske C. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Appl. Env. Microbiol.* 66:2943-2950.
- Engelhard M., Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* 2:131-41.
- Fernández M.S., Rosiello M.O.P. 1995. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14:11-148
- Fuentes-Ramirez L.E., Caballero-Mellado J., Sepúlveda J., Martinez-Romero E. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 117–127.
- Fuentes-Ramirez L.E., Jimenez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR, Caballero-Mellado J 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154 :145–150
- Fuhrman J.A., Griffith J.F., Schwalbach M.S. 2002. Prokaryotic and viral diversity patterns in marine plankton. *Ecological Research* 17:183–94.

- Fürnkranz M., Wanek W., Richter A., Abell G., Rasche F., Sessitsch A. 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *The ISME Journal* 2: 561–570
- Gyaneshwar P., James E.K., Reddy P.M., Ladha J.K. 2002. Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytol.* 154:131–146
- Germida J.J., Siciliano S.D., De Freitas J.R., Seib A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:43-50.
- Gutiérrez-Zamora M.L., Martínez-Romero E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* 91:117-126.
- Hewson I., Fuhrman J.A. 2007. Covariation of viral parameters with bacterial assemblage richness and diversity in the water column and sediments. *Deep Sea Research Part I* 54:811–30.
- Ikeda S., Omura T., Ytow N., Komaki H., Minamisawa K., Ezura H.; Fujimura T. 2006. Microbial community analysis in the rhizosphere of a transgenic tomato that over expresses 3-hidroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase. *Microbes and Environments* 21: 261-271.
- Iniguez A.L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B.M.M., Stone J.M., Triplett E.W. 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:169-178
- Iniguez A.L., Dong Y., Triplett E.W. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1078-1085.
- Islam R., Trivedi P., Madhaiyan M., Seshadri S., Lee G., Yang J., Kim Y., Kim M., Han G., Singh Chauhan P., Sa T. 2010. Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment. *Biol Fertil Soils* 46:261–269

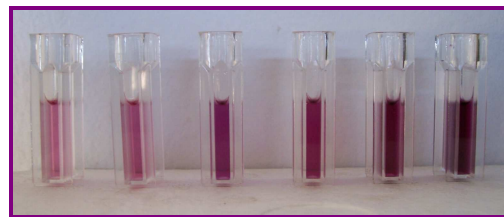
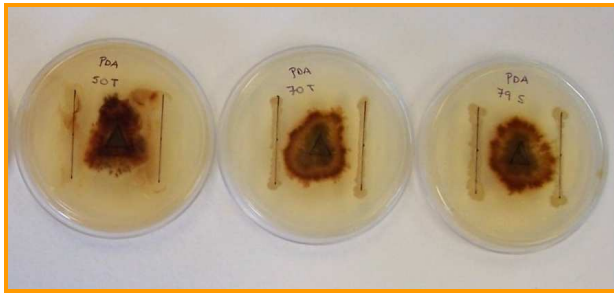
- James E.K., Olivares F.L., Baldani J.I., Döbereiner J. 1997. Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue and leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J Exp. Bot. 48:785–797
- James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N., Barraquio W.L., Reddy P.M., Iannetta P.P.M., Olivares F.L., Ladha J.K. 2002 Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Mol Plant – Microb Interact 15:894–906
- Jha B., Thakur M., Gontia I., Albrecht V., Stoffels M., Schmid M., Hartmann A. 2009. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. European J. Soil Biol. 45: 62-72
- Juraeva D., George E., Davranov K., Ruppel S. 2006. Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. Can. J. Microbiol. 52: 731–739
- Kirchhof G., Reis V.M., Baldani J.I., Eckert B., Döbereiner J., Hartmann A. 1997. Occurrence, physiology and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. Plant Soil 194: 45–55.
- Kloepper J.W. 2003. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR, in: Abstracts and short papers. 6th International PGPR workshop, 5-10 october 2003, M.S., Reddy, M., Anandaraj, S.J., Eapen, Y.R., Sarma and J.W., Kloepper, eds., Indian Institute of Spices Research, Calicut, India pp.81-92.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablotowicz R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7:39-44.
- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63:4516–4522.
- Martin D.E., and Reinhold-Hurek B. 2002. Distinct roles of PII-like signal transmitter protein and *amtB*. regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and

- posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. J Bacteriol 184: 2251–2259.
- Medeiros A.F.A., Polidoro J.C., Reis V.M. 2006 Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.) Plant Soil 279: 141–152
- Miranda C.H.B., Urquiaga S., Boddey R.M. 1990. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution technique. Soil Biol. Biochem. 22: 657–663
- Montañez A., Abreu C., Gill P.R., Hardarson G., Sicardi M. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biol. Fertil. Soils 45:253–263
- Muñoz-Rojas J. y Caballero-Mellado J. 2003. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. Microbial Ecol. 46: 454–464.
- Muthukumarasamy R., Revathi G., Lakshminarasimhan C. 1999. Influence of N-fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. Biol. Fertil. Soils 29: 157–167.
- Ohkuma M., Noda S., Kudo T. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4926–4934.
- Pariona-Llanos R., Ibañez de Santi Ferrara F., Soto Gonzales H.H., Ramos Barbosa H. 2010 Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European J. Soil Biol. 46 :387–393
- Piceno Y.M., Lovell C.R. 2000. Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. Microbial Ecology 39: 32–40.

- Reis F.B. Jr., Reis V.M., Urquiaga S., Dobereiner J. 2000. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Soil* 219: 153–159.
- Reis, V.M., dos Reis F.B. Jr., Quesada, D.M. de Oliveira, O.C.A Alves, B.J.R. Urquiaga S. and. Boddey R.M. 2001. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. *Australian J. Plant Physiol.* 28: 837-844
- Reis, V.M., Olivares, F.L., Döbereiner, J. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:401-405.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A. 2002. Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2261–2268
- Rennie R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J. Microbiol.* 27:8–14.
- Rijavec T., Lapanje A., Dermastia M., Rupnik M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can J. Microbiol.* 53: 802-808
- Roesch, L.F.W., Camargo, F.A.O., Bento F.M., Triplett E.W. 2008. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil* 302:91-104
- Roesch L.F.W., Camargo F.A.O., Selbach P.A., Sa E.L.S., Passaglia L.M.P. 2005. Identificacao de cultivares de milho eficientes na absorcao de nitrogenio e na associacao com bacterias diazotroficas. *Ciencia Rural* 35: 924–927.
- Roesch L.F.W., Olivares F., Pereira L., Selbach P.A., Saccol de Sá E., Camargo F.A.O. 2006 Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen- supply. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:967-974.

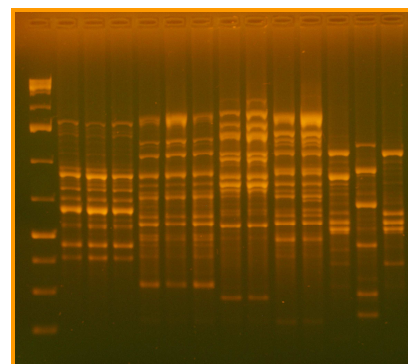
- Rosenblueth M., Martinez Romero E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. Arch. Microbiol. 181:337-344.
- Rosenblueth M., Martinez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Mol. Plant –Microb Interact. 19:827–837
- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. 2001. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces* specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Ecol. 39:23–32.
- Shannon C.E., Weaver W. 1949. The Mathematical Theory of Communication; University of Illinois Press; Champaign; IL.
- Siqueira J.O., Franco A.A. 1988. Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas. MEC Ministerio da Educacao/ABEAS, Brasilia; ESAL/FAEPE, Lavras. 236 pp.
- Shrestha R.K., Ladha J.K. 1996. Genotypic variation in promotion of rice dinitrogen fixation as determined by nitrogen-15 dilution. Soil. Sci. Soc. Am. J. 60:1815-1821.
- Sturz A.V., Nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl. Soil Ecol. 15:183-190.
- Tan Z., Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. Environ. Microbiol. 5:1009-1015.
- Teng Q., Sun B., Fu X., Li S., Cui Z. y Cao H. 2009. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China. Journal Microbiol 47:135-141.
- Ueda T., Suga Y., Matsuguchi T. 1995. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. European J. Soil Science 46: 415–421.

- Urquiaga S., Botteon P.B.L., Boddey R.M. 1989. Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ^{15}N -labeled soil. 311-319 p in: Nitrogen Fixation with Non-Legumes. A. Skinner (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Vose P.B., Ruschel A.P., Victoria R.L., Matsui E. 1981. Potential N_2 – fixation by sugar cane, *Saccharum* sp. In solution culture – I. Effect of NH_4 vs. NO_3 , variety and nitrogen level. In Associative N_2 Fixation. Vol. II. Eds. P B Vose and A P Ruschel. pp. 119–123. CRC, Boca Raton. ISBN 0–8493–6131–1.
- Yeager C.M., Kornosky J.L., Housman D.C., Grote E.E., Belnap J., Kuske C.R. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. Appl Environ. Microbiol. 70: 973–983.
- Yim W.J., Poonguzhali S., Madhaiyan M., Palaniappan P., Siddijee M.A., Sa T. 2009. Characterization of plant growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. J. Microbiol. 47: 147-155
- Young J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. (Eds.). Chapman and Hall, New York, NY, pp. 43–86.
- Zani S., Mellon M.T., Collier J.L., Zehr J.P. 2000. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. Appl Environ Microbiol 66:3119-3124
- Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environ. Microbiol. 5: 539–554.



CAPÍTULO II

Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias diazotrofas asociadas a maíz



II.1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias que promueven el crecimiento vegetal, (PGPB, por su sigla en inglés), pueden establecer asociaciones con los vegetales en la rizósfera o como endófitas. La rizósfera es la zona del suelo que rodea a las raíces, donde se dan la mayoría de las interacciones planta-microorganismos (Frioni, 2006). Los endófitos son microorganismos que viven en el interior de los tejidos vegetales sin causar daños a su huésped (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). La promoción del crecimiento vegetal por estos microorganismos ocurre por la fijación biológica de N_2 (FBN) (Hurek *et al.*, 2002; Iniguez *et al.*, 2005), la producción de fitohormonas (Baca y Elmerich 2007), la solubilización de fosfato (Sturz *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2002), y/o el control biológico de microorganismos fitopatógenos por la producción de sustancias antimicrobianas, la competencia por nutrientes, y/o por la inducción de resistencia sistémica en el vegetal (Bally y Elmerich, 2007).

El nitrógeno constituye un elemento esencial para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, etc y es, después del carbono e hidrógeno, el más abundante en la materia viva. El nitrógeno es generalmente considerado, después del agua, el principal factor limitante del crecimiento vegetal (Franco y Döbereiner, 1994). En el suelo, la mayor proporción de nitrógeno es orgánica (98 % del total) y menos del 2 % corresponde a formas minerales como amonio, nitratos y nitritos, los cuales son fuente de nutrientes para los vegetales, excepto los nitritos que resultan tóxicos.

Los diazotrofos, bacterias que convierten al N atmosférico (N_2) en amonio, que puede a su vez ser utilizado por las plantas para sintetizar aminoácidos, poseen una ventaja competitiva en un ambiente pobre en N como suele ser el suelo. Por muchos años se creyó que la capacidad de fijar N_2 estaba limitada a unas pocas especies microbianas (Postgate, 1981), pero en los últimos 30 años ha sido demostrado que esta propiedad se encuentra en muchos organismos del dominio Bacteria y también entre los metanogénicos del dominio Archaea (Young, 1992).

El cultivo de maíz requiere grandes cantidades de fertilizante nitrogenado, para obtener un rendimiento promedio de entre 7-9 t/ha se aplican entre 100-150 Kg de N/ha (Mehnaz *et al.*, 2010). Desafortunadamente, más del 50% del fertilizante aplicado al cultivo no es utilizado

por la planta (Halvorson *et al.*, 2002), lo que contribuye a la contaminación de los suelos y aguas con nitrato, que resulta tóxico en niveles superiores a 50 mg.mL⁻¹ en el agua. En este contexto, el proceso natural de FBN tiene un papel importante ya que constituye un aporte no contaminante de nitrógeno. En los últimos años, para minimizar el uso de fertilizantes y potenciar el desarrollo de una agricultura sustentable, se ha apostado al uso de bacterias PGPB como una alternativa más favorable desde el punto de vista económico y ambiental (Kennedy *et al.*, 2004).

En varios trabajos se ha demostrado el aporte de N a gramíneas por medio de bacterias diazotrofas (Cocking 2003; Döbereiner 1997; Hurek *et al.*, 2002; James y Olivares 1998; Sevilla *et al.*, 2001; Sturz y Nowak 2000). Entre estas, el maíz establece asociaciones tanto rizosféricas como endófitas con bacterias fijadoras de N₂ (García de Salomone *et al.*, 1996; Montañez *et al.*, 2009) y promotoras del crecimiento vegetal (Dobbelaere *et al.*, 2003). En los últimos años, los métodos independientes del cultivo han demostrado que existe una gran diversidad de bacterias en los tejidos de plantas de maíz (Chelius y Triplett, 2001; Roesch *et al.*, 2008).

Para explotar al máximo el potencial de las bacterias diazotrofas de promover el crecimiento vegetal, es importante obtener aislamientos nativos que se encuentren adaptados a las condiciones ambientales y que puedan ser utilizados como inoculantes (Soares *et al.*, 2006). En este capítulo los objetivos fueron: i) aislar bacterias diazotrofas de suelo rizosférico y de raíz y tallo de plantas de dos variedades de maíz con y sin fertilización nitrogenada, ii) identificar los aislamientos obtenidos y iii) evaluar sus características promotoras del crecimiento vegetal.

II.2.MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. Aislamiento de diazotrofos

Se utilizaron plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 desarrolladas en macetas con suelo:arena no estéril con y sin fertilización nitrogenada (N0, N40 y N80) según se describió en el capítulo I. A los 45 días de la siembra se colectaron muestras de suelo rizosférico, raíces y tallos, de cada planta, a los efectos de realizar aislamientos de bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas.

Para el aislamiento de diazotrofos de suelo rizosférico, se sacudió la raíz para desprender restos del suelo, el suelo que quedó adherido se consideró rizosférico y se colocó 1 g en 9 mL de NaCl 0.9%, se realizaron diluciones y 60 µL de la dilución 10^{-3} se inocularon por duplicado en frascos con los 3 medios semi-sólidos (JMV, LGI, jNFb). Los frascos se incubaron a 28°C durante 7 días. A partir de los medios semi-sólidos que mostraron evidencias de crecimiento bacteriano (cambios de color o turbidez) se realizó un nuevo repique en frascos con el mismo medio semisólido sin N combinado. Los nuevos repiques fueron incubados a 28°C por 7 días. Este procedimiento se repitió una vez más para confirmar la capacidad de crecimiento en medio sin N combinado. De cada frasco se realizó un aislamiento en medio TY sólido en placas incubadas a 28°C por 2 días. Las colonias aisladas se repicaron nuevamente en el mismo medio sólido para la obtención de cultivos puros. Los cultivos puros se conservaron en medio TY líquido en glicerol al 50 % a -20 ° C.

Para aislar diazotrofos endófitos, las raíces y tallos de cada planta se lavaron con agua destilada para remover restos de suelo y se realizó una desinfección superficial con alcohol 70% (v:v) por 3 min, seguido de 15 min en hipoclorito de sodio al 2.5% (v:v) para las muestras de tallo y 10 min para las muestras de raíz y 3 lavados con agua destilada estéril. La eficacia del proceso de desinfección superficial se verificó colocando trozos de raíz y tallo en la superficie del medio TY: 5g/L triptona, 3 g/L extracto de levadura, 4ml/L CaCl_2 (2.5%), 15 g/L agar; pH 7 (Josey *et al.*, 1979). Luego de 1 min los trozos se retiraron y las placas se incubaron a 28°C durante 48 h. Las raíces se cortaron en trozos pequeños y los tallos se pelaron y cortaron con bisturí estéril. Trozos de aproximadamente 5 mm se introdujeron en

frascos con 5 mL de 3 medios semi-sólidos sin N combinado: LGI, jNFb y JMV (Cavalcante & Döbereiner 1988; Gillis *et al.*, 1989; Döbereiner, 1992; Reinhold-Hurek *et al.*, 1993; Döbereiner, 1995).

II.2.2. Caracterización genética e identificación de los aislamientos

Obtención de ADN

A partir de los cultivos puros se realizó un lisado de las células. Se tocó con la punta de un tip estéril una colonia aislada que se resuspendió en 25 µL de buffer de lisis (0.05 % NaOH, 0.25 % SDS) y se incubó a 95°C por 10 min. Se agregaron 225 µL de agua milli Q estéril y se centrifugó por 5 min a 12000 rpm. El sobrenadante se conservó a – 20 ° C.

Amplificación del gen *nifH*

Para confirmar el potencial carácter de fijadores de N₂ de los aislamientos, se procedió a la detección del gen *nifH* por medio de PCR anidada (*nested* PCR) con dos *sets* de *primers*. La técnica de PCR anidada consta de dos reacciones secuenciales, el producto obtenido en la primera reacción se usa como molde para la segunda reacción. En la primera amplificación se utilizaron los *primers* degenerados: *nifH* 19 (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') (Ueda *et al.*, 1995) y *nifH* 3 (5'-ATR TTR TTN GCN GCR TA-3') (Zani *et al.*, 2000). En la segunda amplificación se utilizaron los *primers* degenerados *nifH* 11 (5'-GAYCCNAARGCNGACTC-3') y *nifH* 22 (5'-ADWGCCATCATYTCRCC-3') (Yeager *et al.*, 2004). La primera reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL con 3 µL del sobrenadante del lisado y 12 µL de *master mix* con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X Thermo buffer, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 µM de cada primer, 1 mg/mL de BSA y 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Canadá Inc.). Como control negativo se omitió el ADN molde y como control positivo se utilizó ADN de cuatro cepas: *Herbaspirillum hiltneri*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Brevundimonas* sp., que presentaron actividad nitrogenasa (medida como reducción de acetileno) (Montañez *et al.*, 2009). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguido por 20 ciclos de: 45 seg a 94 ° C, 1 min a 48 ° C y 1 min a 72 °C. Se incorporó una extensión final a 72 °C por 10 min. Los

productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p:v). Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V por 30 min en TBE 0.5X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador con luz UV.

Con los aislamientos que dieron positiva la primera amplificación se realizó una segunda amplificación utilizando los *primers* NifH 11 y NifH 22. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL con 3 µL de diluciones 1/10 o 1/20 del producto de la primera PCR y 22 µL de *master mix* con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X Thermo buffer, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.8 µM de cada *primer*, 1 mg/mL de BSA y 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Canadá Inc.). Se realizaron los mismos controles que en la primera PCR. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguido por 35 ciclos de: 45 seg a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p:v). Las condiciones de la electroforesis y visualización de los geles fueron las mismas anteriormente descritas.

Amplified 16S rDNA restriction analysis (ARDRA)

Para caracterizar e identificar las cepas *nifH* positivas se amplificó el gen que codifica la subunidad 16S del RNA ribosomal utilizando los *primers* 41f (5'-GCTCAGATTGAACGCTGGCG-3') y 1488r (5'-CGG TTA CCTTGT TAC GAC TTC ACC-3') (Herrera- Cervera *et al.*, 1999). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, con 3 µL de lisado y 22 µL de *master mix*, con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X de Thermo Buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.2 µM de cada *primer*, 1 mg/mL de BSA y 1 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas, Canada Inc.). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguido por 35 ciclos de: 95°C 30 seg, 57°C 1 min y 72°C 1 min. Se incorporó una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de amplificación, fragmentos de aproximadamente de 1500 pb, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p:v). Las condiciones de la electroforesis y visualización de los geles fueron las anteriormente descritas.

Los fragmentos amplificados del gen 16S rDNA de cada cepa fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción *MspI* y *HhaI* según recomendaciones del fabricante (Fermentas, Canadá Inc.). Las digestiones se realizaron con 15 µL del producto de amplificación, *buffer* Tango 1X y 2U de cada enzima. La mezcla se incubó a 37°C por 5 h. Los fragmentos de restricción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las condiciones de la electroforesis fueron 100 V por 3 h en solución TBE 0.5 X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador con luz UV.

Secuenciación del 16S rDNA

Para la secuenciación del gen 16S rDNA se eligieron representantes de cada perfil de restricción del 16S rDNA, se seleccionaron aislamientos obtenidos de ambas variedades de maíz, tanto endófitos como rizosféricos. Los productos de amplificación del 16S rDNA fueron purificados utilizando el Kit PCR Clean up (Axygen). El ADN purificado se cuantificó mediante comparación visual con los fragmentos del marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas, Canadá) en gel de agarosa 1% (p:v). El ADN purificado se secuenció en MacroGen (Corea) (<http://MacroGen.com>) utilizando el primer 41F.

Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas (entre 750-800 pb) fueron alineadas y comparadas con secuencias de bacterias relacionadas disponibles en las bases de datos. Se utilizó BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) para el alineamiento de las secuencias y búsqueda de secuencias similares. Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron depositadas en el GenBank bajo el número de acceso JF518981- JF518999.

rep-PCR (Amplificación de elementos Repetitivos Extragénicos Palindrómicos)

Para analizar la diversidad a nivel de cepas de los aislamientos *nifH* positivos, se empleó la técnica de rep-PCR utilizando como *primer* la secuencia repetida (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Versalovic *et al.*, 1994). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL con 2 µL de lisado y 23 µL de *master mix*, con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X Thermo Buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.5 µM del primer, 2 mg/mL de BSA y 1.5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas, Canadá Inc.). El programa de

amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguido por 35 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 38°C y 2 min a 72°C. Se incorporó una extensión final a 72°C por 15 min. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Las condiciones de la electroforesis fueron 75 V por 5 h en solución TBE 0.5 X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador con luz UV.

II.2.3. Características promotoras del crecimiento vegetal

Además de la presencia del gen *nifH* y de la capacidad de crecer en medio semisólido sin N combinado, los aislamientos fueron caracterizados por la capacidad de solubilizar fosfatos, producir ácido indol acético (AIA) y de antagonizar al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum in vitro*. Para evaluar las características antes mencionadas, del total de los aislamientos obtenidos se seleccionaron 73 cepas distintas que presentaron perfil de GTG-PCR diferente.

Solubilización de fosfatos

Para la detección de la capacidad solubilizadora de fosfatos se sembró cada uno de los 73 aislamientos en medio sólido NB-RIP con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo: glucosa 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g; KCl 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g; 1.5% agar (Nautiyal, 1999). Se inocularon 20 μL de un cultivo puro crecido en medio TY líquido hasta 10^9 cel.mL⁻¹ en la superficie del medio de cultivo. Luego de 8 días de incubación a 28°C se midió el halo de solubilización y el diámetro de las colonias de cada cepa y se calculó el índice de solubilización $\text{IS} = \text{A/B}$, donde A es el diámetro de la colonia + el halo y B es el diámetro de la colonia (Kumar y Narula, 1999).

Producción de ácido indol acético

Para analizar la producción de AIA se utilizó el método de Salkowsky según lo descrito por Bent *et al.*, (2001). Cada una de las 73 cepas fue crecida durante 48 hs con agitación en tubos con 3 mL de medio TY líquido suplementado con 2 mg.mL⁻¹ de triptofano. A 1 mL de cultivo se le agregó 1 mL del reactivo de Salkowsky (50 mL 35% HClO_4 + 1 mL FeCl_3) (Loper y Schroth, 1986), se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min,

se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 530 nm. La producción de AIA se calculó a partir de una curva de calibración con cantidades conocidas de AIA (10 a 200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$).

Inhibición de *Fusarium oxysporum* in vitro

Se evaluaron 8 cepas de bacterias diazotrofas seleccionadas como potenciales promotoras del crecimiento vegetal por las características anteriormente estudiadas. El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (cedido por el Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía) fue repicado en placas de medio potato dextrosa agar (PDA) que se incubaron a 23°C durante 7 días.

Para determinar la capacidad de controlar o inhibir el crecimiento del hongo se utilizó la técnica de cultivos duales. En el centro de una placa de medio PDA se colocó un disco de agar cubierto por micelio de *Fusarium oxysporum* y se realizó una estría con el cultivo bacteriano a cada lado, con una separación de 2 cm del disco. Se realizaron 3 repeticiones por cada cepa bacteriana. Como control se utilizaron placas de PDA con discos de *Fusarium oxysporum*. Las placas fueron incubadas a 23°C durante 10 días. Luego de la incubación se midió el diámetro de las colonias fúngicas desarrolladas en los controles y en las placas con cultivos duales. Se calculó el porcentaje de inhibición: $(R-r)/R \times 100$ donde R es el diámetro de la colonia del control y r es el diámetro de la colonia en presencia de la bacteria (Idris *et al.*, 2007)

II.3. RESULTADOS

II.3.1. Aislamiento de bacterias diazotrofas asociadas a maíz

A partir de trozos de raíz y tallo desinfectados superficialmente, y diluciones de suelo rizosférico de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871, sembradas en los medios semisólidos JMV, LGI y jNFb, se obtuvieron 257 aislamientos. Las colonias fueron caracterizadas morfológicamente en placas con medio TY sólido. Se observó predominio de colonias blancas cremosas, colonias blancas planas y colonias que difunden un pigmento amarillo (Fig. 1 y 2).

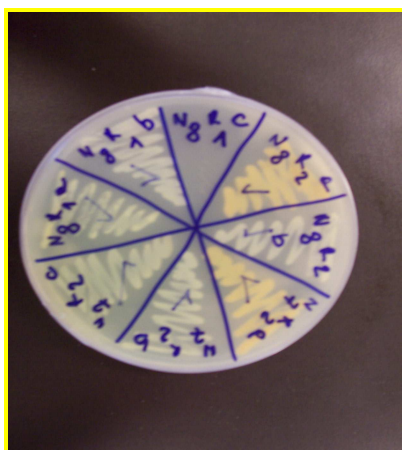


Figura 1: Aislamientos obtenidos de raíces de plantas de maíz, crecidos en medio TY.

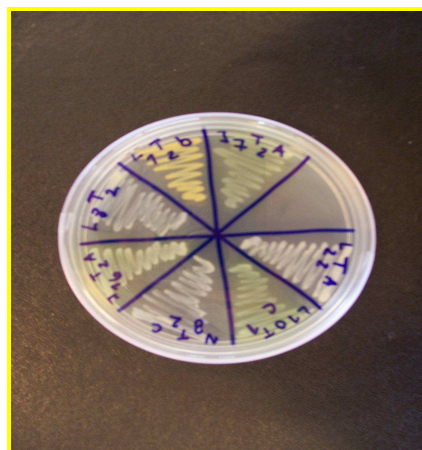


Figura 2: Aislamientos obtenidos de tallos de plantas de maíz, crecidos en medio TY.

Para confirmar el potencial carácter de diazotrofos de los aislamientos obtenidos se utilizó la amplificación del gen *nifH*. La reacción de *nested* PCR permitió la amplificación de un fragmento del gen *nifH* obteniéndose luego de la segunda reacción de PCR una única banda de 360 pb (Fig. 3). Se confirmó la presencia del gen *nifH* en el 41% de los 257 aislamientos analizados. Se generó una colección de 106 aislamientos capaces de crecer en medio sin N combinado y de amplificar el gen *nifH*.

Cuando se analizó el número de aislamientos según el origen (Fig. 4), se observó que el mayor número de aislamientos (64%) se obtuvo de plantas de la variedad NK940. En relación al sitio de donde se aislaron, la colección está integrada principalmente por aislamientos de raíz (45%), seguida por los de suelo rizósferico (33%) y tallo (22%). El número de aislamientos obtenidos de plantas sin fertilizar (N0) fue similar al obtenido de plantas fertilizadas con N40 o N80 (Fig. 4). Se obtuvieron aislamientos en los 3 medios de cultivo utilizados, el mayor porcentaje se obtuvo en el medio jNFb (dato no mostrado).

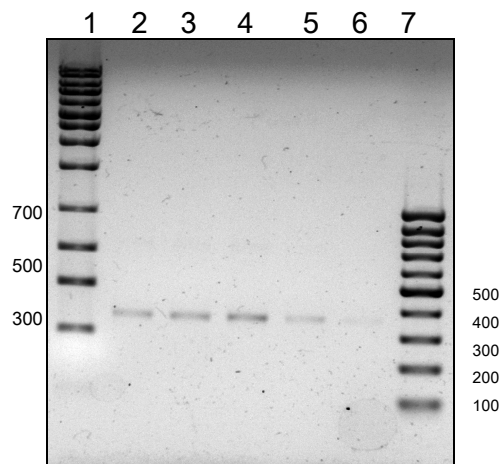


Figura 3: Amplificación del gen *nifH* con los *primers* nifH11 y nifH22. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb (Axygen); carril 2-6 aislamientos de raíces de la variedad NK940; carril 7: marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas)

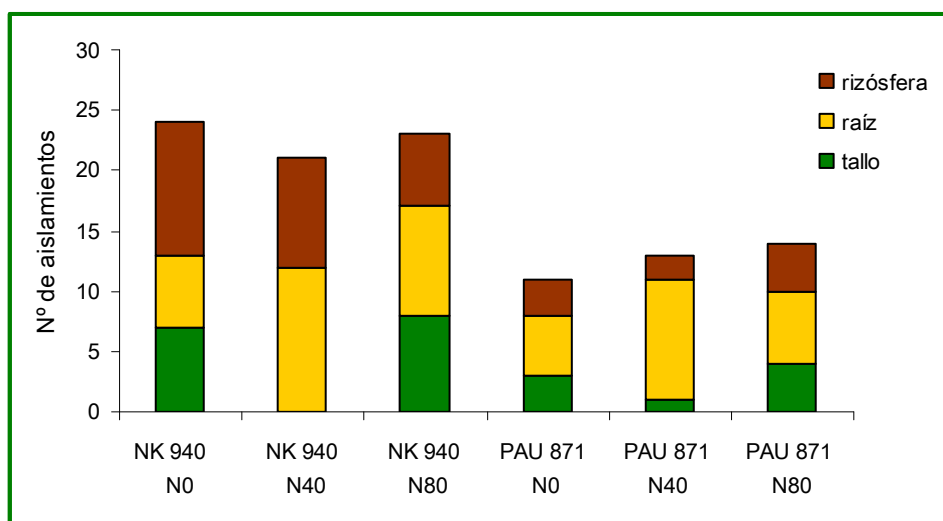


Figura 4: Número de aislamientos diazotrofos obtenidas de raíz, tallo y rizósfera de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas sin nitrógeno (N0) y con el equivalente a 40 y 80 Kg N/ha (N40 y N80).

II.3.2. Caracterización genética de los diazotrofos

Con el propósito de conocer la diversidad de género/especie de los aislamientos se aplicó la técnica de ARDRA, la que evidenció una población poco diversa, ya que sólo se diferenciaron 6 perfiles de restricción entre los 106 aislamientos analizados (cuadro 1). Se obtuvieron aislamientos con perfiles de restricción II, III y IV de plantas de ambas variedades de maíz, tanto endófitos como rizosféricos. Se detectó una población mayoritaria representada por aislamientos con perfil de restricción II y III (44 % y 33 %, respectivamente).

Los aislamientos que presentaron perfil I fueron obtenidos de raíces de plantas de las dos variedades analizadas, mientras que los aislamientos con perfil V no presentaron un patrón de distribución ya que se obtuvieron de raíz de una planta de la variedad NK940 y de rizósfera de una planta de la variedad PAU871. Sólo se obtuvo un aislamiento con perfil de restricción VI (cuadro 1).

Cuadro 1: Número de aislamientos según perfil ARDRA. Las bacterias se obtuvieron de tallo, raíz o rizósfera de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871.

Variedad/origen	N° de aislamientos según perfil ARDRA					
	Perfil I	Perfil II	Perfil III	Perfil IV	Perfil V	Perfil VI
NK 940- tallo	0	5	6	4	0	0
PAU 871 tallo	0	1	5	2	0	1
NK 940 raíz	4	17	4	1	1	0
PAU 871 raíz	4	7	6	2	0	0
NK 940 rizósfera	0	16	9	1	0	0
PAU 871 rizósfera	0	1	5	1	2	0
TOTAL	8	47	35	11	3	1

Para la identificación de género/especie de los aislamientos se utilizó la secuenciación parcial del gen 16S rDNA. Se seleccionaron un total de 20 aislamientos obtenidos de ambas variedades de maíz, de suelo rizosférico, raíz y tallo, que representan los 6 perfiles de restricción encontrados (cuadro 2).

Todos los aislamientos pertenecieron al phylum Proteobacteria con representantes de los subgrupos α , β , γ . El subgrupo γ -proteobacteria fue el más abundante ya que todos los aislamientos secuenciados con perfil de restricción I y II fueron identificados como *Enterobacter* y los de perfil III como *Pseudomonas* (cuadro 2). En ambos géneros no fue posible la identificación a nivel de especie, los aislamientos 24R, 43R y 59T del género *Enterobacter* presentaron 100% de homología con *Enterobacter* sp. (HQ143573.1), 99% de similitud con las especies *E. ludwigii* (GQ380575.1) y *E. cloacae* (GU549440.1), mientras que el aislamiento 45R presentó 100% de homología con *E. ludwigii* cepa tipo EN-119T (AJ853891.1). Dentro del género *Pseudomonas*, los aislamientos 68T y 79S están relacionados a la especie *P. fluorescens* (HQ143617.1), mientras que la secuencia de los aislamientos 46R y 101S presentaron 100% de homología con las especies *P. putida*

(AM942549.1), *P. aurantiaca* (EU761590.1) y *P. fluorescens* (AM410631.1) y las secuencias de los aislamientos 9R y 92R mostraron 100% de homología con las especies *P. koreensis* (HQ589332.1) y *P. putida* (HM462432.1).

Cuadro 2: Identificación de los aislamientos mediante secuenciación parcial del 16S rDNA

Cepa ^a	Perfil ARDRA ^b	Número acceso	Género/especie relacionada ^c (Nº de acceso en Genbank)	% similitud
12R	I	JF518988	} <i>Enterobacter</i> sp. (HQ677832.1)	100
28R	I	JF518990		99
45R	II	JF518992	} <i>Enterobacter ludwigii</i> (AJ853891.1)	100
24R,	II	JF518989		100
43R,	II	JF518991	} <i>Enterobacter</i> sp. (HQ143573.1)	100
59T	II	JF518983		100
68T,	III	JF518984	} <i>Pseudomonas</i> sp. (HQ727969.1)	100
79S	III	JF518995		
70T	III	JF518985	} <i>Pseudomonas putida</i> (CP002290.1)	100
9R,	III	JF518986		100
92S	III	JF518996	<i>Pseudomonas</i> sp. (HQ231959.1)	
46R,	III	JF518993	} <i>Pseudomonas putida</i> (AM942549.1), <i>Pseudomonas aurantiaca</i> (EU761590.1) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (AM410631.1)	100
101S	III	JF518999		100
				100
10R	IV		} <i>Raoultella terrigena</i> (AY292873.1)	100
72S,	IV	JF518994		99
50T	IV	JF518981	<i>Raoultella terrigena</i> (AY292873.1)	99
97S	IV	JF518997	<i>Klebsiella terrigena</i> (Y17670.1)	100
19R	V	JF518987	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (HQ113220.1)	99
99S	V	JF518998	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (CP002287.1)	99
55T	VI	JF518982	<i>Ochrobactrum</i> sp. (GU564353.1)	99

^a cepas de distinto origen: R, raíz; S, suelo rizosférico, T: tallo. ^b perfil asignado según restricción del 16S rDNA con las enzimas *MspI* y *Hha I*. ^c BLAST 16S rDNA

Los 4 aislamientos secuenciados con perfil IV presentaron 99-100% homología con la especie *Klebsiella terrigena* (formalmente *Raoultella terrigena*) (cuadro 2). Los aislamientos 19R y 99S que presentaron perfil V mostraron 99% de similitud en su secuencia del 16S rDNA con la especie *Achromobacter xylosoxidans* (cuadro 2). El aislamiento 55T (perfil V) presentó 99% de similitud con *Ochrobactrum sp.* (GU564353.1), las especies *O. anthropi* y *O. tritici* fueron las más cercanas.

La técnica de GTG-PCR produjo perfiles complejos con múltiples bandas que van desde los 2500 pb hasta los 500 pb aproximadamente. Esta técnica demostró diversidad intra especie; diferenciándose 18 perfiles entre los aislamientos de tallo, 36 entre los de raíz y 22 entre los de rizósfera (cuadro 3). El porcentaje de cepas distintas fue mayor entre los aislamientos obtenidos de raíz y tallo en relación a los obtenidos de suelo rizosférico (cuadro 3).

Cuadro 3: Perfiles de GTG-PCR entre los aislamientos obtenidos de suelo rizosférico, tallo y raíz de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871.

Variedad/origen	N° de aislamientos obtenidos	N° de perfiles GTG-PCR	% de cepas distintas
NK940 tallo	15	11	73
PAU871 tallo	8	7	86
NK940 raíz	27	19	70
PAU871 raíz	21	17	81
NK940 suelo	26	16	62
PAU871 suelo	9	6	66

Esta técnica permitió detectar aislamientos con idéntico perfil obtenidos de zonas diferentes de las plantas de maíz, es decir la misma cepa aislada de muestras de rizósfera, raíz y tallo de la misma planta (cuadro 4 y Fig. 5). Además, una cepa de la especie *Raoultella terrigena* fue aislada de plantas de ambas variedades de maíz (perfil A en cuadro 4 y Fig. 5). Por otro lado, se detectaron aislamientos de la misma cepa obtenidos de plantas de la misma variedad crecidas con diferentes dosis de N (perfiles E y F, cuadro 4).

Cuadro 4: Perfiles de GTG-PCR de aislamientos de diazotrofos obtenidos de suelo rizosférico, raíz y tallo de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 crecidas sin nitrógeno (N0) y con el equivalente a 40 y 80 Kg N/ha (N40 y N80).

GTG-PCR	Género/especie	Aislamientos (origen)		
Perfil A	<i>Raoultella terrigena</i>	50T (tallo NK N0)	72S (suelo NK N0)	97S (suelo PAU N0)
Perfil B	<i>Enterobacter sp.</i>	7R, 27R (raíz NK N80)	59T (tallo NK N80)	
Perfil C	<i>Pseudomonas sp.</i>	46R (raíz PAU N40)	65T (tallo PAU N40)	
Perfil D	<i>Pseudomonas sp.</i>	63T (tallo PAU N80)	101S (suelo PAU N80)	
Perfil E	<i>Enterobacter sp.</i>	13R,14R (raíz NK N40)	16R (raíz NK N80)	
Perfil F	<i>Enterobacter sp.</i>	11R (raíz NK N40)	15R (raíz NK N80)	

M 50T 72S 97S 7R 27R 59T 101S 63T 46R 65T

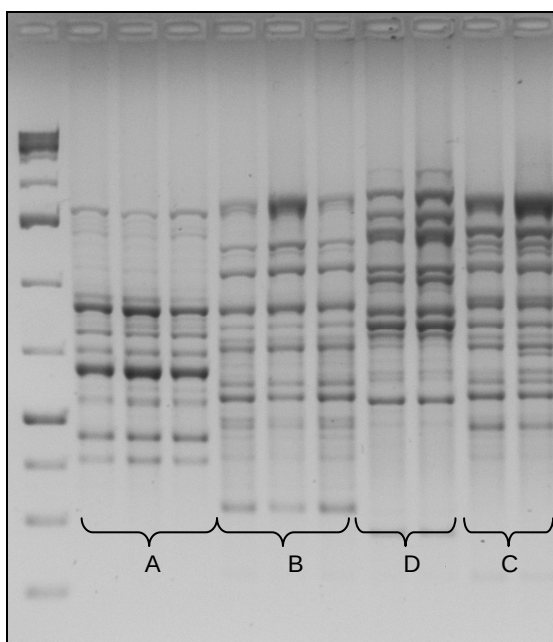


Figura 5- Perfiles A, B, C y D de GTG- PCR de diazotrofos aislados de raíz (R), tallo (T) y suelo rizosférico (S) de plantas de maíz. M: marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas), carriles 2– 11: aislamientos de distintos orígenes (ver cuadro 4).

II.3.3. Características promotoras del crecimiento vegetal

Para determinar características relacionadas a la promoción del crecimiento vegetal, de los 106 aislamientos obtenidos se seleccionaron las 73 cepas que presentaron perfil de GTG-PCR diferente. El 48% de estas cepas fueron aisladas de raíz, el 20.5% de tallo y el restante 31.5% de suelo rizosférico. Todos los aislamientos fueron capaces de crecer en medio semisólido sin N combinado.

Solubilización de fosfatos

Los aislamientos se agruparon según el índice de solubilización, estimado según el tamaño del halo formado en el medio NB-RIP con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. Se distinguieron 3 categorías: aislamientos capaces de crecer en el medio pero sin formación de halo de solubilización ($IS = 1$); aislamientos que presentaron halo entre 1-5 mm (IS entre 1-2) y aislamientos que presentaron halo de 5-10 mm ($IS \geq 2$) (Fig. 6).

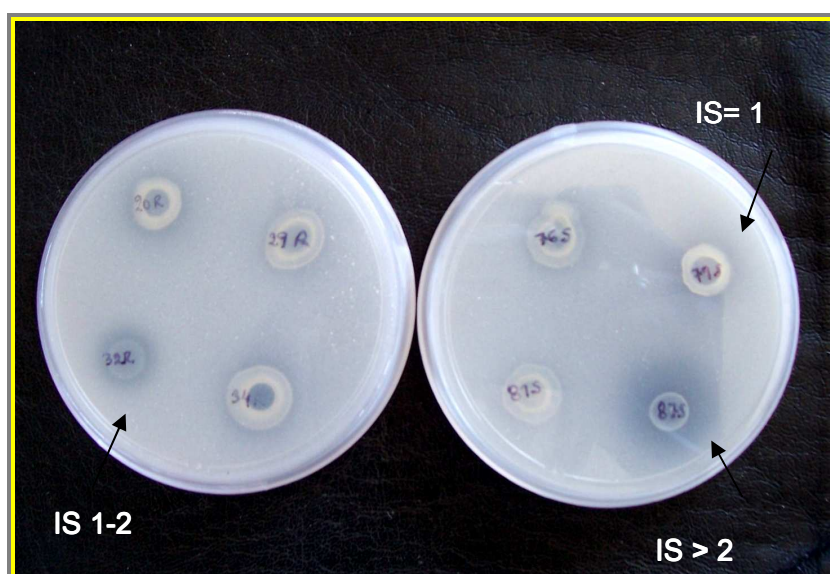
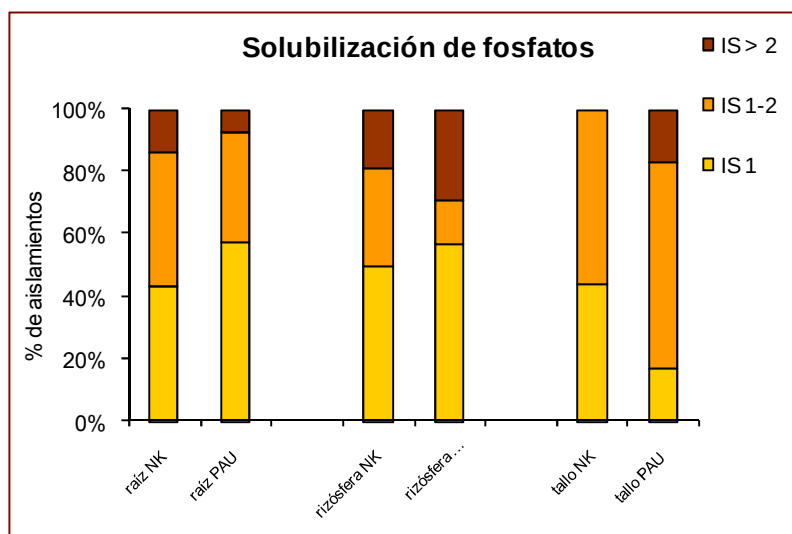


Figura 6: Aislamientos en medio NB-RIP con fosfato tricálcico como fuente de fósforo. Las flechas indican tres categorías según el índice de solubilización (IS).

La categorización de los aislamientos de acuerdo a la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico según el origen, es decir: raíz, tallo o suelo de la variedad NK 940 o PAU871, se muestra en la Fig. 7. Independientemente de la variedad y de la zona de la planta de donde

fueron obtenidos, la mayoría de los aislamientos presentaron IS=1 (46%), o IS entre 1-2 (40%), lo que demuestra nula o muy poca capacidad de solubilizar fosfato tricálcico. Solo 10 cepas (14% de los aislamientos) presentaron IS > 2, con mayor número de aislamientos obtenidos de suelo (Fig. 7). Estas cepas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Raoultella* y *Ochrobactrum*.



Producción de ácido indol acético

Para analizar la producción de AIA se utilizó el método de Salkowsky. Todos los aislamientos produjeron AIA en medio de cultivo TY suplementado con triptófano en cantidades que van desde 1.77 µg/mL hasta 185 µg/mL. Los aislamientos se agruparon en 3 categorías: I) producen < 7.5 µg/mL de AIA; II) producen entre 7.5 y 35 µg/mL de AIA; III) producen > 35 µg/mL de AIA. Se analizó la producción de AIA en los aislamientos obtenidos de raíz, tallo o rizósfera de plantas de ambas variedades de maíz (Fig. 8). Independientemente de la variedad de maíz y del sitio de donde fueron aislados (rizósfera, raíz y tallo), la mayoría de los aislamientos fueron capaces de producir alta concentración de AIA (categoría III), con excepción de los obtenidos de rizósfera de la variedad PAU871 donde predominaron aislamientos de la categoría I. Si comparamos ambas variedades, el porcentaje de aislamientos de la categoría III fue mayor dentro de los aislados de la variedad NK940 (Fig. 8).

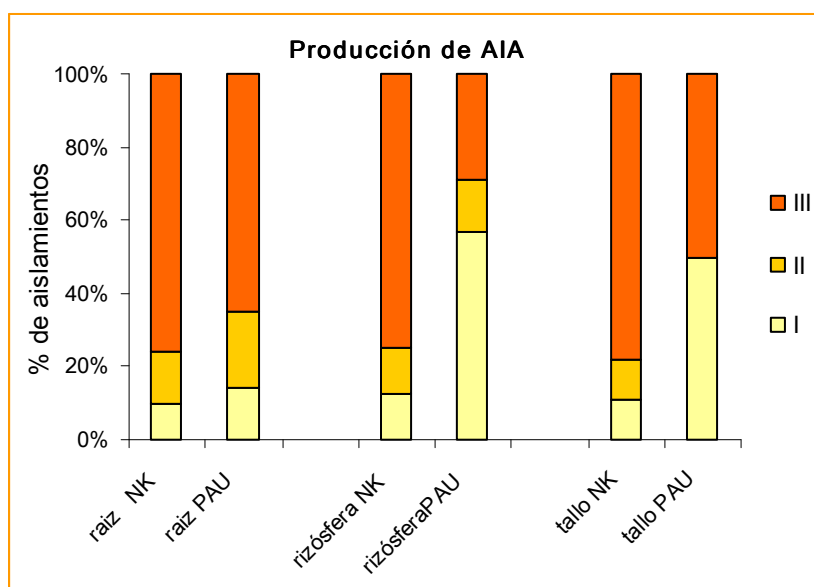


Figura 8: Porcentaje de aislamientos obtenidos de raíz, tallo o rizósfera de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 según la producción de ácido indol acético (AIA). Categoría I- <7.5 µg/mL de AIA; categoría II- entre 7.5 y 35 µg/mL de AIA; categoría III- > 35 µg/mL de AIA.

En general, la mayoría de los aislamientos afiliados al género *Pseudomonas* (según perfil de restricción del 16S rDNA), pertenecieron a la categoría I o II; mientras que la mayoría de los aislamientos de los géneros *Enterobacter*, *Raoultella*, *Achromobacter* y *Ochrobactrum* pertenecieron a la categoría III (dato no mostrado).

Inhibición de Fusarium oxysporum in vitro

Se evaluó la capacidad de 8 cepas diazotrofas, que presentaron alta producción de AIA y capacidad de solubilizar fosfatos, de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Las 8 cepas evaluadas inhibieron el crecimiento del hongo en cultivos duales en medio PDA. En los controles el micelio fúngico ocupó casi la totalidad de la placa al cabo de los 10 días de incubación, mientras que en presencia de las bacterias el tamaño de la colonia fúngica se redujo (Fig. 9). Los aislamientos fueron separados en tres categorías según el porcentaje de inhibición de *Fusarium*. Las cepas 50T (*Raoultella terrigena*), 70T y 79S (*Pseudomonas* sp.) provocaron 50% de inhibición en el crecimiento del hongo (categoría A); mientras que las

cepas 59T y 10R provocaron 33 y 40 % de inhibición respectivamente (categoría B), y las cepas 32R, 55T y 87S provocaron entre 20- 25% de inhibición (categoría C) (Fig. 9).

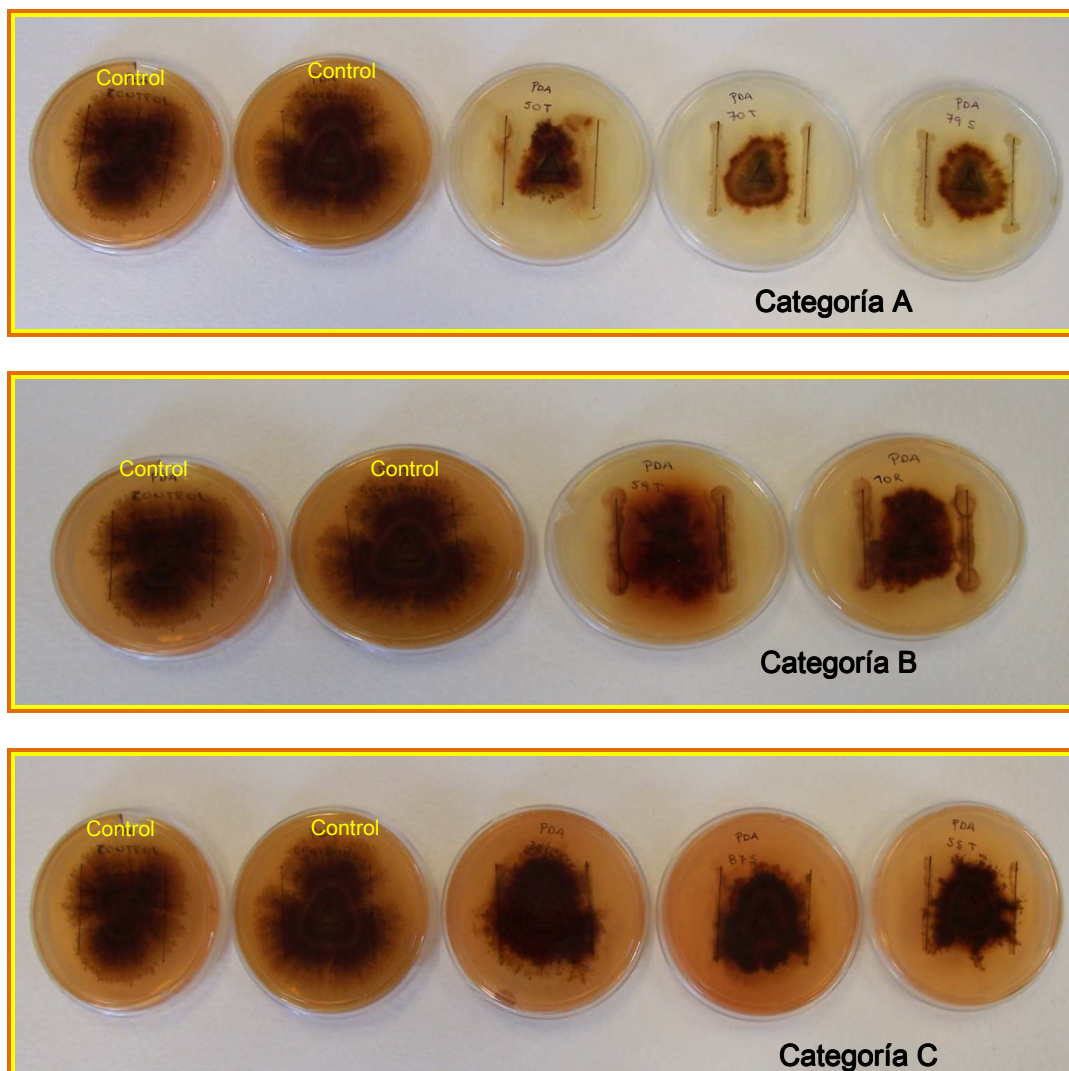


Figura 9: Placas de medio PDA con cultivos duales de *Fusarium oxysporum* y bacterias diazotrofas. Categoría A: 50% inhibición; categoría B: 30-40% inhibición y categoría C: entre 20-25% inhibición. Como controles se utilizaron cultivos de *Fusarium oxysporum* sin bacterias.

II.4. DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias diazotrofas asociadas a maíz

Desde el descubrimiento de los microorganismos diazotrofos endófitos se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de aislar e identificar los microorganismos que habitan los tejidos vegetales. En este trabajo, se aislaron 257 bacterias a partir de suelo rizosférico y raíz y tallo desinfectados superficialmente de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 en los medios de cultivo LGI, JMV y jNFb. Los medios de cultivo libres de nitrógeno combinado permiten el crecimiento de microorganismos diazotrofos, capaces de utilizar el N_2 atmosférico mediante la enzima nitrogenasa, responsable del proceso de fijación biológica de nitrógeno. Los microorganismos que se desarrollan en medios sin N combinado pueden utilizar trazas de N provenientes del agua o material vegetal sembrado; por lo que se hace imprescindible la utilización de otro método para confirmar la fijación de N_2 en los aislamientos obtenidos.

En esta tesis el método utilizado para confirmar el potencial carácter diazotrófico de los aislamientos consistió en la amplificación del gen *nifH* mediante una PCR anidada (*nested* PCR) que permite incrementar la sensibilidad y especificidad en la amplificación del DNA. Según Federov *et al.*, 2008 la amplificación con *primers* degenerados es el método más conveniente para detectar el carácter diazotrófico potencial de los microorganismos, aunque también se puede confirmar la capacidad de fijar N_2 por otros métodos como el ensayo de reducción del acetileno (ARA) (Hardy *et al.*, 1968). La detección de la actividad nitrogenasa mediante la técnica de ARA resulta en algunas ocasiones inefectiva y no concluyente, ya que un gran número de bacterias no expresan la enzima nitrogenasa en las condiciones en las que se realiza el test (Franche *et al.*, 2009).

Utilizando esta metodología se logró amplificar el gen *nifH* sólo en el 41% de los 257 aislamientos de diazotrofos obtenidos. Resultados similares fueron señalados en los trabajos de Chowdhury *et al.*, (2007); Islam *et al.*, (2010); Kuklinsky- Sobral *et al.*, (2004); Pariona-Llanos *et al.*, (2010) Yim *et al.*, (2008), quienes utilizaron distintos *primers* para amplificar el gen *nifH* en aislamientos obtenidos de diversas plantas y determinaron que menos del 50% de los aislamientos dieron positiva la amplificación. La ausencia de

amplificación del gen *nifH* en estos aislamientos capaces de crecer en repetidas ocasiones en medio sin N combinado, puede ser explicada por la variabilidad existente en este gen (Zehr *et al.*, 2003).

La colección de diazotrofos incluyó 106 bacterias aisladas de rizósfera, raíz y tallo de plantas de ambas variedades de maíz, que fueron capaces de crecer en medio sin nitrógeno y de amplificar el gen *nifH*. El número de aislamientos obtenidos de la variedad NK940 fue mayor que el obtenido de la variedad PAU871 (Fig. 4); este resultado podría estar relacionado al obtenido en el capítulo I donde el número de diazotrofos detectado mediante el NMP fue mayor en plantas de la variedad NK940. Resultados similares en relación al efecto del genotipo de la planta sobre la población de diazotrofos asociados a la planta fueron señalados por otros autores (Jha *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2003).

Caracterización genética e identificación de los diazotrofos

La diversidad de la comunidad de diazotrofos cultivables evaluada mediante la técnica de ARDRA demostró que las poblaciones aisladas de rizósfera, raíz o tallo de las plantas de estas variedades de maíz no poseen diferencias sustanciales, ya que se evidenció la existencia de dos perfiles de restricción dominantes presentes en aislamientos de todas las combinaciones variedad/zona de la planta. Los diazotrofos aislados e identificados en este capítulo pertenecen a las subdivisiones α , β , γ -proteobacteria, con dominancia de las γ -proteobacteria ya que la mayoría de los aislamientos fueron identificados dentro de los géneros *Enterobacter*, *Raoultella* y *Pseudomonas* (cuadro 2). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Berge *et al.* (1991), que evidenciaron que *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella terrigena* (formalmente *Raoultella terrigena*), y *Pseudomonas* sp. fueron los diazotrofos más abundantes en la rizósfera de plantas de maíz. En el presente trabajo, cepas de estos tres géneros fueron aisladas de suelo rizosférico y del interior de raíces o tallos de las plantas de maíz de ambas variedades con y sin fertilización nitrogenada. Los resultados obtenidos en este capítulo coinciden con los obtenidos en el capítulo I, donde mediante la técnica de T-RFLP se detectaron dos fragmentos terminales marcados (T-RFs) dominantes dentro de las comunidades de diazotrofos de suelo rizosférico y endófitas de

raíces. Estos T-RFs coinciden con los T-RFs de cultivos puros de aislamientos de *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. obtenidos en esta etapa del trabajo.

Esto indicaría que tanto por métodos dependientes como independiente del cultivo, en las condiciones en las que se realizó este estudio, las poblaciones dominantes asociadas a estas variedades de maíz están constituidas por bacterias de los géneros *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. Estos resultados difieren de los obtenidos por Roesch *et al.*, (2008), que analizaron la diversidad de bacterias diazotrofas asociadas a maíz y encontraron que la subdivisión α -proteobacteria fue la más abundante en suelo rizosférico, raíz y tallo. Resultados similares fueron obtenidos por Chelius y Triplett, (2001) que analizaron mediante métodos independientes del cultivo las poblaciones de Bacterias y Archaeas, rizosféricas y endófitas de raíces de plantas de maíz, y evidenciaron la dominancia de secuencias de la subdivisión α -proteobacteria.

En el capítulo I, mediante la técnica de T-RFLP, se evidenció la presencia de otros T-RFs menos abundantes asociados a estas variedades de maíz, sin embargo no se logró aislar a estos diazotrofos debido, probablemente, a su baja proporción dentro de la comunidad. Estudios de poblaciones cultivables sugieren que las γ -proteobacteria de crecimiento rápido compiten con las α -proteobacteria de crecimiento más lento (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006), dentro de este grupo encontramos otros diazotrofos frecuentemente detectados en plantas de maíz como *Azospirillum* y rizobios, que no fueron aislados en este trabajo. Además de estar presentes en baja densidad, podría tratarse de diazotrofos para los cuales no conocemos las condiciones nutricionales o ambientales que permiten su aislamiento. Las técnicas independientes del cultivo han demostrado que sólo es posible el aislamiento de un porcentaje muy bajo de los microorganismos de una muestra ambiental (Chelius y Triplett, 2001). A pesar de que existe gran diversidad de géneros y especies de diazotrofos en la rizósfera y en los tejidos internos de plantas de maíz, sólo unos pocos géneros son dominantes (Roesch *et al.*, 2008).

Dentro de la familia Enterobacterias, los géneros *Pantoea* (Merbach *et al.*, 1998), *Enterobacter* (Kämpfer *et al.*, 2005), *Serratia* (Prasad *et al.*, 2001) y *Klebsiella* (Chelius y Triplett, 2000), han sido consideradas como microorganismos PGPB. Las bacterias del

género *Enterobacter* han sido señaladas como microorganismos comúnmente encontrados en la rizósfera (Chelius y Triplett, 2000) y en el interior de plantas de maíz (McInroy y Kloepper, 1995) y otras gramíneas (Tan *et al.*, 2009). En esta tesis se aislaron diazotrofos tanto de la rizósfera como de raíz y tallo de plantas de maíz que están afiliados al género *Enterobacter* y que presentan elevada homología en su secuencia del 16S rDNA con la especie *E. cloacae* y *E. ludwigii*. Esta última especie fue descrita por Hoffmann *et al.*, (2005) ya que en los estudios filogenéticos formó un *cluster* separado de las especies que componen el complejo *E. cloacae*. Existen trabajos en los que se señala a esta especie como PGPB, Shoebitz *et al.*, (2008) aislaron y caracterizaron una cepa diazotrofa de la especie *E. ludwigii* capaz de producir AIA, solubilizar fosfato tricálcico, inhibir al hongo *Fusarium solani* y promover el desarrollo radicular de plantas de *Lolium perenne*, mientras que Gopalakrishnan *et al.*, (2010) aislaron de plantas de arroz una cepa de *E. ludwigii* capaz de producir AIA, solubilizar fosfato tricálcico, inhibir al hongo *Macrophomina phaseolina* y promover el desarrollo radicular de plantas de sorgo.

En esta tesis mediante la técnica de GTG-PCR se detectaron los mismos perfiles en aislamientos del género *Enterobacter* obtenidos de raíz y tallo de las plantas de maíz (cuadro 4 y Fig.5), lo que evidenciaría que tienen la capacidad de colonizar ambas zonas de la planta. Esta técnica permitió, por otra parte, demostrar que para determinadas cepas del género *Enterobacter* la fertilización nitrogenada no afectó la presencia en los tejidos vegetales, ya que la misma cepa fue aislada de plantas fertilizadas con distintas dosis de N (cuadro 4).

Tanto de suelo rizosférico como de raíz y tallo de plantas de maíz se aislaron cepas de la especie *Raoultella terrigena* (cuadro 1 y 4). La taxonomía del género *Klebsiella* ha sido revisada mediante comparación de las secuencias de los genes 16S rRNA y *rpoB* de 9 especies de *Klebsiella* y 20 especies de 11 géneros dentro la familia Enterobacteriaceae (Drancourt *et al.*, 2001). Los resultados llevaron a la división del género *Klebsiella* en dos géneros independientes: *Klebsiella* y *Raoultella*. Según esta reclasificación las especies *K. planticola*, *K. terrigena* y *K. ornithinolytica* fueron transferidas al nuevo género *Raoultella*.

Según Chelius y Triplett (2000a), el maíz es un hábitat propicio para el desarrollo de *K. pneumoniae* y esta especie es capaz de inducir la síntesis de la enzima nitrogenasa en la planta. Dentro de las especies del género *Raoultella* se han aislado bacterias fijadoras de N₂ en asociación con vegetales; *R. terrigena* fue aislada de la gramínea *Dactylis glomerata* (Zlotnikova *et al.*, 2007), *K. planticola* ha sido aislada de plantas de arroz (Ladha *et al.*, 1983) y *R. oxytoca* de tallos de remolacha (Adachi *et al.*, 2002). Roesch *et al.*, (2008) demostraron, mediante métodos independientes del cultivo, la presencia de bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* en raíces y tallos de plantas de maíz; sin embargo, la presencia de estas bacterias entéricas fue rara en el suelo rizosférico.

Los resultados obtenidos de la caracterización genética mostraron cepas de *R. terrigena* capaces de sobrevivir en suelo y de colonizar raíces y tallos de las plantas de maíz (cuadro 1 y Fig. 5). Los resultados de este trabajo concuerdan con los de Berge *et al.* (1991), que determinaron que la especie *Klebsiella terrigena*, es una de las especies de diazotrofos mas abundante en suelo arenoso donde crecían plantas de maíz. La diferencia observada entre los resultados de Roesch *et al.*, (2008) con los obtenidos en este trabajo y los de Berge *et al.* (1991) podría explicarse, probablemente, a que la sobrevivencia de cepas de *Raoultella terrigena* en suelo está relacionada con factores abióticos, como el tipo de suelo en el que se efectuaron los estudios y las condiciones ambientales, y con factores bióticos como la variedad de maíz.

Las bacterias del género *Pseudomonas* representan un amplio grupo de especies que juegan un rol importante en los ecosistemas agrícolas; especialmente en la supresión de enfermedades en varios cultivos (Lemanceau y Alabouvette, 1991; Quagliotto *et al.*, 2009; Rosas *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2002), y como promotoras del crecimiento vegetal (Hall *et al.*, 1996; Rovera *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2003). En este trabajo se aislaron cepas afiliadas al género *Pseudomonas* con capacidad de fijar N₂ tanto de la rizósfera de plantas de maíz como del interior de raíces y tallos desinfectados superficialmente, lo que indicaría la presencia de estas bacterias como endófitas. La fijación de nitrógeno en *Pseudomonas* en asociación con plantas es más común de lo que inicialmente se pensaba. La presencia de genes *nif* y la regulación de la síntesis y actividad de la enzima nitrogenasa en

Pseudomonas stutzeri fue caracterizada por Desnoues *et al.*, (2003) y el genoma completo por Yan *et al.*, (2008). *Pseudomonas* sp. han sido reportadas por otros autores como fijadoras de N₂ tanto en suelo como endófitas de varios cultivos (Jha *et al.*, 2009; Montañez *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Prakamhang *et al.*, 2009; Yim *et al.*, 2009). Incluso Vermeiren *et al.*, (1998) evidenciaron la expresión del gen *nifH* en raíces de plantas de arroz utilizando una construcción *nifH gusA* en *Pseudomonas stutzeri*.

A pesar que la subdivisión α -proteobacteria ha sido destacada como la más abundante en asociación con las plantas de maíz, dentro de esta subdivisión sólo logramos aislar una cepa del género *Ochrobactrum*. El aislamiento 55T presentó homología con las especies *O. anthropi* y *O. tritici*. La mayoría de los aislamientos de la especie *O. anthropi* han sido obtenidos de muestras clínicas, particularmente de personas inmunodeprimidas, aunque también se han aislado cepas de suelo y raíces de diferentes plantas (Aguillera *et al.*, 1993; McInroy y Kloepper, 1994; Sato y Jiang, 1996), mientras que la especie *O. tritici* fue descrita en aislamientos de suelo y raíces de trigo por Lebuhn *et al.*, (2000). En base a la secuencia del 16S rDNA la heterogeneidad entre las especies *O. tritici* y *O. anthropi* no es significativa (Lebuhn *et al.*, 2000), por lo que no fue posible identificar el aislamiento 55T a nivel de especie. Especies de este género han sido señaladas como fijadoras de N₂ (Islam *et al.*, 2010); además se han reportado especies con capacidad de nodular las leguminosas *Lupinus albus* (Trujillo *et al.*, 2005) y *Acacia mangium* (Ngom *et al.*, 2004).

Dentro de la subdivisión β -proteobacteria se aislaron dos cepas afiliadas a la especie *Achromobacter xylosoxidans*, una de suelo rizosférico de la variedad PAU871 y otra de raíz de la variedad NK940. Dentro de esta especie, Ma *et al.*, (2009) encontraron una cepa aislada de suelo con características promotoras del crecimiento vegetal. Además, se ha informado en esta especie la habilidad de fijar N₂ y de asociarse con los vegetales: Benata *et al.*, (2008) señalaron la capacidad de una cepa de nodular la leguminosa *Prosopis juliflora* y más recientemente, Jha y Jumar (2009), demostraron la capacidad de una cepa diazotrofa de colonizar internamente los tejidos y de promover el crecimiento vegetal en plantas de

trigo. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el primer reporte de cepas de *Achromobacter xylosoxidans* diazotrofas asociadas a plantas de maíz.

Características promotoras del crecimiento vegetal

Producción de ácido indol acético

Una bacteria PGPB puede poseer más de un mecanismo por el cual promueva el crecimiento vegetal; por ese motivo, en este trabajo además de determinar la capacidad de fijar N₂ de los aislamientos se determinó la capacidad de solubilizar fosfatos, producir AIA y de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro*.

El AIA es una auxina que interviene en múltiples funciones celulares (Baca y Elmerich 2007). Una fuente exógena de AIA produce en la planta cambios en la morfología del sistema radical e influye en la absorción de nutrientes (San Francisco *et al.*, 2005). Resultados de varias investigaciones demuestran que la producción de fitohormonas por los microorganismos promueve el crecimiento vegetal (Ryu *et al.*, 2006), lo cual también se ha observado entre los diazotrofos (Dobbelaere *et al.*, 2003; Roesch *et al.*, 2007). En este trabajo se determinó la producción de AIA en las bacterias diazotrofas aisladas de maíz como una característica asociada a la promoción del crecimiento vegetal. Todos los aislamientos produjeron AIA en medio de cultivo suplementado con triptófano en cantidades que van desde 1.77 µg.mL⁻¹ hasta 185 µg.mL⁻¹. El AIA es un metabolito que es sintetizado a partir de triptofano por varias vías enzimáticas, además puede ser sintetizado por otras rutas independientes de triptofano (especialmente en plantas superiores) (Baca y Elmerich, 2007). Los primeros trabajos en *Azospirillum brasilense* mostraban que esta bacteria producía menos de 2 µg.mL⁻¹ de AIA en medio de cultivo sin N combinado, pero producía 24 µg.mL⁻¹ de AIA en medio con NH₄ suplementado con triptofano (Tien *et al.*, 1979).

La producción de AIA es común entre las bacterias de la rizósfera e incluso entre las endófitas, lo cual fue observado entre las cepas evaluadas en esta tesis. Roesch *et al.*, (2007) determinaron niveles de 3.5 hasta 246 µg AIA.mg⁻¹ de proteína en aislamientos de *Azospirillum*, Ahmad *et al.*, (2008) señalaron niveles de 2.1 y 3.6 mg.L⁻¹ para especies de *Azotobacter* y *Pseudomonas*; mientras que Yim *et al.* (2009) determinaron entre 4.3 y 10

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA para *Pseudomonas sp.* Las cepas de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Raoultella* aisladas en este trabajo presentaron niveles variables de AIA (entre $1.77 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $185 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dentro de los aislamientos del género *Pseudomonas* se observó gran variabilidad en los niveles de AIA, la mayoría de los aislamientos presentaron niveles bajos ($< 7.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y pocas cepas presentaron niveles altos de AIA ($> 35 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La producción de AIA depende de la especie bacteriana, de las cepas, así como de las condiciones de cultivo, incluyendo la presencia/ausencia de triptofano, nivel de O_2 , pH, y fase de crecimiento (Crozier *et al.*, 1988). Cantidades bajas de AIA producidos por las bacterias promueve la elongación de la raíz primaria mientras que cantidades elevadas aumentan la formación de raíces laterales y adventicias pero inhiben el crecimiento de la raíz primaria (Xie *et al.*, 1996).

Solubilización de fosfatos

A pesar de que normalmente los suelos poseen cantidades suficientes de P, éste es uno de los elementos que limita el crecimiento vegetal ya que mayormente se encuentra en forma insoluble, no disponible para los vegetales (Rodríguez y Fraga 1999). En este contexto, la solubilización de fosfatos por los microorganismos del suelo constituye un importante mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. Los microorganismos capaces de producir un halo o zona clara alrededor de sus colonias en medio de cultivo con una fuente de fosfato insoluble son seleccionados como potenciales solubilizadores. En este trabajo se evaluaron 73 bacterias diazotrofas y se determinó que 10 de ellas fueron capaces de producir un halo alrededor de sus colonias. Estas 10 cepas se aislaron de rizósfera, raíz y tallo de plantas de maíz y pertenecen a distintos géneros (*Enterobacter*, *Raoultella*, *Pseudomonas* y *Ochrobactrum*). Bacterias solubilizadoras de fosfatos dentro de la familia Enterobacterias y del género *Pseudomonas* han sido aisladas de rizósfera y suelo por varios autores (Chung *et al.*, 2005; Collavino *et al.*, 2010; Remus *et al.*, 2000; Vassilev *et al.*, 1997).

En futuras investigaciones sería interesante determinar si la capacidad de solubilizar fosfatos de estas bacterias observada *in vitro* se correlaciona con el contenido de P en los tejidos de las plantas de maíz inoculadas creciendo en suelo con baja disponibilidad de P soluble.

Inhibición de Fusarium in vitro

Fusarium es uno de los géneros de hongos fitopatógenos más comunes en el cultivo de maíz que produce importantes pérdidas económicas. En este trabajo se evaluó la capacidad de 8 cepas diazotrofas, que presentaron alta producción de AIA y capacidad de solubilizar fosfatos, de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Tres de las 8 cepas estudiadas, dos afiliadas al género *Pseudomonas* y una a la especie *Raoultella terrigena*, fueron capaces de inhibir 50% el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en cultivos duales en medio PDA (Fig. 9). *Pseudomonas fluorescens* ha sido señalada como bacteria capaz de controlar a *Fusarium verticillioides* tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* en plantas de maíz (Hernandez-Rodríguez *et al.*, 2008). El biocontrol ejercido por estas bacterias puede ser causado por competencia por nutrientes (Duffy, 2001), incluida la producción de sideróforos (Compant *et al.*, 2005), de antibióticos (Validov *et al.*, 2005) o sustancias volátiles (Ping y Boland, 2004). La capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* observada en estas 3 bacterias diazotrofas, aisladas de plantas de maíz, debería ser confirmada en futuros ensayos en plantas así como dilucidar cuál o cuáles mecanismos señalados intervienen en el control biológico.

Según Nguyen *et al.*, (2002) una cepa debe cumplir con ciertos criterios, para ser seleccionada para un biofertilizante, entre otros: a) ser abundante en el suelo, b) poseer alta actividad promotora del crecimiento vegetal (FBN, fitohormonas, solubilización de P, control biológico, etc), c) tener crecimiento rápido que le permita competir y sobrevivir en un sustrato no estéril, d) no causar daños a los vegetales. Algunas de las cepas aisladas y caracterizadas en este trabajo, pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Raoultella*, presentaron potencial capacidad de promover el crecimiento vegetal y demostraron ser abundantes en suelo, raíces y tallos de las plantas de maíz, lo que indicaría que se trata de cepas con capacidad de competir en el suelo y de colonizar los tejidos de las plantas. Estos resultados permiten recomendar a estas cepas como candidatas para continuar la investigación en ensayos de inoculación, que permitan demostrar su capacidad para promover el crecimiento vegetal y colonizar internamente la planta de maíz.

II.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi K., Natakani M. y Mochida H. 2002. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48: 889-895.
- Aguillera M.M., Hodge N.C., Stall R.E. y Smart G.C. Jr. 1993. Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 68-72.
- Ahmad F., Ahmad I. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163:173-18.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaeffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- Baca B.E. y Elmerich C. Microbial production of plant hormones. 2007. En: *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Elmerich y Newton (Ed). Springer. Pp 113-143
- Bally R. y Elmerich C. 2007. Biocontrol of plant disease by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. En: *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Elmerich y Newton (Ed). Springer. Pp 171-190
- Benata H., Ourarhi M., Nouredine B., Abdelbasset B., Abdelmoumen H., Muresu R., Squartini A., Missbah El Idrissi M. 2008. Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the eastern area of Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 378-38
- Bent E., Tuzun S., Chanway CP., Enebak S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 47:793-800
- Berge O., Heulin T., Balandreau J. 1991. Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L) growing on different French soils. *Biol. Fertil. Soils* 11:210-215

- Cavalcante V. y Döbereiner J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Chelius MK., Triplett EW. 2000a. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 783-787.
- Chelius MK., Triplett EW. 2000b. Diazotrophic endophyte associated with maize. In: Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett EW (Ed) Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp 779-792
- Chelius MK., Triplett EW. 2001. The diversity of *Archaea* and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* 41:252-263
- Chowdhury SP., Schmid M., Hartmann A., Tripathi AK. 2007. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar desert, India. *Microb. Ecol.* 54:82–90
- Chung H., Park M., Madhaiyan M., Seshadri S., Song J., Cho H., Sa T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1970–1974.
- Cocking EC. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252:169–175
- Collavino M. M., Sansberro P.A., Mroginski L.A., Aguilar M.O. 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fertil. Soils* 46:727–738
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Ait 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: 4951–4959.

- Crozier A., Arruda P., Jazmín J. M., Monteiro A. M., Sandberg G. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2833-2837.
- Desnoues N., Lin M., Guo X., Ma L., Carreno-Lopez R., Elmerich C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. Microbiology 149: 2251-2262
- Döbereiner J. 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En Methods in applied soil microbiology and biochemistry; London Academia Press pp. 134-141.
- Döbereiner J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis 13: 1-13.
- Drancourt M., Bollet C., Carta A., Rousselier P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:925–932
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22:107–149
- Döbereiner J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biol. Biochem. 29:771–774
- Duffy B.K. 2001. Competition. In: Encyclopedia of Plant Pathology. Maloy, O.C., Murray, T.D. (Eds.). John Wiley & Sons Inc., New York, NY, pp. 243–244.
- Federov D. N., Ivanova E. G., Doronina N. V., Trotsenko Y.A. 2008. A new system of degenerate oligonucleotide primers for detection and amplification of *nifHD* genes. Microbiol. 77: 286-288.
- Franché C, Lindström K., Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil 321:35–59

- Franco A.A., Döbereiner J. 1994. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathológica*, São Paulo 20:68-74.
- Frioni L. 2006. Fijación biológica del nitrógeno. En: Microbiología básica ambiental y agrícola. Universidad de la República-Facultad de Agronomía (ed). Montevideo, Uruguay.
- Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt M., Stephan M.P., Teixeira K.R.S., Dobereiner J. y De Ley J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 361-364.
- Gopalakrishnan S., Humayun P., Kiran B. K., Kannan I. G. K., Vidya M. S., Deepthi K., Rupela O. 2010. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s11274-010-0579-0.
- Hall, J.A., Peirson, D., Ghosh, S., Glick, B.R., 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Israel J. Plant Sci.* 44: 37–42.
- Halvorson AD., Peterson GA., Reule CA. 2002. Tillage system and crop rotation effects on dry land crop yields and soil carbon in the Central Great Plains. *Agron. J.* 94:1429-1436
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. 1968. The acetylene- ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- Hernández-Rodríguez A., Heydrich-Pérez M., Acebo-Guerrero Y., Velazquez del Valle MG., Hernández-Lauzardo A.N. 2008. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. In maize (*Zea mays* L.). *Appl. Soil Ecol.* 39: 180-186
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Hans-Volker T, Requena N, Amarger N, Martinez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:87-97

- Hoffmann H., Stindl S., Stumpf A., Mehlen A., Monget D., Heesemann J., Schleifer KH., Roggenkamp A. 2005. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Syst. Appl. Microbiol. 28: 206–212
- Hurek T., Handley LL., Reinhold-Hurek B., Piche Y. 2002. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Mol. Plant Microbe Interact. 15:233-242
- Idris HA., Labuschagne N., Korsten L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. Biol. Control 40:97–106
- Iniguez A.L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B.M.M., Stone J.M., Triplett E.W. 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:169-178
- Islam R., Trivedi P., Madhaiyan M., Seshadri S., Lee G., Yang J., Kim Y., Kim M. Han G., Singh Chauhan P., Sa T. 2010. Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment. Biol. Fertil. Soils 46:261–269
- James E.K, Olivares FL. 1998. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant Sci. 17:77–119
- Jha B., Thakur M., Gontia I., Albrecht V., Stoffels M., Schmid M., Hartmann A. 2009. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. European J. Soil Biol. 45: 62-72
- Jha P., Kumar A. 2009. Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat Plant. Microb. Ecol. 58:179–188
- Josey DP., Beynon JL., Johnston AWB., Beringer JE. 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. J. Appl. Bacteriol. 46:343-50
- Kampfer P., Ruppel S. y Reiner R. 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. Nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. Syst. App. Microbiol. 28: 213-221.

- Kennedy I.R., Chouhury A.T.M.A., Kecskés M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems; can their potential for plant growth promotion be latter exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36:1229-1244.
- Kumar V., Narula N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fertil. Soils* 28:301-305
- Kuklinsky-Sobral J., Araujo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani- Kleiner A.A., Azevedo J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6:1244–1251
- Ladha J.K.; Barraquio W.L.; Watanabe I. 1983. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Can. J. Microbiol.* 29:1301-1308.
- Lebuhn M., Achouak W., Schlöter M., Berge O., Meier H., Barakat M., Hartmann A. y Heulin T. 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2207–2223
- Lemanceau P., Alabouvette C. 1991. Biological control of Fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* 10: 279–286.
- Loper J.E., Schroth M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76:386-389
- McInroy J.A. y Kloepper J.W. 1994. Novel bacterial taxa inhabiting internal tissues of sweet corn and cotton. In *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, p. 190. Edited by M. H. Ryder, P. M. Stephens & G. D. Bowen. Adelaide: CSIRO
- McInroy J.A., y Kloepper J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342.

- Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. J. Environ. Manage 90:831–837
- Mehnaz S., Kowalik T., Reynolds B., Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. Soil Biology and Biochemistry 42: 1848-1856
- Merbach W., Ruppel S. y Schulze J. 1998. Dinitrogen Fixation of Microbe-Plant Associations as Affected by Nitrate and Ammonium Supply. Environ. and Health St. 34: 67-73.
- Montañez A., Abreu C., Gill PR., Hardarson G., Sicardi M. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biol. Fertil. Soils 45:253-263.
- Nautiyal CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiol. Lett. 170:265-270
- Ngom A., Nakagawa H., Sawada Y., Tsukahara J., Wakabayashi S., Uchiumi T., Nuntagij A., Kotepong S., Suzuki A., Higashi S., Abe M. 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. J. Gen. Appl. Microbiol. 50: 17–27
- Nguyen T.H., Deaker R., Kennedy I.R., Roughley R.J. 2003. The positive yield response of field-grown rice to inoculation with a multistrain biofertiliser in the Hanoi area, Vietnam. Symbiosis 35: 231–245.
- Nguyen T.H., Kennedy I.R., Roughley R.J., Deaker R., 2002. Quality Control Manual, AusAID CARD Project CON004, Biofertiliser Laboratory, Hanoi University of Science/SUNFix Centre for Nitrogen Fixation, University of Sydney.
- Pariona-Llanos R., Ibañez de Santi Ferrara F., Soto Gonzales H.H., Ramos Barbosa H. 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European J. Soil Biol. 46 :387-393

- Park M., Chungwoo K., Jinchul Y., Lee H., Wansik Shin, Seunghwan Kim, Tongmin Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160: 127-133
- Ping L., Boland W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 9, 263–266.
- Postgate J. 1981. Microbiology of the free-living nitrogen fixing bacteria, excluding cyanobacteria. En: Current perspectives in nitrogen fixation. Gibson AH, Newton WE (Eds). Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam, pp 217–228
- Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N. Teaumroong N. 2009. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) *Appl. Soil Ecol.* 42:141-14
- Prasad G., Evan, K., Natarajavan, M., Pallavolu, M., Reinhold.Hurek B. y Ladha, J. 2001. Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183: 2634-2645.
- Quagliotto L., Azziz G., Bajsa N., Vaz P., Pérez C., Ducamp F., Cadenazzi M., Altier N., Arias A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control* 51: 42-50.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T., Claeysens M. y van Montagu M. 1993. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *J. Bacteriol.* 175: 7056-7065.
- Remus, R., Ruppel, S., Jacob, H.J., Chrlotte, H.B., Merbach, W., 2000. Colonization behaviour of two enterobacterial strains on cereals. *Biol. Fertil. Soils* 30: 550–557.
- Rodríguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339

- Roesch L.F.W., Camargo F.A.O., Bento F.M., Triplett E.W. 2008. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil* 302:91-104
- Roesch L.F.W., De Quadros P.D., Camargo F.A.O., Triplett E.W. 2007. Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1377-1383.
- Rosas S.B., Altamirano F., Schroder E., Correa N. 2001. In vitro biocontrol activity of *Pseudomonas aurantiaca*. *Phyton-International J. Experimental Botany* 67: 203–209.
- Rosenblueth M., Martinez Romero E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181:337-344.
- Rosenblueth M., Martinez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant –Microb. Interact.* 19:827–837
- Rovera M., Andres J., Carlier E., Pasluosta C., Rosas S. 2008. *Pseudomonas aurantiaca*: plant growth promoting traits, secondary metabolites and inoculation response. En: *Plant–Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to promote Plant growth*. Ahmad, I., Pichtel, J., Hayat, S. (Eds.), Wiley–VCH, Germany, pp.155–164.
- Ryu J.H., Madhaiyan M., Poonguzhali S., Yim W.J., Indiragandhi P., Kim K.A., Anandham R., Yun J.C., Sa T.M. 2006. Plant growth substances produced by *Methylobacterium* spp. and their effect on the growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and red pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1622-1628.
- San Francisco S., Houdusse F., Zamarreno A.M., Garnica M., Casanova E., Garcia-Mina J.M. 2005. Effects of IAA and IAA precursors on the development, mineral nutrition, IAA content and free polyamine content of pepper plants cultivated in hydroponic conditions. *Scientia Horticulturae* 106: 38-52
- Sato K. & Jiang J.Y. 1996. Gram-negative bacterial flora on the root surface of wheat (*Triticum aestivum*) grown under different soil conditions. *Biol.Fertil. Soils* 23: 273-281.

- Sessitsch A., Howieson JG., Perret X., Antoun H., Martinez-Romero E. 2002. Advances in *Rhizobium* research. Crit. Rev. Plant Sci. 21:323-378
- Sevilla M., Burris RH., Gunapala N., Kennedy C. 2001. Comparison of benefit to sugar cane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. Mol. Plant Microbe Interact. 14:359–366
- Sharma A., Johri B.N., Sharma A.K., Glick B.R., 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP(3) influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). Soil Biol. Biochem. 35: 887-894.
- Shoebitz M., Ribaud CM., Pardo MA., Cantore ML., Ciampi L., Cura JA. 2008. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biol. Biochem. doi:10.1016/j.soilbio.2007.12.031
- Silva K.R.A., Salles, J.F., Seldin, L., Elsas J.D. 2003. Application of a novel *Paenibacillus* specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. J. Microbiol. Meth. 54: 213 -231.
- Soares RA., Roesch L.F.R., Zanatta G., Camargo F.A.O., Passaglia L.M.P. 2006. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. Appl. Soil Ecol. 33: 221-234.
- Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. 2000. Bacterial endophyte: potential role in developing sustainable system of crop production. Crit. Rev. Plant Sci. 19:1-30
- Sturz A.V., Nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl. Soil Ecol. 15:183–190
- Tan Z.Y, Peng G.X, Xu P.Z. 2009. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. Chinese Sci. Bull. 54: 2839–2848.

- Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 37: 1016-1024.
- Trujillo M.E., Willems A., Abril A., Planchuelo A.M., Rivas R., Ludeña D., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Velazquez E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 71:1318-1327
- Ueda T., Suga Y., Yahiro N., Matsuguchi, T. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. J. Bacteriol. 177: 1414-1417
- Validov S., Mavrodi O., De La Fuente L., Boronin A., Weller D., Thomashow L., Mavrodi D. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. FEMS Microbiol. Lett. 242: 249-256.
- Vassilev N., Marcia T., Vassileva M., Azcon R., Barea J.M., 1997. Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. Bioresour. Technol. 61: 29-32.
- Vermeiren H., Vanderleyden J., Hai W. L. 1998. Colonization and *nifH* expression on rice roots by *Alcaligenes faecalis* A15. En: Nitrogen Fixation with Non-Legumes. K. A. Malik, M. S. Mirza, and J. K. Ladha (Eds). Kluwer Academic Publishers, London. pp 167-177
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Meth. Mol. Cell Biol. 5:25-40
- Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B.M., Thomashow L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Rev. Phytopathol. 40: 309-348.
- Xie H., Pastrenak J.J., Glick B.R. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that over produce indole acetic acid. Current Microbiol. 32: 67-71

- Yan Y., Yang J., Dou Y., Chen M., Ping S., Peng J., Lu W., Zhang W., Yao Z., Li H., Liu W., He S., Geng L., Zhang X., Yang F., Yu H., Zhan Y., Li D., Lin Z., Wang Y., Elmerich C., Lin M., Jin Q. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7564–7569
- Yeager C.M., Kornosky J.L., Housman D.C., Grote E.E., Belnap J., Kuske C.R. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:973-983
- Yim W.J., Poonguzhali S., Madhaiyan M., Palaniappan P., Siddijee M.A., Sa T. 2009. Characterization of plant growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. *J. Microbiol.* 47: 147-155
- Young P. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: *Biological nitrogen fixation*. Stacey G, Burris RH, Evans HJ (Eds). Chapman and Hall Inc, New York. pp 43–86.
- Zani S., Mellon M.T., Collier J.L., Zehr J.P. 2000. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3119-3124
- Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5:539–554
- Zlotnikova A.K., Kazakova M.L., Zlotnikov K.M., Kazakov A.V., Umarov M.M. 2007. Physiological and biochemical properties of the bacterial association of *Klebsiella terrigena* E6 and *Bacillus firmus* E3. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43: 304-312.



CAPITULO III

Colonización y promoción del crecimiento en variedades de maíz inoculadas con bacterias diazotrofas seleccionadas



III.1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales, junto con el arroz y el trigo, mas consumidos por la población mundial y utilizado para la alimentación animal. Debido a esto, y a que en los últimos años se está incorporando en la producción del biodiésel y bioetanol (Marland y Turhollow, 1991), el interés en su cultivo ha aumentado considerablemente. En Uruguay, el área de siembra de maíz se ha incrementado en los últimos años, ocupando en la actualidad 96 mil ha (DIEA, 2009/2010). Los altos rendimientos de este cultivo están asociados a altas dosis de fertilización nitrogenada; el maíz requiere alrededor de 20-25 Kg de N/ha por cada tonelada producida. La fertilización nitrogenada trae aparejado un elevado costo de producción, además del costo ambiental. Existe un gran interés en reducir esa fertilización para lograr cultivos más sustentables. En este contexto, el proceso natural de fijación biológica de N_2 (FBN), llevado a cabo por bacterias diazotrofas, posee gran importancia ya que constituye un aporte no contaminante de N al ecosistema suelo-planta. En plantas de maíz, se ha demostrado mediante la técnica de dilución isotópica de ^{15}N , que el proceso de FBN aporta N al cultivo (García de Salomone *et al.*, 1996; Montañez *et al.*, 2009). Además de fijar N_2 , las bacterias diazotrofas pueden contribuir a mejorar el rendimiento de los cultivos provocando un mejor aprovechamiento de los nutrientes por la planta (Bowen y Rovira, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2003). El uso de inoculantes microbianos puede aportar una fracción significativa del N requerido por el cultivo, facilitar o aumentar la asimilación de otros nutrientes y reducir las pérdidas de nutrientes del ecosistema que pueden ser incluso más significativas en la producción (Kennedy *et al.*, 2004).

Los ensayos de inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por su sigla en inglés) realizados tanto en condiciones controladas como en el campo, demuestran que el efecto de la inoculación sobre el rendimiento del cultivo varía con múltiples factores, como la especie y cepa bacteriana, el genotipo de maíz y el nivel de fertilización del suelo (Riggs *et al.*, 2001). Estos resultados enfatizan la importancia de evaluar diferentes cepas bacterianas en combinación con genotipos de maíz.

Las bacterias PGPB pueden crecer en la zona del suelo que rodea las raíces, sobre la superficie de éstas o penetrar las raíces por distintos mecanismos y establecer poblaciones endófitas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Los endófitos entran a la planta principalmente por las raíces pero también pueden ingresar por las partes aéreas de la planta, flores, tallos y cotiledones (Kobayashi y Palumbo, 2000; Zinniel *et al.*, 2002). El suelo rizosférico es una importante fuente de endófitos de la raíz, y la mayoría de las especies que se encuentran en las raíces, están también presentes en el suelo rizosférico (Germida *et al.*, 1998; Sessitsch *et al.*, 2001). Se ha propuesto que las vías de entrada de los endófitos a las raíces pueden ser: sitios de emergencia de las raíces laterales, el ápice de las raíces, los pelos radicales o simplemente entre las células de la epidermis (Cocking 2003; Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). Por otro lado, se ha sugerido que las bacterias pueden penetrar activamente los tejidos de las plantas usando enzimas hidrolíticas como pectinasas y celulasas (Cocking *et al.*, 1994), además de usar aberturas naturales, como los estomas, o las heridas provocadas mecánicamente (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997). Dentro de la planta, las bacterias se localizan cerca del sitio de entrada o se dispersan localizándose en los espacios intercelulares de la corteza (James y Olivares, 1998) o en el sistema vascular (Gopalaswamy *et al.*, 2000; Olivares *et al.*, 1995).

La colonización de plantas de maíz por bacterias endófitas puede ser afectada por diversos factores bióticos y abióticos. Los factores biológicos como el genotipo y la edad de las plantas pueden afectar la presencia y distribución de las bacterias en las plantas de maíz (Aira *et al.*, 2010; Seldin *et al.*, 1998). El número de bacterias presentes en el inóculo (Luna *et al.*, 2010) constituye otro factor a tener en cuenta en ensayos de inoculación controlada. Entre los factores abióticos se ha señalado que el pH, la humedad (Adejumo y Orole, 2010) y el tipo de suelo (Chiarini *et al.*, 1998; Dalmastri *et al.*, 1999) influyen sobre la comunidad de bacterias asociadas a maíz. La investigación de los efectos que estos factores causan sobre la colonización de las bacterias diazotrofas puede contribuir a comprender los mecanismos que afectan el establecimiento de la comunidad bacteriana.

Desde hace varios años, se emplean diversos biomarcadores para estudiar la colonización y localización de las bacterias inoculadas en los tejidos vegetales (Sessitch *et al.*, 1998). Entre otros, el gen *gusA*, que codifica para una β -glucoronidasa (GUS) que actúa sobre sustratos glucurónidos como X-glucA (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido), liberando un precipitado de color azul por el cual la cepa marcada puede ser visualizada (Jefferson y Wilson, 1991). Este gen marcador es ampliamente utilizado en el estudio de las interacciones planta-microorganismos ya que la actividad GUS no se ha detectado en plantas ni en la mayoría de los microorganismos de importancia agronómica (Wilson *et al.*, 1992; Wilson *et al.* 1995).

El gen *gfp*, que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), es otra de las herramientas que se utilizan para estudiar la colonización de las plantas por bacterias endófitas *in vivo* (Haseloff y Siemering, 1998; Tombolini *et al.*, 1998). Estos métodos moleculares resultan apropiados para el estudio de las interacciones planta-microorganismos y para profundizar sobre el proceso de colonización y los factores que lo afectan. Estos conocimientos son de importancia para lograr el establecimiento de una población endófitas y el desarrollo exitoso de un esquema de inoculación.

En el marco de esta tesis se obtuvieron diazotrofos de la rizósfera, raíces y tallos desinfectados superficialmente de plantas de dos variedades de maíz. Se seleccionaron bacterias capaces de crecer en repetidos repiques en medios de cultivo sin N combinado, de producir ácido indol acético, de solubilizar fosfatos y de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro*.

Los objetivos de este capítulo fueron: i) evaluar el efecto de la inoculación con bacterias diazotrofas en el crecimiento temprano de plantas de maíz de distintas variedades, ii) determinar los cambios provocados por la inoculación en el número y estructura de la comunidad de diazotrofos rizosféricos y endófitos y iii) evaluar la colonización y localización de las bacterias inoculadas en las raíces.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Bacterias diazotrofas

De los diazotrofos obtenidos y caracterizados en el capítulo II, se seleccionaron 8 cepas (cuadro 1) para la realización de ensayos de inoculación en condiciones controladas. Los aislamientos fueron seleccionados en base a sus características promotoras del crecimiento vegetal y a su origen (raíz, tallo y rizósfera, de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871); se incluyeron bacterias de distintos géneros/especies.

Cuadro 1: Características de las bacterias diazotrofas aisladas de rizósfera, raíz y tallo de plantas de maíz de las variedades NK940 y PAU871 seleccionadas para los ensayos de inoculación.

Especie/cepa	origen		<i>nifH</i> ^a	AIA ^b	IS	Inhibición
				($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	fosfatos ^c	<i>Fusarium</i> ^d (%)
<i>Raoultella terrigena</i> 10R	Raíz	NK940	+	93	>2	40
<i>Raoultella terrigena</i> 32R	Raíz	PAU871	+	88	1-2	25
<i>Raoultella terrigena</i> 50T	Tallo	NK940	+	76	1-2	50
<i>Ochrobactrum</i> sp. 55T	Tallo	PAU871	+	130	>2	25
<i>Enterobacter</i> sp. 59T	Tallo	PAU871	+	134	1	33
<i>Pseudomonas</i> sp. 70T	Tallo	NK940	+	92	1-2	50
<i>Pseudomonas</i> sp. 79S	Rizósfera	NK940	+	67	1-2	50
<i>Enterobacter</i> sp. 87S	Rizósfera	PAU871	+	87	>2	25

^a amplificación de un fragmento del gen *nifH* utilizando PCR anidada (Yeager *et al.*, 2004)

^b producción de ácido indol acético (AIA) en medio TY con 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de triptofano, determinado mediante el método de Salkowsky (Loper y Schroth, 1986); ^c Índice de solubilización (IS) en medio NB-RIP con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo (Kumar y Narula, 1999).; ^d Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* en cultivos en placas de medio PDA (Idris *et al.*, 2007)

Para la inoculación de las semillas o plantas de maíz, las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido a 28°C con agitación hasta una concentración de 10^9 células. mL^{-1} .

III.2.2. Elongación de la radícula

Las semillas de las variedades PAU871 y NK940 desinfectadas superficialmente fueron impregnadas con las cepas seleccionadas durante la noche (cultivos líquidos con 10^9 células.mL⁻¹). Se colocaron en placas con agar-agua (10 semillas/placa, 3 repeticiones por cepa). Se incluyó un tratamiento sin inocular (control), que consistió en impregnar las semillas en el medio TY estéril. Luego de 48 h de incubación a 25°C se midió el largo de la radícula. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher $p < 0.05$ (Infostat, 2008).

III.2.3. Ensayo de inoculación en condiciones gnotobióticas

Las semillas desinfectadas superficialmente de las variedades PAU871 y NK940 fueron germinadas en placas con agar-agua y sembradas en tubos con 50 mL de medio Fåhræus semisólido sin N combinado (Fåhræus, 1957). A los 3 días de la siembra, las plantas fueron inoculadas con 1×10^9 bacterias.mL⁻¹ de cada una de las 8 cepas, con 5 repeticiones por cepa. Se incluyó un tratamiento sin inocular (control), que consistió en plantas con 1 mL de medio TY estéril. Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h luz /8 h oscuridad, con una intensidad de luz de 800 μ moles de fotones.m⁻².seg⁻¹, y 24°C día/22°C noche, durante 15 días.

Al momento de la cosecha, se separó la raíz de la parte aérea y se determinó peso seco de la parte aérea y de la raíz. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher ($p < 0.05$). Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre el peso seco de la parte aérea y el peso de la raíz para ambas variedades (Infostat, 2008).

III.2.4. Ensayo de inoculación en plantas crecidas en macetas con suelo

En base a los resultados obtenidos en el ensayo planteado en III.2.3, se seleccionaron 5 cepas para la realización de un segundo ensayo de inoculación en condiciones controladas en el que se utilizaron macetas con 1 Kg de suelo:arena (1:1). Las características del suelo

fueron: pH 6.9, 1.0% C orgánico, 0.13% N, 52 ppm P, 0.28 meq/100g K. Las semillas de maíz de las variedades PAU871 y NK940, superficialmente desinfectadas, fueron impregnadas durante toda la noche en cultivos líquidos de las bacterias diazotrofas seleccionadas con una concentración de 10^9 cel.mL⁻¹. Se incluyó un tratamiento que consistió en inocular las semillas con una mezcla con cantidades iguales de cultivos líquidos de las 5 cepas, y un tratamiento sin inocular (control), que consistió en impregnar las semillas en medio TY estéril. Las semillas inoculadas fueron sembradas en macetas, a razón de 3 semillas/maceta que fueron raleadas a 1 planta/maceta a los 4 días de la siembra. A los 15 días de la siembra se realizó una segunda inoculación en la base del tallo de cada planta con 1 mL de un cultivo líquido de cada cepa con la misma concentración inicial. Las plantas del tratamiento control recibieron 1 mL de medio TY estéril. El diseño fue completamente al azar con 3 repeticiones/tratamiento.

Las plantas fueron regadas con agua destilada estéril y mantenidas en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones del experimento anterior. Luego de 30 días se determinó el peso seco de la parte aérea, y el número y perfil de la comunidad de diazotrofos en la rizósfera y en las raíces de las plantas de maíz.

Peso seco de la parte aérea

A los 30 días, se extrajeron las plantas, se cortó la parte aérea y se determinó el peso seco de cada planta (estufa a 50°C hasta peso constante). Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher $p < 0.05$ (Infostat, 2008).

Muestreo y acondicionamiento del suelo rizosférico y de las raíces

En la cosecha se extrajeron muestras de suelo y raíces de las plantas de cada maceta. Se sacudió la raíz para desprender restos del suelo, el suelo que quedó adherido a la raíz se consideró suelo rizosférico, se tamizó a 2 mm y se guardó durante 24 h a 4°C para los recuentos microbianos y a -20°C para la extracción de ADN.

Las raíces de cada planta se lavaron con agua destilada para remover restos de suelo y se desinfectaron superficialmente con alcohol 70% (3 min), hipoclorito de sodio al 2.5% (10 min) y 3 lavados con agua destilada estéril. La raíz se cortó con bisturí en trozos pequeños y se mezcló. De cada mezcla se separó una submuestra de raíces que fue sumergida en

nitrógeno líquido y guardada a -20°C para la extracción de ADN; el resto de las muestras fueron utilizadas inmediatamente para los recuentos de bacterias diazotrofas.

Número de diazotrofos

Para determinar el número de bacterias diazotrofas por gramo de raíces o suelo rizosférico de las plantas inoculadas y el control, se utilizó el método del número más probable (NMP). Un gramo de suelo rizosférico y de raíces desinfectadas superficialmente fueron macerados en 9 mL de NaCl 0.9% y se realizaron diluciones seriadas entre 10^{-2} y 10^{-6} . de las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} se sembraron 100 μ L por triplicado en frascos con 5 mL de medio jNFb semisólido sin N combinado. Los frascos se incubaron a 28°C por 7 días y aquellos frascos que mostraron viraje del indicador de pH y/o crecimiento visible fueron considerados positivos.

El NMP de diazotrofos se calculó usando las tablas de Mac Grady y fue transformado a log NMP para el análisis de varianza y prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher ($p < 0.05$) (Infostat, 2008).

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Se aplicó la técnica de T-RFLP sobre muestras de suelo rizosférico y raíces de las plantas de la variedad PAU871 inoculadas y sin inocular (controles).

Para la extracción de ADN y para la amplificación del gen *nifH* se siguió la metodología descrita en el capítulo I. Los productos de la amplificación se purificaron utilizando Ron's PCR *Pure Kit* (Bioron, Alemania) y la restricción se realizó con la enzima *HhaI* (Fermentas, Canadá) según se describió en el capítulo I.

Los fragmentos terminales marcados (T-RFs) fueron separados por Macrogen (Seul, Corea) utilizando un secuenciador ABI3730X (*Applied Biosystem*). Para calcular el largo de los fragmentos marcados se utilizó como estándar interno GS500LIZ y el programa GeneScan™ (*Applied Biosystems*). El análisis de los T-RFs se realizó según la metodología descrita en el capítulo I.

III.2.5. Hidrólisis de carboximetil celulosa y pectina

Para determinar la actividad pectinolítica y endoglucanasa se siguió el procedimiento descrito por Pariona-Llanos *et al.*, (2010). Para la actividad endoglucanasa se utilizó medio jNFb sólido suplementado con 0.5% triptona y 0.25% o 1% de carboximetil celulosa (CMC). En cada placa se sembraron 10 μ L de cultivos líquidos de cada cepa (1×10^9 cel/mL), se incluyeron las 8 cepas en una misma placa y se realizaron 3 repeticiones. Después de 48 h de incubación a 28°C, las placas se cubrieron con solución de rojo Congo ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, se lavaron con solución de NaCl 1M y se observó la aparición de halo de degradación de CMC alrededor de las colonias (Theather y Wood, 1982).

Para la actividad pectinolítica se utilizó 0.5% de pectina cítrica en el medio jNFb sólido suplementado con 0.5% de triptona. Los cultivos bacterianos fueron sembrados de igual manera que para el ensayo de CMC. Las placas se incubaron a 28°C durante 4 días. Luego de la aparición de colonias, el medio fue cubierto con lugol durante 2 min y se observó la aparición de halo alrededor de las colonias.

III.2.6. Marcado de las cepas con *gusA*

Para conocer la capacidad infectiva de las bacterias diazotrofas y la colonización de las raíces de plantas de maíz, se marcaron las cepas seleccionadas con el gen reportero *gusA*.

Como donadora se utilizó la cepa S17-1 λ -pir de *E. coli* que contiene el transposón mTn5SS*gusA11* de expresión constitutiva localizado en el plásmido pCAM111 (Wilson *et al.*, 1995), cedida por el Dr. Juan Sanjuán, CSIC, Granada, España. La cepa donadora creció en medio líquido LB con $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de estreptomicina (Str) incubado con agitación a 37°C; mientras que las bacterias diazótrofas se desarrollaron en medio LB a 30°C con agitación. Para la conjugación se centrifugó 1 mL del cultivo de la cepa donadora y de la receptora, el *pellet* se lavó y se resuspendió en 250 μ L de medio LB. Se mezclaron 100 μ L de la suspensión de cada cepa (donadora y receptora) y 100 μ L se sembraron en la superficie del medio LB sólido. Las placas se incubaron a 30°C durante toda la noche, las células desarrolladas en la superficie del medio sólido se recogieron y se resuspendieron en 2 mL

de NaCl 0.9 %. Se sembraron 100 μ L de una dilución 10^{-1} de la suspensión celular en placas con medio LB sólido con 50 μ g.mL $^{-1}$ de Str, 10 μ g.mL $^{-1}$ de nitrofurantoína y 50 μ g.mL $^{-1}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucurónido (X-Gluc). La cepa S17-1 λ -pir de *E. coli* no puede crecer en ese medio ya que no es resistente a nitrofurantoína y las cepas diazótrofes tampoco porque no son resistentes a 50 μ g.mL $^{-1}$ de Str. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h y se seleccionaron los transconjugantes que fueron capaces de crecer en el medio con ambos antibióticos y que evidenciaron actividad GUS, es decir desarrollaron colonias azules.

III.2.7. Ensayo de inoculación con las cepas marcadas con *gusA*

Condiciones de crecimiento e inoculación de las plantas

Las semillas desinfectadas superficialmente de la variedad PAU871 fueron germinadas en placas con agar-agua y sembradas en tubos con 50 mL de medio Fåhræus sin N combinado. A los 2 días de la siembra las plantas fueron inoculadas con un cultivo líquido con 10^9 cel/planta de las cepas 59T, 79S y con los clones 59.2 y 79.1 marcados con *gusA*. Se incluyó un tratamiento control (sin inocular). Se inocularon 18 plantas con cada cepa ya que se realizaron 3 muestreos y en cada muestreo se tomaron 6 plantas, 3 para determinar el número de bacterias presentes en las raíces y 3 para realizar observaciones microscópicas. Las plantas fueron mantenidas durante 16 días en cámara de crecimiento en las mismas condiciones descritas en el ítem III.2.3.

Número de transconjugantes en las raíces de las plantas inoculadas

A los 2, 6 y 13 días de la inoculación se extrajeron raíces de las plantas inoculadas y del control (3 repeticiones/tratamiento) y se realizaron recuentos de los transconjugantes en la superficie y en el interior de las raíces.

Al momento de la cosecha se separó la raíz de la parte aérea y se determinó el peso fresco de las raíces de las plantas. Toda la raíz fue colocada en un tubo con 9 mL de solución de NaCl 0.9% y agitada en vortex durante 1 min para ayudar a desprender las bacterias de la superficie de las raíces. Se realizaron diluciones seriadas de la suspensión y se sembraron 100 μ L por triplicado en placas con medio TY con 50 μ g.mL $^{-1}$ de Str.

Se realizó una desinfección superficial de las raíces con alcohol 70% (3 min), hipoclorito de sodio 2.5% (10 min) y 5 lavados con agua destilada estéril. Las raíces se cortaron en forma aséptica y se maceraron en mortero con 9 mL de NaCl 0.9%. Del sobrenadante se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 μ L por triplicado en placas con medio TY con 50 μ g.mL⁻¹ de Sm. Como control de esterilidad trozos de raíces de 1 cm fueron colocados en la superficie del medio TY con 50 μ g.mL⁻¹ de Str durante 1 min y luego retirados.

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24h. Luego de la incubación se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) que se desarrollaron en el medio, es decir los transconjugantes resistentes al antibiótico. Algunas colonias fueron repicadas a medio TY con 50 μ g.mL⁻¹ de X-gluc para confirmar el desarrollo del color azul.

Para el análisis estadístico, el número de ufc fue transformado a log ufc/g de peso fresco de raíz. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher ($p < 0.05$) (Infostat, 2008).

Tinción histoquímica y observación de las raíces

A los 5, 10 y 16 días de la inoculación se realizaron observaciones de las raíces de las plantas inoculadas con los clones 59.2, 79.1 y del control sin inocular. Se tomaron 3 plantas por cada tratamiento, se separó la parte aérea de las raíces, las cuales fueron sumergidas en agua destilada estéril y agitadas en vortex durante 30 seg. Trozos de raíces de aproximadamente 3 cm fueron colocados en el *buffer* de tinción que contiene el sustrato (50 mM buffer fosfato, 1 mM X-gluc, SDS y 1% triton 100X) (Jefferson *et al.*, 1987). Se realizó vacío en los tubos durante 30 min y se incubaron a 37°C durante 12 h. Luego de la incubación las raíces fueron lavadas con agua destilada estéril y observadas a simple vista, en lupa (SMZ-2T Nikon) y microscopio óptico (HFX-DX II Nikon). Se realizaron a mano cortes transversales de raíces para ser observados en microscopio óptico.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Efecto de la inoculación sobre el largo de la radícula

La inoculación de las semillas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 con las 8 bacterias diazotrofas provocó efectos variables en el largo de la radícula. Se observaron diferencias entre las cepas y entre las variedades de maíz (cuadro 2).

En la variedad PAU871, las cepas 10R y 55T produjeron mayor elongación de la radícula respecto al control, mientras que las restantes no presentaron diferencias significativas con el control (cuadro 2). En la variedad NK940, sólo la cepa 50T no presentó diferencias significativas con el control, mientras que las demás inhibieron su crecimiento (cuadro 2).

Cuadro 2: Largo de la radícula en semillas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 inoculadas con bacterias diazotrofas y germinadas en placas con agar-agua a 25°C durante 48 h

Especie/cepa	Largo radícula	
	Diferencias con el control (cm)	
	PAU871	NK940
<i>R. terrigena</i> 10R	+0.33*	-0.96*
<i>R. terrigena</i> 32R	+0.12	-0.84*
<i>R. terrigena</i> 50T	+0.04	-0.10
<i>Ochrobactrum</i> sp. 55T	+0.36*	-1.28*
<i>Pseudomonas</i> sp. 70T	+0.10	-1.58*
<i>Pseudomonas</i> sp. 79S	+0.10	-1.38*
<i>Enterobacter</i> sp. 59T	+0.06	-1.96*
<i>Enterobacter</i> sp. 87S	- 0.20	-1.94*

Los valores expresados son la diferencia con el control (en cm) y representan la media de 3 placas con 10 semillas cada una.

III.3.2. Respuesta a la inoculación de plantas de maíz crecidas en condiciones gnotobióticas

El medio Färhaeus resultó apropiado y permitió el crecimiento de las plantas de maíz de ambas variedades durante 15 días (Fig. 1).

El efecto de la inoculación sobre el crecimiento de plantas de maíz de ambas variedades, en condiciones gnotobióticas se muestra en las Fig. 2 y 3. En la variedad PAU871 la mayoría de las cepas promovieron el crecimiento de la parte aérea, ya que la biomasa aérea

producida por las plantas inoculadas superó la producida por el control; mientras que en la variedad NK940 los resultados variaron con las distintas cepas y se observaron valores de biomasa aérea superiores, inferiores e iguales a los producidos por el control (Fig. 2).



Figura 1: Plantas de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con la cepa 10R (izq) y control sin inocular (derecha). Las plantas crecieron 15 días después de la inoculación en tubos con medio Farhaeus sin N combinado.

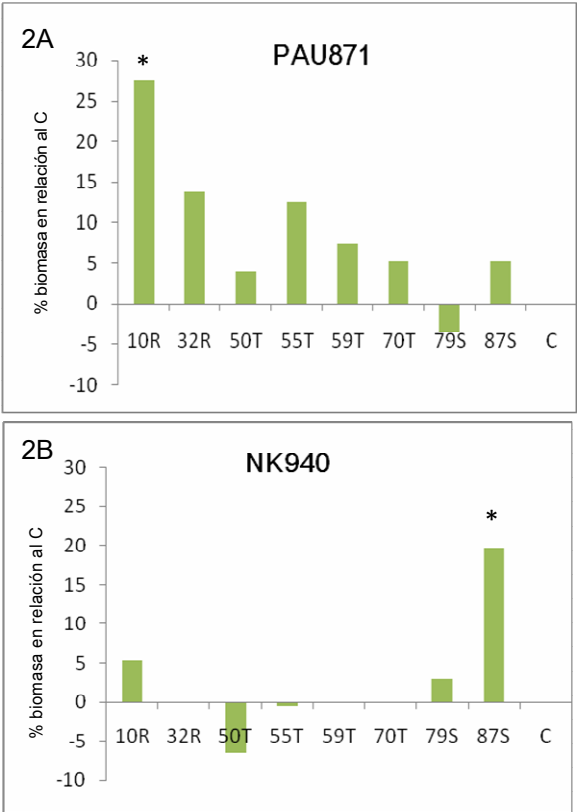


Figura 2: Peso seco de la parte aérea de plantas de la variedad PAU871 (A) y NK940 (B) inoculadas con bacterias diazotrofas (n= 5). Los resultados expresan en porcentaje la diferencia entre plantas inoculadas y control (C). *diferencia significativa con el control (Fisher p< 0.05)

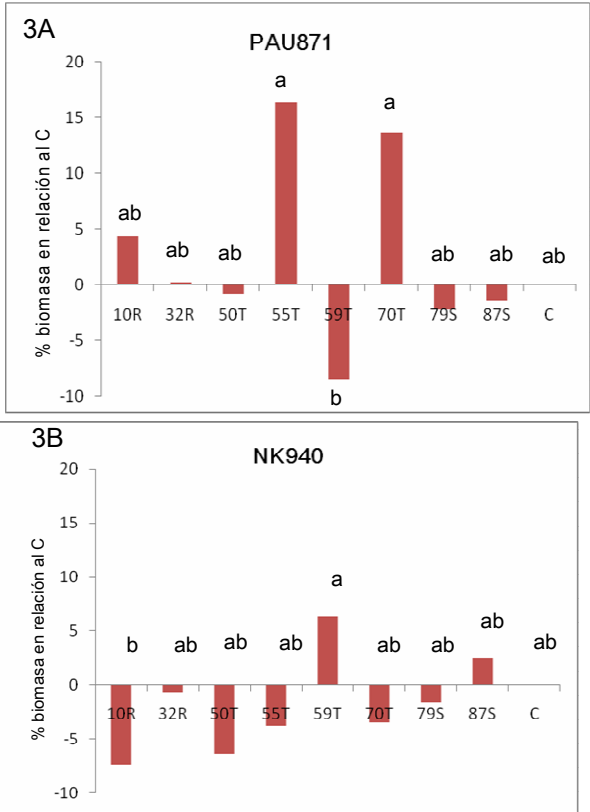


Figura 3: Peso seco de la raíz de plantas de la variedad PAU871 (A) y NK940 (B) inoculadas con bacterias diazotrofas (n= 5). Los resultados expresan en porcentaje la diferencia entre plantas inoculadas y el control (C). Letras diferentes en cada variedad indican diferencia significativa (Fisher p< 0.05)

En las plantas de la variedad PAU871 inoculadas con la cepa 10R se observó un aumento significativo de la biomasa aérea (27% superior al control), mientras que las cepas 32R y 55T provocaron un incremento de la biomasa aérea (13%) respecto al control pero no fue significativo (Fig. 2A). La inoculación no provocó efectos significativos en el peso seco de la raíz de las plantas de la variedad PAU871 respecto al control (Fig. 3A). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre cepas dado que las cepas 70T y 55T promovieron el crecimiento de la raíz y presentaron diferencias significativas con la cepa 59T que produjo inhibición en el crecimiento de la raíz (Fig. 3A).

En la variedad NK940 se observó un aumento del 20% de la biomasa aérea de las plantas cuando se inoculó con la cepa 87S, mientras que el resto de las cepas no provocaron diferencias significativas con el control (Fig. 2B). No se observaron diferencias significativas en el peso seco de la raíz entre las plantas inoculadas y el control (Fig. 3B); sin embargo existieron diferencias significativas entre plantas inoculadas con las cepas 59T y 10R (Fig. 3B).

El coeficiente de correlación de Pearson entre el peso seco de la parte aérea y el peso de la raíz en plantas de la variedad PAU871 indicó una correlación positiva entre estos parámetros ($r^2=0.60$), mientras que en plantas de la variedad NK940 esa correlación no fue significativa ($r^2=0.36$).

III.3.3. Respuesta a la inoculación de plantas de maíz crecidas en macetas con suelo

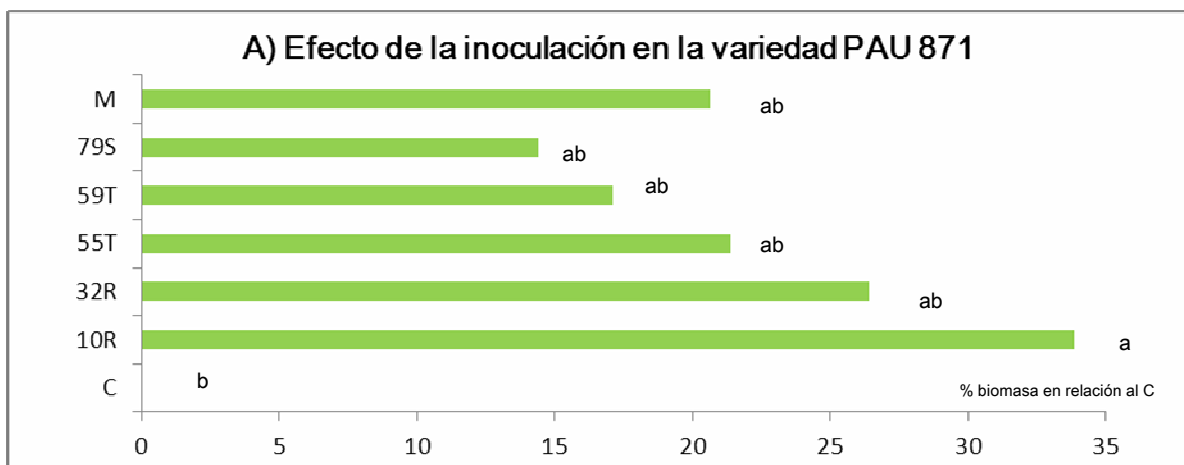
En este ensayo las plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940, inoculadas y sin inocular crecieron en macetas con una mezcla de suelo y arena (1/1) (Fig. 4), lo que permitió evaluar la respuesta a la inoculación en plantas con mayor desarrollo (30 días), así como el comportamiento de las cepas en un sustrato no estéril.



Figura 4: Plantas de maíz de la variedad NK940 inoculadas con bacterias diazotrofas. Las plantas crecieron en solarío durante 30 días después de la inoculación en suelo:arena (1/1).

La respuesta a la inoculación fue diferente en las dos variedades de maíz evaluadas; en las plantas de la variedad PAU871 la inoculación con las 5 cepas y la coinoculación con las 5 cepas (mezcla), provocó mayor crecimiento de la parte aérea comparado con el control (Fig. 5A), mientras que en la variedad NK940 el efecto de la inoculación fue variable aunque sin diferencias significativas con el control (Fig. 5B).

Entre los diazotrofos evaluados se destacó la cepa 10R de *Raoultella terrigena* ya que el tratamiento inoculado con esta cepa presentó diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea en relación al control, demostrando promoción del crecimiento vegetal en la variedad PAU871 (Fig. 5A).



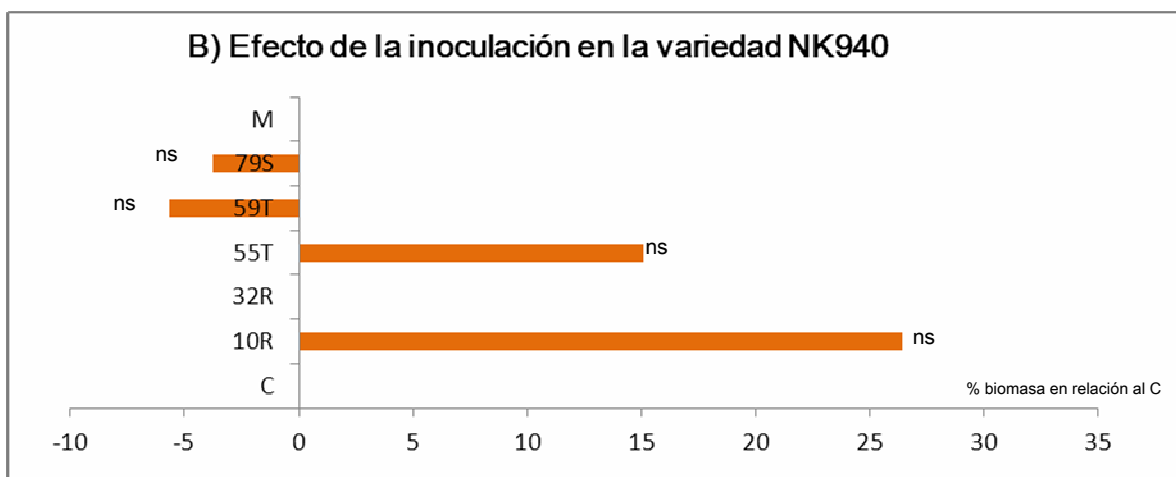


Figura 5: Peso seco de la parte aérea de plantas de maíz de la variedad PAU871(A) y NK940 (B), inoculadas con 5 bacterias diazotrofas (10R, 32R, 55T, 59T, 79S), coinoculadas con las 5 cepas (Mezcla) y control, sin inocular (C). Las plantas fueron crecidas en macetas con suelo:arena durante 30 días. Los resultados se expresan como porcentaje en relación a la biomasa producida por el control (n= 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (Fisher $p < 0.05$), ns no significativo

Efecto de la inoculación sobre el número de diazotrofos

El objetivo de esta actividad fue determinar si la inoculación con las bacterias seleccionadas provoca un cambio en el número de diazotrofos endófitos y/o rizosféricos. El cuadro 3 presenta los resultados de las densidades de bacterias diazotrofas en la rizósfera y en las raíces desinfectadas superficialmente de las plantas de las variedades PAU871 y NK940, inoculadas y sin inocular. Las mismas variaron entre 3×10^4 y 2×10^6 /g en la rizósfera, mientras que en las raíces desinfectadas las poblaciones fueron menores y variaron entre 1×10^4 y 6×10^5 /g de raíz (cuadro 3).

Cuadro 3: Número de diazotrofos en raíces y suelo rizosférico de plantas de maíz de las variedades PAU871 y NK940 inoculadas con bacterias diazotrofas.

Tratamiento	Log NMP de diazotrofos/ g			
	PAU871		NK940	
	Raíz	Rizósfera	Raíz	Rizósfera
10R	4.87 a	5.51 ab	4.78 ab	5.53 ab
32R	4.87 a	5.33 ab	4.59 b	5.18 ab
55T	4.82 a	5.73 ab	5.76 a	5.18 ab
59T	4.99 a	6.32 a	4.79 ab	4.95 bc
79S	4.19 a	6.14 ab	4.78 ab	5.18 ab
Mezcla	4.87 a	5.36 ab	5.21 ab	5.68 a
Control	4.99 a	5.14 b	4.98 ab	4.51 c

Los valores expresados son la media de 3 repeticiones.

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (Fisher $p < 0.05$).

Se observaron diferencias significativas en el número de bacterias diazotrofas presentes en el suelo rizosférico de las plantas de ambas variedades, donde el tratamiento sin inocular presentó el menor número de diazotrofos, diferenciándose significativamente de algunos tratamientos inoculados (cuadro 3).

En el número de bacterias diazotrofos presentes en el suelo rizosférico, la interacción cepa x variedad fue significativa ($p=0.027$). En la variedad NK940 la mayor población de diazotrofos se detectó en la rizósfera de plantas inoculadas con la mezcla de cepas, mientras que en la variedad PAU871 la mayor cantidad de diazotrofos se encontró en plantas inoculadas con la cepa 59T (cuadro 3).

No se observaron diferencias significativas en el número de diazotrofos endófitos entre ninguno de los tratamientos inoculados y el control (cuadro 3).

Efecto de la inoculación en la comunidad de diazotrofos

El objetivo de esta actividad fue determinar si la inoculación con las bacterias seleccionadas provoca un cambio en el perfil de la comunidad de diazotrofos endófitos y/o rizosféricos. Utilizando un kit comercial se logró extraer ADN de suelo rizosférico y de raíces de las plantas de la variedad PAU871 inoculadas con las cepas 10R, 55T, 79S, 59T y del control (sin inocular). Se eligió la variedad PAU871 ya que fue la variedad en la que se observó una respuesta positiva a la inoculación.

Se determinó el perfil de la comunidad de diazotrofos rizosféricos y endófitos mediante la técnica de T-RFLP amplificando el gen *nifH* y digiriéndolo con la enzima *HhaI*. Para normalizar los datos se eliminaron los picos menores a 30 pb y mayores a 360 pb y se consideraron picos diferentes aquellos con una diferencia de 2 pb. La media del número de fragmentos terminales marcados (T-RFs) en cada tratamiento, expresado como el índice de riqueza, varió entre 8 y 12 en las muestras de suelo rizosférico y entre 4 y 7 en las muestras de raíces desinfectadas superficialmente, demostrando que la diversidad de diazotrofos en el suelo rizosférico fue mayor que en el interior de las raíces de maíz de esta variedad.

El análisis multivariado de los datos muestra la formación de 2 *clusters*, uno de ellos incluye las muestras de suelo rizosférico de plantas inoculadas y sin inocular y el otro las comunidades endófitas de raíz de plantas inoculadas y sin inocular (Fig. 6A), reafirmando las diferencias entre comunidades rizosféricas y endófitas. Este análisis demostró que las comunidades de suelo rizosférico mostraron mayor similitud entre ellas (55%) que las comunidades de raíces (25%). Por otro lado, se observó que la comunidad de endófitos de las plantas inoculadas con la cepa 10R se separó de la comunidad endófitas del tratamiento control y del resto de las plantas inoculadas. Sin embargo, las comunidades de suelo rizosférico de las plantas inoculadas con la cepa 10R fueron 90% similares a las del control sin inocular.

En el análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 6B), el CP 1 explica el 58% de la variabilidad, el CP 2 el 19% y el CP 3 el 10%. El CP 1 divide a las muestras según el origen, separa las comunidades de suelo rizosférico de las endófitas de raíces.

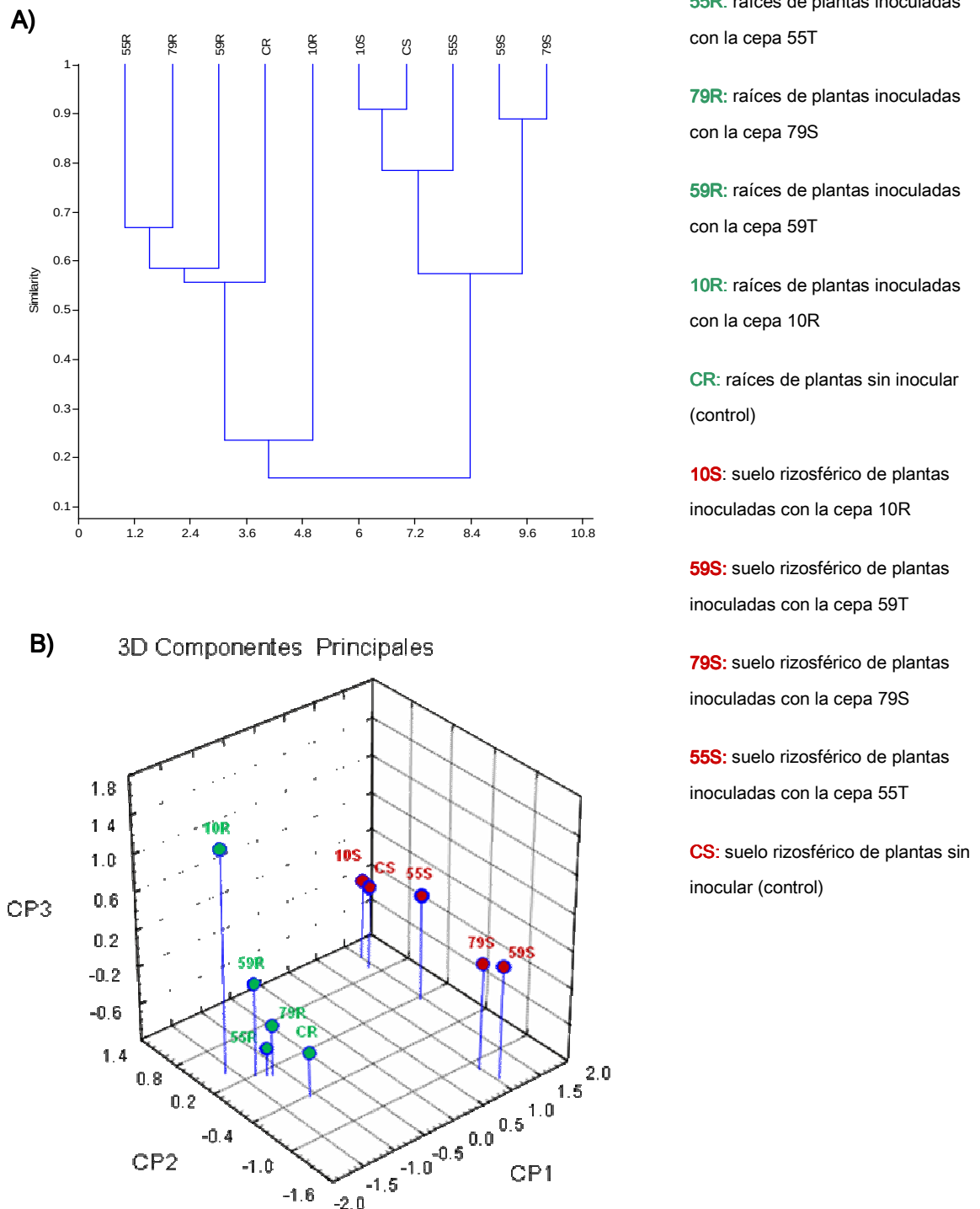


Figura 6: Análisis multivariado de los datos obtenidos por T-RFLP del gen *nifH* digerido con *HhaI* de muestras de suelo rizosférico y raíces de plantas de la variedad PAU871 inoculadas con las cepas 10R, 55T, 59T y 79S y controles (sin inocular). Las plantas crecieron durante 30 días en macetas con suelo-arena no estéril (1/1). Se utilizó la matriz de presencia o ausencia de los T-RFs que aportan al menos un 1 % de la abundancia total en cada muestra.

Como se puede apreciar con ambos análisis, *clusters* o PCA, las comunidades más similares fueron las de rizósfera del tratamiento control y las de rizósfera de las plantas inoculadas con la cepa 10R, sin embargo las más distantes fueron las comunidades endófitas de raíces de las plantas inoculadas con la cepa 10R y el control (Fig. 6A y 6B). Este resultado indicaría que en la variedad PAU871 la inoculación con la cepa 10R no provocó un cambio sustancial en la comunidad de diazotrofos rizosféricos mientras que el cambio fue mayor en la comunidad de diazotrofos endófitos.

La estructura de la comunidad de las plantas inoculadas con la cepa 10R se diferenció del resto de las comunidades endófitas, 3 T-RFs fueron únicos de esta comunidad (35, 41-42 y 79 pb). Las comunidades endófitas de las plantas inoculadas con las cepas 55T, 59T y 79S y el control comparten la presencia del T-RF de 177 pb como el más abundante, mientras que en las plantas inoculadas con la cepa 10R este T-RFs estuvo ausente.

III.3.4. Hidrólisis de carboximetil celulosa y pectina

El objetivo de esta sección fue determinar la capacidad de las bacterias seleccionadas de hidrolizar componentes de la pared vegetal como la celulosa y la pectina, lo cual podría relacionarse con los mecanismos de penetración de las raíces. Las 8 cepas evaluadas fueron capaces de producir un halo en el medio con 0.25% de carboximetil celulosa (CMC) (Fig. 7A). Si bien todas las cepas formaron un halo de igual tamaño, se observó mayor actividad en la cepa 79S identificada como *Pseudomonas sp.* ya que se notó una zona clara en casi toda la zona de la colonia (Fig. 7A).

Cuando se incorporó al medio de cultivo un porcentaje mayor de CMC (1%), no se observó halo de hidrólisis alrededor de ninguna de las colonias; sin embargo luego de lavar las colonias con NaCl, se pudo distinguir entre las cepas 79S, 70T y 55T que dejaron zonas claras en el medio de cultivo, de las restantes cepas que dejaron zonas opacas en el medio de cultivo (Fig. 7B).

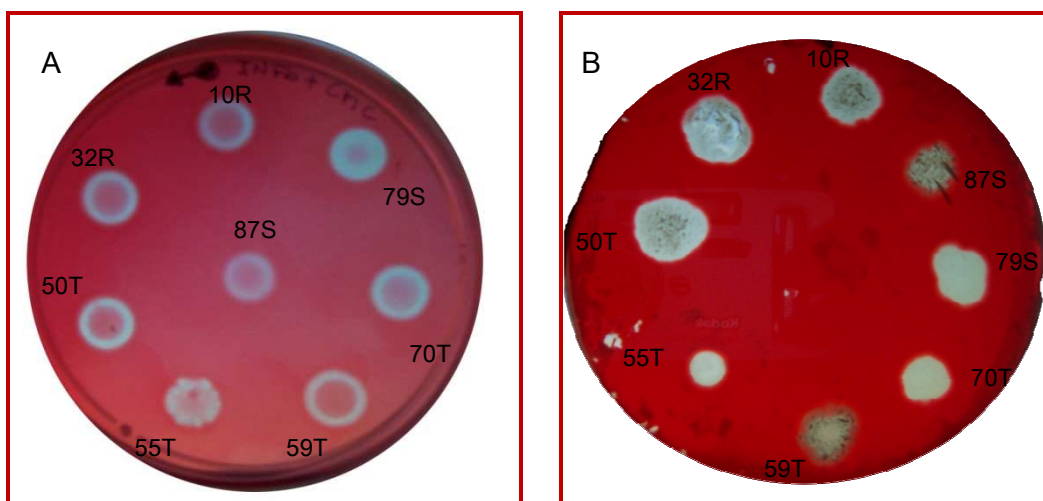


Figura 7: Bacterias diazotrofas en medio jNFb con 0.5% de triptona y 0.25% de carboximetil celulosa (A) y con 1% de carboximetil celulosa (B). Se observan las zonas de hidrólisis reveladas con rojo congo.

Siete de las 8 cepas evaluadas formaron halo de hidrólisis en el medio de cultivo con pectina (Fig. 8). Se observaron diferencias entre las cepas; la 32R fue la que presentó la mayor capacidad de hidrolizar pectina formando un halo de 4 cm de diámetro, mientras que las cepas 70T, 79S formaron un halo de 2 cm y las cepas 10R, 50T, 59T y 87S formaron un halo de 1.5 cm. En la colonia de la cepa 55T no se observó halo de hidrólisis (Fig. 8).

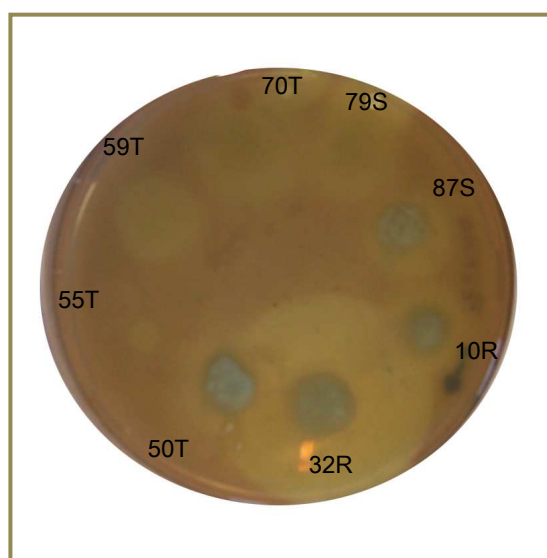


Figura 8: Bacterias diazotrofas en medio jNFb con 0.5% de triptona y 0.5% de pectina. Se observan halos de hidrólisis revelados con lugol.

III.3.5. Colonización de las raíces de maíz

Utilizando el transposón mTn5SsgusA21, que lleva el gen *gusA* se lograron marcar las cepas 55T (*Ochromobactrum sp.*), 59T (*Enterobacter sp.*), 70T y 79S (*Pseudomonas sp.*). Con la misma metodología, no fue posible marcar ninguna de las cepas de la especie *Raoultella terrigena* (10R, 32R, 50T) ni la cepa 87S de *Enterobacter sp.*, a pesar de que se realizaron numerosos intentos y modificaciones en la estrategia.

Para el ensayo de inoculación en plantas de maíz de la variedad PAU871, se seleccionaron los clones 59.2 y 79.1, que fueron resistentes a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina y que evidenciaron actividad GUS en el medio TY con 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de X-gluc (Fig. 9).



Figura 9: Selección de bacterias transformadas en medio TY con 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina y 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de X-gluc. Se observan colonias de los clones 59.2 y 79.1 que desarrollaron color azul

A los 2, 6 y 12 días de la inoculación se determinó el número de bacterias resistentes a estreptomicina presentes en la superficie e interior de raíces desinfectadas superficialmente de las plantas inoculadas de la variedad PAU871.

Las placas donde se sembraron trozos de raíces desinfectadas superficialmente (controles de esterilidad) no desarrollaron colonias. Basado en esto, podemos asumir que el método de desinfección superficial fue eficiente para eliminar las bacterias de la superficie de las raíces. Por otro lado, las plantas no inoculadas (controles) no presentaron poblaciones de bacterias resistentes a estreptomicina ni en la superficie ni en el interior de las raíces desinfectadas superficialmente; por lo que podemos afirmar que las colonias desarrolladas en las placas con estreptomicina corresponden a las cepas marcadas utilizadas en la inoculación de las plantas de maíz.

Debido a un error metodológico, no fue posible determinar el número exacto de bacterias en la superficie de las raíces a los 2 días de la inoculación, pero estas plantas presentaron poblaciones mayores a 10^6 ufc/g raíz (dato no mostrado).

El recuento de bacterias a los 6 y 13 días después de la inoculación mostró la existencia de poblaciones del rango de 10^9 - 10^{10} ufc/g en la superficie de las raíces; mientras que las poblaciones de bacterias endófitas de raíces fueron del rango de 10^6 - 10^7 ufc/g raíz (Fig. 10). No se detectaron diferencias significativas en los recuentos entre el día 6 y el día 13 después de la inoculación en ninguno de los tratamientos, ni entre las plantas inoculadas con las cepas 59.2 y 79.1 (Fig. 10). Las plantas inoculadas con las cepas sin marcar presentaron poblaciones similares a las inoculadas con las bacterias transformadas.

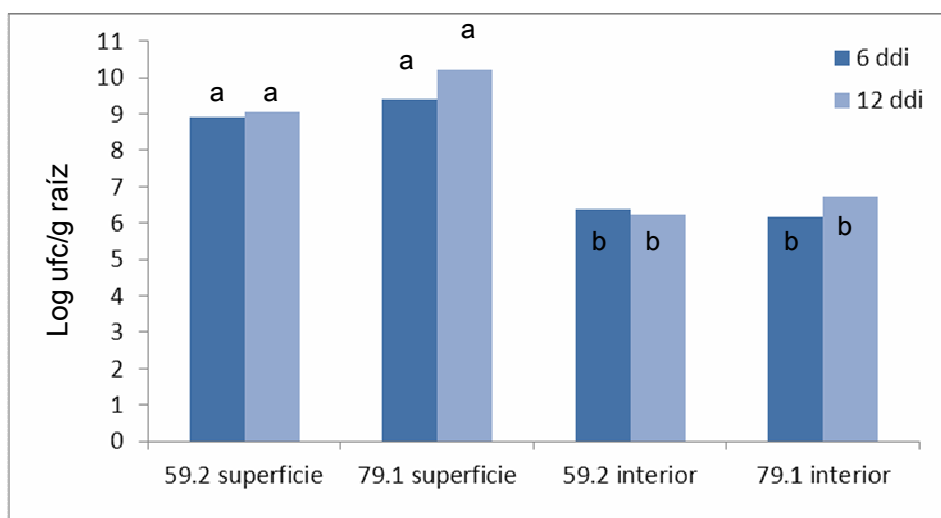


Figura 10. Número de bacterias marcadas en la superficie e interior de las raíces de plantas de maíz de la variedad PAU871, inoculadas con las cepas 59.2 y 79.1 a los 6 y 12 días después de la inoculación (ddi) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (Fisher $p < 0.05$).

Localización de las bacterias en las raíces

A los 5, 10 y 16 días de la inoculación, las bacterias presentes en las raíces de las plantas inoculadas con las cepas 59.2 y 79.1 presentaron coloración azul al ser incubadas con el sustrato X-gluc (Fig. 11); mientras que los controles no presentaron coloración (Fig. 12B).

El patrón de colonización detectado en las raíces de las plantas inoculadas con la con la cepa 59.2 fue similar al de las plantas inoculadas con la cepa 79.1. A los 5 días de la inoculación se observó desarrollo de color principalmente sobre la raíz principal, con mayor intensidad en los primeros 5 mm de la raíz (Fig. 11).



Figura 11: Raíces de maíz de la variedad PUA871 inoculadas con las cepas 79.1 y 59.2 marcadas con *gusA*, 5 días después de la inoculación. Las plantas se desarrollaron en condiciones gnotobióticas.

A los 10 y 16 días de la inoculación se observó actividad GUS distribuida heterogéneamente por todo el sistema radical, en raíz principal, en raíces secundarias y en raíces laterales (Fig. 12). No se observó distribución homogénea de las bacterias en el sistema radical ya que en algunas raíces se detectó coloración azul solo en algunos trozos (Fig. 12a). Se notó mayor preferencia por las raíces laterales emergentes, en las que se observó coloración homogénea (Fig. 12d y 12e). En algunas raíces laterales jóvenes se observó colonización del mucílago que rodea el ápice (Fig. 11e). No se observó actividad GUS en los pelos radicales, aun cuando la zona de la raíz presentara intensa coloración azul (Fig. 12f).

En algunas raíces de plantas inoculadas con la cepa 79.1 se observó actividad GUS en la zona del cilindro central (Fig. 12c), que indicaría la presencia de las bacterias marcadas colonizando el tejido vascular. Este resultado no pudo ser confirmado ya que de estas raíces no se logró obtener cortes transversales de buena calidad que permitieran la observación microscópica.

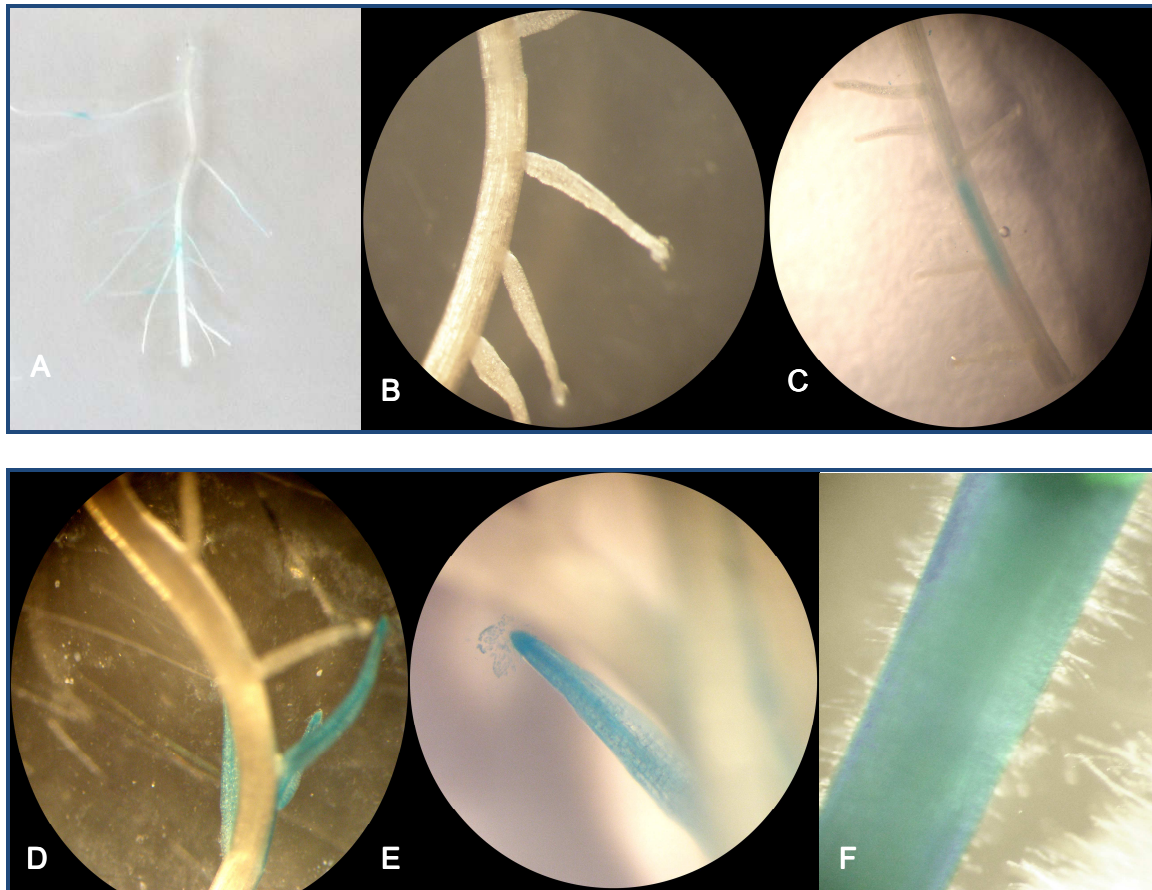


Figura 12: Localización de la actividad GUS en raíces de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con la cepa 79.1, desarrolladas en condiciones gnotobióticas, durante 16 días.

A) sistema radical de una planta inoculada, B) raíces del control sin inocular y C, D, E, F) raíces de plantas inoculadas. A) Observación a simple vista; B, C, D) lupa (10x); E) lupa (20x) y F) lupa (30x).

La observación microscópica de los cortes transversales de las raíces demostró que las plantas sin inocular no presentaron actividad GUS mientras que las inoculadas con ambas bacterias desarrollaron color azul (Fig. 13). Se observó actividad GUS principalmente en la

zona de la epidermis y con menor intensidad en la zona de la corteza (Fig. 13), lo que confirma que ambas cepas son capaces de colonizar las raíces de las plantas de la variedad PAU871. En ninguno de estos cortes de raíz se detectó actividad GUS en la zona del cilindro central.

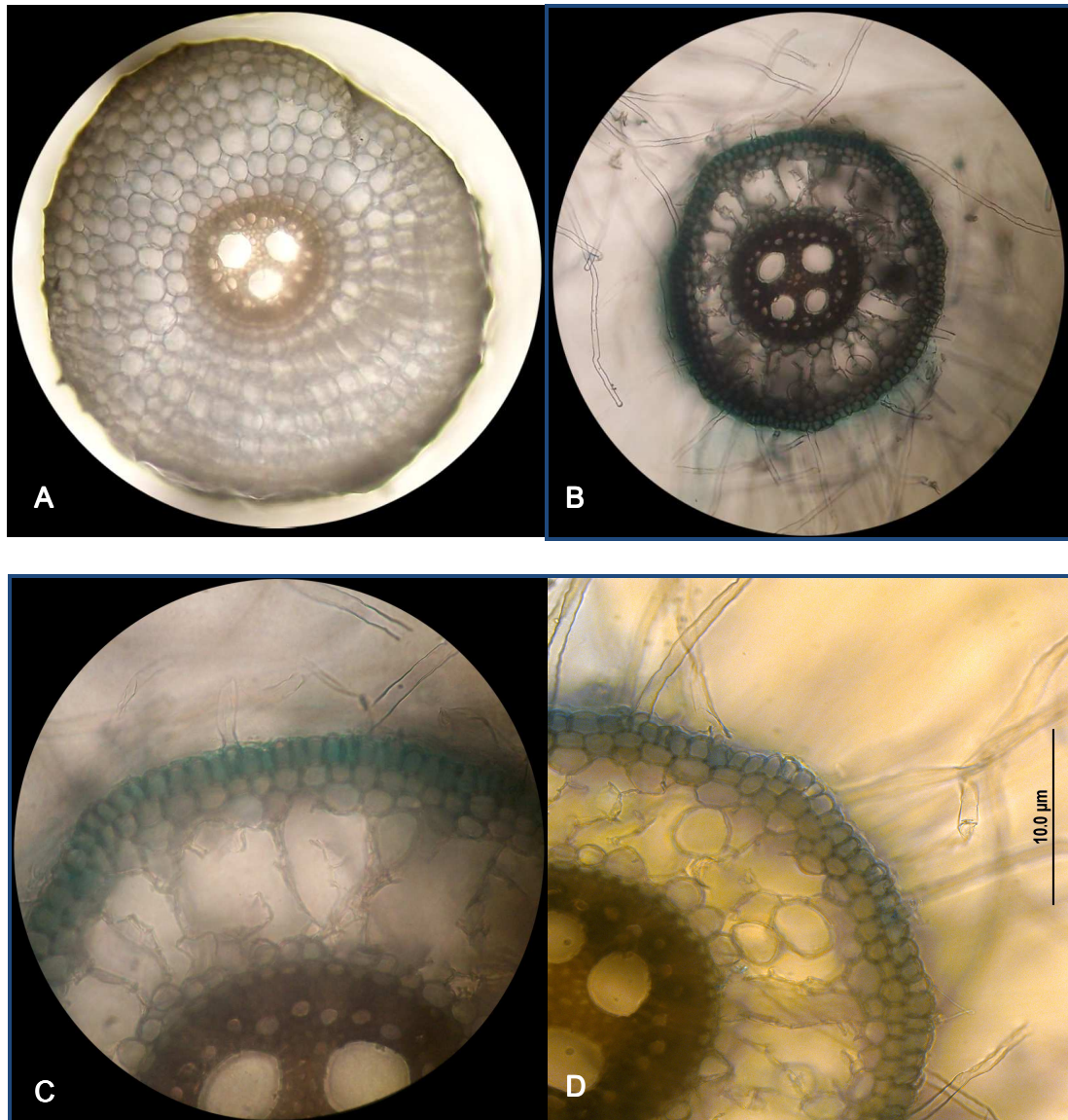


Figura 13: Localización de la actividad GUS en cortes transversales de raíces de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con la cepa 79.1 y 59.2 desarrolladas en condiciones gnotobióticas, durante 16 días. A) control sin inocular (100X), B y C) raíces de plantas inoculadas con la cepa 79.1 (100X y 200X respectivamente), D) raíces de plantas inoculadas con la cepa 59.2 (200x).

III.4. DISCUSIÓN

Efecto de la inoculación sobre el crecimiento de dos variedades de maíz

En este capítulo se determinó el efecto de la inoculación de dos variedades de maíz con 8 cepas bacterianas elegidas por su capacidad de fijar N₂, producir AIA, solubilizar fosfatos e inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro*. En el primer ensayo se evaluó el crecimiento de la radícula a las 48 h de la inoculación (cuadro 2). En el siguiente ensayo de inoculación en condiciones gnotobióticas se determinó el peso seco de la parte aérea y de la raíz a los 15 días de la inoculación (Fig. 2 y 3). En el tercer ensayo de inoculación en macetas con mezcla suelo/arena no estéril (1/1), se evaluó el peso seco de la parte aérea y el efecto de la inoculación sobre el número y diversidad de la comunidad de diazotrofos endófitos de raíz y rizosféricos. Los efectos de la inoculación fueron variables en los ensayos, observándose diferencias entre las cepas y entre las variedades de maíz.

En el ensayo donde se evaluó el largo de la radícula y en el ensayo en condiciones gnotobióticas, algunas cepas demostraron capacidad de promover el crecimiento, lo que indica un efecto temprano de la inoculación en el crecimiento de la planta. Jacout *et al.*, (1999) señalaron que un contacto de 48 h entre las semillas de maíz y las bacterias PGPB era suficiente para asegurar un efecto significativo en el desarrollo vegetal y que el mayor efecto provocado por *Azospirillum lipoferum* en el crecimiento de maíz se daba en las etapas iniciales del crecimiento.

En este trabajo se observó una correlación positiva entre la biomasa aérea y la biomasa radical de plantas inoculadas de la variedad PAU871 crecidas en condiciones gnotobióticas, lo que indicaría que la inoculación provocó mayor desarrollo de la raíz y como consecuencia mayor absorción de nutrientes y mayor crecimiento. Todos los aislamientos evaluados produjeron ácido indol acético (AIA) en el medio TY con triptofano (cuadro 1). El AIA es sintetizado a partir de triptofano en la mayoría de las bacterias del suelo (Kravchenko y Leonova, 1993; Sarwar *et al.*, 1992) y es considerado como uno de los principales

mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal (Mehnaz y Lazarovits, 2006; Okon y Labandera, 1994), ya que produce un mayor desarrollo de la raíces laterales aumentando la absorción de nutrientes (Yanni *et al.*, 2001).

Sin embargo, en las plantas de la variedad NK940 no se observó correlación positiva entre el crecimiento de la raíz y el de la parte aérea. Si bien en todas las cepas se detectó la producción de AIA, éste fue medido en medio TY con el agregado de triptófano, mientras que en los ensayos de inoculación el medio TY utilizado para el crecimiento de las cepas no contenía triptófano, lo que pudo llevar a que las cepas no produjeran AIA. Por otro lado, la producción de AIA puede variar con múltiples factores como el tiempo de incubación (Mehnaz *et al.*, 2010) y la presencia de exudados radicales (Benizri *et al.*, 1998).

Los genotipos de maíz utilizados en los ensayos de inoculación son genéticamente diferentes y respondieron de forma distinta a la inoculación. En general, las plantas de la variedad PAU871 respondieron de forma positiva a la inoculación tanto en condiciones gnotobióticas como cuando se desarrollaron en suelo:arena. Sin embargo, la respuesta a la inoculación de las plantas de la variedad NK940 fue variable, observándose valores de biomasa aérea superiores, iguales e inferiores a los producidos por el control. Varios trabajos señalan que el genotipo de maíz influye en la respuesta a la inoculación con cepas de *Azospirillum* (Arsac *et al.*, 1990; García de Salomone *et al.*, 1997; García de Salomone y Dobereiner 1996). Resultados similares fueron observados por Riggs *et al.*, (2001) al inocular 15 genotipos de maíz con 23 cepas PGPR aisladas de maíz y otras gramíneas. Mehnaz y Lazarovits, (2006) encontraron que al inocular 4 cultivares de maíz con *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, *G. diazotrophicus*, *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* obtuvieron una respuesta positiva en dos de ellos, mientras que los otros cultivares no respondieron a la inoculación. Se ha postulado que las diferencias entre los genotipos se deben a la especificidad en la asociación planta-microorganismo, a las diferencias en exudados radicales y a la eficiencia en la difusión de gases (Ladha *et al.*, 1986 citado por Mehnaz *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en el capítulo I de esta tesis, demostraron que las dos variedades de maíz estudiadas presentaron respuesta diferente a la fertilización nitrogenada. El peso seco de la parte aérea de las plantas de la variedad PAU871 se incrementó proporcionalmente a la fertilización nitrogenada, mientras que en la variedad NK940 no se observaron diferencias significativas entre la dosis de 40 Kg N/ha y la de 80 Kg N/ha. Dado que estas variedades presentaron respuesta diferente al agregado de N, se puede suponer que la respuesta a la inoculación con bacterias fijadoras de N₂ sea también diferente. Por otro lado, en el capítulo I empleando la técnica de T-RFLP se demostraron diferencias en las comunidades de diazotrofos asociados a cada variedad. Esto nos llevaría a pensar que la respuesta a la inoculación podría deberse a la capacidad de estas variedades de maíz de permitir la colonización de sus raíces por las bacterias utilizadas en la inoculación.

Existen múltiples factores que afectan e influyen en las interacciones microorganismo-planta. Se observó que los resultados obtenidos de los ensayos de inoculación fueron variables y en general no concuerdan los resultados obtenidos en el ensayo en condiciones gnotobióticas con los obtenidos del ensayo en macetas con suelo. Esto puede ser explicado ya que se trató de plantas de estado fenológico diferente, sustratos, y métodos de inoculación distintos, así como la presencia de cepas nativas que pueden influir en la competencia y capacidad de las cepas de sobrevivir en la rizósfera. A pesar de la variabilidad observada, se destaca el resultado obtenido con la cepa 10R de *Raoultella terrigena* en la variedad PAU871, donde la inoculación promovió significativamente la elongación de la radícula a las 48 h de germinadas las semillas y el crecimiento de la parte aérea en plantas crecidas en condiciones gnotobióticas y en las macetas con suelo:arena no estéril. Este resultado es auspicioso e indicaría que esta cepa puede ser capaz de promover el crecimiento de las plantas de maíz de la variedad PAU871, aunque es necesario continuar los estudios realizando ensayos en invernáculo y en campo.

La cepa 10R fue capaz de crecer en un medio sin N combinado, solubilizar fosfato tricálcico, inhibir a *Fusarium oxysporum in vitro* y producir 93 µg.mL⁻¹ de AIA en medio de cultivo con triptofano (Cuadro 1). Si bien los resultados no permitieron dilucidar el o los

mecanismos por los cuales esta cepa promueve el crecimiento de la variedad PAU871 de maíz; podría tratarse de la combinación de varios mecanismos, como ha sido propuesto para otras bacterias PGPB (Bhattacharjee *et al.*, 2008; Mehnaz y Lazarovits, 2006).

Efecto de la inoculación en el número y perfil de la comunidad de diazotrofos

En el ensayo de inoculación con plantas crecidas en suelo:arena, se determinó el número de bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas de raíces (NMP en medio jNFb). Los resultados demostraron que la inoculación con estas 5 cepas diazotrofas provocó un aumento significativo del número de bacterias diazotrofas en el suelo rizosférico pero no en el interior de las raíces de las plantas de maíz (Cuadro 3). Esto puede indicar que estas bacterias no poseen la capacidad de colonizar los tejidos de la raíz sino que pueden sobrevivir y permanecer en la rizósfera. Por otro lado, no puede descartarse que en las condiciones en las que se realizó el ensayo, las cepas no colonizaron las raíces por incidencia de algún factor biótico o abiótico, o que si lo hicieron esa colonización no provocó un cambio sustancial en el número de bacterias presentes en los tejidos.

El análisis de las comunidades de diazotrofos rizosféricos y endófitos de las plantas de la variedad PAU871 inoculadas con las cepas 10R, 55T, 59T y 79S mediante la técnica de T-RFLP demostró que la inoculación provocó un cambio en las comunidades endófitas de las plantas. El cambio observado fue mayor en las plantas inoculadas con la cepa 10R en relación al resto de las cepas. La estructura de la comunidad de diazotrofos endófitos de estas plantas fue diferente a la del resto de las plantas inoculadas y al control sin inocular ya que se determinó la presencia de 3 T-RFs únicos en estas plantas. Este resultado podría explicar el mejor desarrollo de las plantas inoculadas con la cepa 10R y posiblemente estos biotipos presentes en las plantas inoculadas con la cepa 10R y ausentes en el resto de las plantas, fueron los responsables de la promoción del crecimiento vegetal. La amplificación y secuenciación del gen *nifH* de la cepa 10R nos permitiría determinar si alguno de estos T-RFs presentes en la comunidad endófitas de las plantas inoculadas con la cepa 10R coincide con el o los T-RFs de esta cepa.

En futuras investigaciones resultaría interesante determinar si la cepa 10R, aislada de la variedad NK940, no promovió el crecimiento de esta variedad debido a que no es capaz de colonizar activamente las raíces de esta variedad o la causa se encuentra en una respuesta de la planta. Para algunos microorganismos se han determinado diferencias en la colonización en diferentes variedades. Murty y Ladha, (1987), señalaron diferencias en la colonización de *Azospirillum lipoferum* 34H entre los cultivares de arroz IR42 e IR50. James *et al.*, (2002) señalaron que *Herbaspirillum seropedicae* Z67 fue capaz de colonizar de forma más agresiva el cultivar de arroz IR72 que el cv IR42; sin embargo, sólo el cv IR42 mostró diferencias significativas en porcentaje de N acumulado y en el N proveniente de la atmósfera en relación al control sin inocular, indicando que además de las diferencias en la colonización, estos cultivares presentan diferente respuesta a la inoculación.

Colonización y localización de las bacterias en las raíces

Las paredes celulares de los vegetales están compuestas principalmente de celulosa, embebida en una matriz amorfa de hemicelulosa, pectina, glicol y proteínas (Myers y Hubbell, 1987). Dado que se ha propuesto que la actividad hidrolítica de las bacterias endófitas puede estar relacionada con la invasión de los tejidos vegetales (Mostajeran *et al.*, 2007; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006), se evaluó la capacidad de las bacterias seleccionadas de hidrolizar pectina y carboximetil celulosa (CMC) en ensayos en placas de Petri. La mayoría de las cepas fueron capaces de producir halos de hidrólisis en el medio de cultivo con 0.5% de pectina y con 0.25% de CMC, pero no con 1% de CMC. Si bien el número de aislamientos analizados fue bajo, los resultados indican que la capacidad de hidrolizar pectina y CMC al 0.25% parece frecuente en las bacterias endófitas de raíces y tallos y en las de suelo rizosférico (Fig. 7 y 8). Los resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que han encontrado que diversos diazotrofos pueden hidrolizar estos polímeros; Prakamhang *et al.*, (2009) determinaron que de 51 diazotrofos endófitos de arroz, 61% presentaron actividad pectinolítica y 96% presentaron actividad celolítica (en medio de cultivo con 0.25% de CMC) y Pariona-Llanos *et al.*, (2010) evaluaron la actividad pectinolítica y endoglucanasa de diazotrofos obtenidos de raíces, tallos y hojas de caña de azúcar con fertilización orgánica y convencional y determinaron que entre el 70 y 80% de

los aislamientos eran capaces de secretar al menos una de las dos enzimas, por lo que los autores sugieren que la capacidad hidrolítica debe ser una característica importante para el establecimiento de los microorganismos en los tejidos vegetales.

Azoarcus sp. BH72 es capaz de colonizar intra e intercelularmente las raíces de plantas de arroz y de dispersarse a la parte aérea sin causar síntomas de enfermedad. Este microorganismo es capaz de producir una endoglucanasa y exoglucanasa (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) y se ha propuesto que el proceso de colonización es dependiente de la actividad celulolítica, sugiriendo un proceso de colonización activo (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006). De modo similar, James *et al.*, (2002) demostraron que *H. seropedicae* Z67 y *H. rubrisubalbicans* M4 fueron capaces de hidrolizar pectina y CMC y que ambos microorganismos colonizaron las raíces de plantas de arroz de un modo agresivo luego de 2 días de la inoculación, por lo que los autores postulan que para realizar una colonización tan rápida estos microorganismos deben producir enzimas degradadoras de las paredes celulares.

La producción de enzimas que hidrolizan las paredes celulares en los microorganismos fitopatógenos está ligada a la respuesta de defensa de la planta (Hallmann *et al.*, 1997). En los microorganismos endófitos no patógenos, como *Azoarcus*, *Azospirillum* y *H. seropedicae*, la cantidad de enzima producida es menor que en los patógenos y probablemente se reprime una vez que la bacteria se establece dentro de la planta, lo que explica la escasa o nula respuesta de defensa del huésped (James *et al.*, 2002). Por este motivo, los endófitos no patógenos deberían poseer una actividad hidrolítica moderada. Esta parece ser la condición de los aislamientos evaluados en este trabajo, a excepción de la cepa 32R que presentó mayor actividad pectinolítica (Fig. 8).

Para estudiar la colonización de las bacterias en las raíces de maíz se utilizó el gen reportero *gusA*, el cual ha sido empleado en múltiples investigaciones de bacterias diazotrofas endófitas (Govindarajan *et al.*, 2007; James *et al.*, 2002; Loganathan y Nair, 2003; Rouws *et al.*, 2010). La metodología utilizada permitió marcar con este gen 4 de las 8 cepas en estudio, dos cepas de *Pseudomonas* sp (70T y 79S), una cepa de *Enterobacter* sp. (59T) y la cepa 55T identificada como *Ochrobactrum* sp. Sin embargo, llamó la atención

el hecho de que ninguna de las 3 cepas de *Raoultella terrigena* pudieron ser marcadas con esta metodología.

El ensayo de inoculación realizado permitió demostrar que las cepas marcadas 79.1 de *Pseudomonas* sp. (aislada de suelo de la variedad NK940) y 59.2 de *Enterobacter* sp (aislada de tallo de la variedad PAU871) fueron capaces de colonizar la superficie e interior de las raíces de plantas de maíz de la variedad PAU871. La capacidad de colonizar internamente los tejidos de las raíces ha sido señalada para bacterias del género *Enterobacter* (Hallmann *et al.*, 1997; Quadt-Hallmann y Hallmann, 1996; Zakria *et al.*, 2008) y del género *Pseudomonas* (Lamb *et al.*, 1996; Marek-Kozaczuk *et al.*, 2000; Rediers *et al.*, 2003), por lo que los resultados de esta tesis coinciden con los obtenidos por los mencionados autores.

El número de bacterias en la superficie de las raíces fue superior al encontrado en el interior de las mismas (Fig. 9). Los recuentos realizados en las raíces desinfectadas superficialmente de las plantas inoculadas con los clones 59.2 y 79.1 a los 6 días de la inoculación demostraron la existencia de poblaciones del rango de 10^6 ufc/g de raíz de plantas de maíz de la variedad PAU871. El número de bacterias endófitas fue similar al encontrado por otros autores en bacterias del género *Enterobacter* y *Pseudomonas* (Quad-Hallmann *et al.*, 1997; Zakria *et al.*, 2008). Por otro lado, este resultado demuestra una colonización temprana de los tejidos vegetales. Monteiro *et al.*, (2008) demostraron que la cepa SMR1 de *Herbaspirillum seropedicae* fue capaz de adherirse a la superficie de las raíces de maíz a los 30 min de la inoculación y de colonizar los tejidos de la corteza y la zona vascular luego de 3 días. La colonización rápida de las raíces ha sido señalada para la mayoría de los diazotrofos endófitos independiente de la especie; James y Olivares (1998) señalaron la colonización de los vasos del xilema de caña de azúcar por *Herbaspirillum seropedicae* luego de 2 días de la inoculación, Rothballer *et al.*, (2008) demostraron la colonización de *H. frisingense* en cebada luego de 3 días de la inoculación, Liu *et al.*, (2006) indicaron que *Bacillus megaterium* completaba el proceso de infección de raíces de plantas de maíz en un total de 7 días, llegando en ese tiempo a colonizar la epidermis, la corteza y los vasos del xilema, Govindarajan *et al.*, (2007) señalaron que *Burkholderia vietnamensis*

fue capaz de colonizar la superficie de las raíces de arroz a las 24 h de la inoculación y que las poblaciones de esta bacteria como endófito en raíces llegaban a 2.5×10^7 cel/g.

El número de bacterias en la superficie e interior de las raíces permaneció estable entre el día 6 y el día 13 posterior a la inoculación (Fig. 10), demostrando que las condiciones nutricionales de las raíces fueron suficientes para mantener estas poblaciones microbianas. Resultados similares fueron señalados por Luna *et al.*, (2010) que evaluaron las poblaciones de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en plantas de trigo y sorgo entre el día 3 y el día 30 posterior a la inoculación y determinaron que las poblaciones endófitas de las raíces no variaron significativamente y fueron del rango de 5.5 log ufc/g. Otros autores han señalado que las poblaciones de los endófitos a diferencia de los patógenos comienzan a disminuir luego de 30 días de la inoculación, ya que son capaces de saltar la defensa del huésped en etapas tempranas del crecimiento de la planta pero no en plantas maduras (Hallmann *et al.*, 1997; James *et al.*, 2002).

Las plantas sin inocular no desarrollaron coloración azul luego de la incubación con X-gluc, reafirmando el hecho de que la planta no posee actividad GUS y que por lo tanto la visualización es específica de las bacterias marcadas (Wilson *et al.*, 1995). Las raíces de las plantas de maíz de la variedad PAU871 inoculadas con las cepas 59.2 y 79.1 mostraron patrones de colonización similares a pesar de que se trató de géneros/especies distintas. Se observó una distribución heterogénea de las bacterias sobre las raíces. La misma distribución heterogénea fue observada por Marek-Kozaczuk *et al.*, (2002) que estudiaron la colonización de raíces de trébol por *Pseudomonas fluorescens* y por otros autores que determinaron que esa distribución es común entre los endófitos no patógenos (Hallmann *et al.*, 1997; Hurek *et al.*, 1994; Quadri-Hallmann *et al.*, 1997). A medida que las raíces se desarrollan el microambiente de la raíz cambia, las condiciones fisiológicas, exudados y permeabilidad de agua de cada segmento cambia y con ello pueden variar las bacterias que proliferan en ese ambiente (Bent *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que las vías de entrada de los endófitos a las raíces pueden ser: sitios de emergencia de las raíces laterales, el ápice de las raíces, los pelos radicales o simplemente

entre las células de la epidermis (Cocking 2003; Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). En las plantas de maíz inoculadas con las cepas 79.1 y 59.2 se detectó actividad GUS principalmente en las raíces laterales jóvenes (Fig. 12D y 12E), lo que sugiere cierta preferencia de estas bacterias por ese sitio de colonización, aunque no fue posible determinar con certeza cuál sería la vía de entrada. Es razonable que las bacterias se encuentren en un ambiente donde los nutrientes son abundantes y la liberación de nutrientes está asociada a los tejidos más jóvenes (Bent *et al.*, 2002). Los exudados radicales, ya sea secretados o lisados son liberados por el ápice de las raíces, pelos y sitios de emergencia de las raíces laterales. Varios trabajos señalan la preferencia de los endófitos por los sitios de emergencia de las raíces laterales en distintas gramíneas (Bent *et al.*, 2002; Marek-Kozaczuk *et al.*, 2002; Reinhold-Hurek y Hurek 1998; Roncato-Maccari *et al.*, 2003; Rouws *et al.*, 2010). A pesar de que otros autores han determinado que bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de colonizar los pelos radicales (Rediers *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 1997), en este trabajo no se observó actividad GUS en esa zona de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa 79.1 de *Pseudomonas* sp.

En algunos trozos de raíces se observó actividad GUS en el mucílago que rodea al ápice de las raíces laterales (Fig. 11f). Roncato-Maccari *et al.*, (2003) utilizando una fusión *Pnif-gusA* en *Herbaspirillum seropedicae* inoculado en plantas de maíz, sorgo, trigo y arroz, demostraron expresión de genes *nif* en un número limitado de células presentes en el interior de las raíces pero también en el mucílago externo de las raíces. Los autores señalan que dado que la fijación biológica de N₂ en la planta está limitada por carbono, el material presente en el mucílago serviría de fuente de carbono a la vez que protegería a la nitrogenasa de la represión por O₂.

La observación de cortes transversales de las raíces demostró actividad GUS de las cepas 59.2 y 79.1 principalmente en la zona de la epidermis y con menos intensidad en la zona de la corteza (Fig. 12). En general, el apoplasto, en los espacios intercelulares parece ser el sitio de preferencia de localización de los endófitos (James y Olivares, 1998). Webster *et al.*, (1997) utilizando una fusión *nifD-lacZ* en *Azorhizobium* ORS571 en plantas de trigo y

Roncato-Maccari *et al.*, (2003) utilizando una fusión *Pnif-gusA* en *Herbaspirillum seropedicae* en varias gramíneas, demostraron que las condiciones existentes en los espacios intercelulares son apropiadas para la fijación de N₂.

En algunos trozos de raíces de plantas inoculadas con el clon 79.1 *Pseudomonas* sp., se observó actividad GUS en la zona central de la raíz (Fig. 11c), aunque no fue posible confirmar si estas bacterias se encontraban en los tejidos vasculares ya que los cortes transversales de las raíces no fueron de buena calidad. Otros diazotrofos como *Gluconacetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar (Muthukumarasamy *et al.*, 2002), *Azoarcus* sp. en arroz (Hurek *et al.*, 1994), *Burkholderia* sp. en plantas de arroz (Singh *et al.*, 2011), *Herbaspirillum seropedicae* en sorgo (James *et al.*, 1997), maíz, trigo y otras gramíneas (Roncato-Maccari *et al.*, 2003), *Azorhizobium caulinodans* en arroz (Gopalaswamy *et al.*, 2000), *Enterobacter* sp. y *Pantoea* sp. en arroz (Zakria *et al.*, 2008), han sido detectados en los tejidos vasculares de las gramíneas. La colonización de los vasos del xilema es importante ya que se postula que las bacterias llegan a las zonas aéreas de la planta mediante el transporte por los tejidos vasculares. Lamb *et al.*, (1996) señalaron que *Pseudomonas aureofaciens* fue capaz de moverse desde la rizósfera a los tejidos aéreos de 16 monocotiledóneas y dicotiledóneas. Rothballer *et al.*, (2008) demostraron la colonización de los tejidos de las hojas de plantas de *Miscanthus giganteus* por *Herbaspirillum frisingense*, la observación microscópica de las raíces demostró que esta bacteria fue capaz de colonizar los vasos del xilema y de dispersarse a la parte aérea.

En futuras investigaciones se plantea determinar si este patrón de colonización es igual en otras variedades de maíz, así como determinar si estas bacterias son capaces de dispersarse y colonizar la parte aérea de las plantas de maíz. Por otro lado, no resulta válida la extrapolación de los resultados en condiciones gnotobióticas a condiciones de campo ya que la introducción de competencia puede afectar los sitios de infección disponibles, así como los nutrientes o pueden existir liberación de sustancias antimicrobianas que afecten la sobrevivencia de estas bacterias. Por lo que surge el interrogante de ¿cómo ocurre la colonización en plantas crecidas en suelo? Para este tipo de estudios de colonización se podría utilizar el marcado de las cepas con *gfp* y la observación mediante microscopía confocal, lo que permite imágenes de mayor calidad y eliminar el ruido de fondo provocado por las partículas de suelo.

III.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adejumo T.O., Orole O.O. 2010. Effect of pH and moisture content on endophytic colonization of maize roots. *Scientific Research and Essays* 5: 655-1661.
- Aira M., Gómez-Brandón M., Lazcano C., Bååth E., Dominguez J. 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol. Biochem* 42: 2276-2281.
- Arsac J.F., Lamothe C., Mulard D., Fages J. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10: 640–654
- Benizri E., Courtade A., Picard C., Guckert A. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol Biochem* 30: 1481-1484.
- Bhattacharjee R.B., Singh A., Mukhopadhyay S.N. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:199–209
- Bent E., Breuil C., Enebak S., Chanway C.P. 2002. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* [Dougl.Engelm.]) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions. *Plant Soil* 241: 187–196.
- Bowen G.D., Rovira A.D., 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66: 1–102.
- Chiarini L., Bevivino A., Dalmastri C., Nacamulli C., Tabacchioni, S. 1998 Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl. Soil Ecol.* 8:11–18.
- Cocking E.C., Webster G., Batchelor C. A., Davey M.R. 1994. Nodulation of non-legume crops. A new look. *Agro-Food-Industry Hi-Tech.* Jan 21–24.

- Cocking E.C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252:169-175.
- Dalmastri C. , Chiarini L., Cantale C., Bevivino A., Tabacchioni S. 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecol.* 38: 273-284.
- DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias. 2009/2010. Anuario Estadístico Agropecuario 2010. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. www.mgap.gub.uy/DieaAnterior/Anuario2010/xls/210_053.xls.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:107–149.
- Fahraeus G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbio.* 16:374-381.
- García De Salomone I.E, Döbereiner J. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils* 21: 193-196.
- García de Salomone I.E., Döbereiner J., Urquiaga S., Boddey R.M., 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biol. Fertil. Soils* 23: 249–256.
- Germida J.J., Siciliano S.D., De Freitas J.R., Seib A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:43-50.
- Gopalaswamy G., Kannaiyan S., O'Callaghan K.J., DaveyM.R., Cocking E.C. 2000. The xylem of rice (*Oryza sativa*) is colonized by *Azorhizobium caulinodans* Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 267 103-107.
- Govindarajan M., Balandreau J., Kwon S-W., Weon H.Y., Cunthipuram L. 2007. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. *Microbial Ecol.* 55:21-37.

- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. 1997: Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895–914.
- Hansen M, Kragelund L, Nybroe O, Sørensen J. 1997. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:353–360
- Haseloff J., Siemering K.R. 1998. The uses of green fluorescent protein in plants. En: *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols*. Chalfie M., Kain S. (Eds) Wiley-Liss. Pp 191–220.
- Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* 106: 169–178
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., Van Montagu M., Kellenberger E., 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176: 1913–1923
- Idris HA., Labuschagne N., Korsten L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control* 40:97–106
- Jacout C., Job D., Wadoux P., Bally R. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRTI during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* 45:339–342
- James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N. *et al.* 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 894–906.
- James E.K., Olivares F.L. 1998. Infection and colonization of sugarcane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* 17:77–119
- James E.K., Olivares F.L., Baldani J.I., Döbereiner J. 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J. Experimental Botany* 48: 785–797.

- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M. W. 1987. GUS fusions, β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901–3907.
- Jefferson R.A., Wilson K. J. 1991. The GUS gene fusion system. *En: Plant Molecular Biology Manual*. Eds. S Gelvin, R Schilperoort, D P Verma. pp B14/1 - B14/33. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kennedy I.R., Chouhury A.T.M.A., Kecskés M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems; can their potential for plant growth promotion be latter exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36:1229-1244
- Kobayashi D., Palumbo J. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *En: Microbial endophytes*. Bacon, C. W., White, J. F. (Eds); Marcel Dekker Inc. New York, N Y; pp. 199-233.
- Kravchenko L.V., Leonova E.I. 1993. The use of the root exo-metabolite tryptophan by plant associated bacteria for the biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Mikrobiologiya* 62: 453-459.
- Kumar V., Narula N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fertil. Soils* 28:301-305
- Ladha J.K., Triol A.G, Daroy M.L.G., Caldo G., Ventura W., Watanabe I. 1986. Plant associated N₂-fixation (C₂H₂ reduction) by five rice varieties and relationship with plant growth characters as affected by straw incorporation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32 :91–106.
- Lamb T.G., David W. Tonkyn, and Daniel A. Kluepfel. 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol.* 42: 1112-1120
- Liu X., Zhao H., Chen S. 2006. Colonization of Maize and Rice Plants by Strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology* 52: 186–190
- Loganathan P., Nair S. 2003. Crop-specific endophytic colonization by a novel, salt-tolerant, N₂-fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* sp. from wild rice. *Biotechnology Letters* 25: 497–501.

- Loper J.E., Schroth M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76:386-389
- Luna M.F., Galar M.L., Aprea J., Molinari M.L., Boiardi J.L. 2010. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotech. Lett.* 32:1071–1076
- Marek-Kozaczuk M., Kopcinska J., Lotocka B., Golinowski W., Skorupska A. 2000. Infection of clover by plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* studied by mTn5-*gusA*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 1–11
- Marland G. y Turhollow A.F. 1991. CO₂ emissions from the production and combustion of fuel ethanol from corn energy. *The International Journal* 16:1307-1316
- Mehnaz S., Kowalik T., Reynolds B., Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1848-1856
- Mehnaz S., Lazarovits G. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology* 51: 326-335.
- Montañez A., Abreu C., Gill P.R., Hardarson G., Sicardi M. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biol. Fertil. Soils* 45:253–263.
- Monteiro R.A., Schmidt M.A., de Baura V.A., Balsanelli E., Wassem R., Yates M.G., Randi M.A.F. , Pedrosa F.O., de Souza E.M. 2008. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genetics Molecular Biology* 31: 932-937.
- Mostajeran A., Amooaghaie R., Emtiazi G. 2007. The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. *Plant Soil* 291:239–248

- Murty M.G., Ladha J.K. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.) Biol Fertil Soils 4: 3-7
- Muthukumarasamy R., Revathi G., Seshadri S., Lakshminara Simhan C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. Curr Sci 83: 137–145
- Myers M.L., Hubbell D.H. 1987. Plant cell wall carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 53:2745–2748
- Okon Y., Labandera Gonzales C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*. an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem 26:1591-1601
- Pariona-Llanos R., Ibañez de Santi Ferrara F., Soto Gonzales H.H., Ramos Barbosa H. 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. European J. Soil Biol. 46 :387-393
- Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N. Teaumroong N. 2009. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) Appl. Soil Ecol. 42:141-14
- Quadt-Hallmann A., Hallmann J. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. Can. J. Microbiol. 42: 1144–1154
- Quadt-Hallmann A., Hallmann J., Kloepper J.W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. Can. J. Microbiol. 43: 254–259
- Rediers H., Bonnacarrère V., Rainey P.B., Hamonts K., Vanderleyden J., De Mot R. 2003. Development and application of a dapB-based in vivo expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. Appl Environ Microbiol 69:6864–6874

- Reinhold-Hurek B., Hurek T., 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 29–54.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T., Claeysens M., Van Montagu M. 1993. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. J.Bacteriol. 175:7056-7065.
- Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., Van Montagu M., Hurek T. 2006. An Endoglucanase Is Involved in Infection of Rice Roots by the Not-Cellulose-Metabolizing Endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Molecular Plant-Microbe Interactions 19:181-188
- Riggs P.J., Chelius M.K., Iniguez A.L., Kaeppler S.M., Triplett E.W., 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Aust. J. Plant Physiol. 28: 829–836.
- Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O. 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 39–47.
- Rosenblueth M., Martinez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Mol. Plant Microb Interact. 19:827–837
- Rothballer M., Eckert B., Schmid M., Fekete A., Schlöter M., Lehner A., Pollmann S., Hartmann A. 2008. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. FEMS Microbiol Ecol 66: 85–95
- Rouws L.F.M., Meneses C.H.S.G., Guedes H.V., Vidal M.S., Baldani J.I., Schwab S. 2010. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. Lett. Appl. Microbiol. 51:325–330
- Sarwar M., Arshad M., Martens D.A., Frankenberger Jr. W.T. 1992. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. Plant Soil 147: 207-215.
- Seldin L., Rosado A.S., Cruz D.W., Nobrega A., Elsas J.D., Paiva E. 1998. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-

- associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3860–3868.
- Sessitsch A., Hardarson G., de Vos W.M., Wilson K.J. 1998. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. *Plant Soil* 204: 35–45.
- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. 2001. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces* specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39:23–32.
- Singh M. K., Singh D. P., Mesapogu S., Babu B.K., Bontemps C. 2011. Concomitant colonization of *nifH* positive endophytic *Burkholderia* sp. in rice (*Oryza sativa* L.) promotes plant growth. *World J Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s11274-011-0664-z.
- Teather R.M., Wood P.J 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780
- Tombolini R., Jansson J.K. 1998. Monitoring of GFP-tagged bacterial cells. En: *Methods in molecular biology, bioluminescence methods and protocols*. La Rossa R.A (Ed). Humana Press Inc, Totowa, NJ. Pp 285–298
- Webster G., Gough C., Vasse J., Batchelor C.A., O’Callaghan K.J., Kothari S.L., Davey M.R., Dénarié J., Cocking E.C. 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil* 194: 115–122
- Wilson K. J., Hughes S.G., Jefferson R.A. 1992. The *Escherichia coli gus* operon, induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. En: *GUS Protocols, Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. S Gallagher (Ed). Academic Press, New York pp 7–23.
- Wilson K.J., Sessitsch A., Corbo J.C., Giller K.E., Akkermans A.D.L., Jefferson R.A. 1995. β -glucuronidase (GUS) transposons for ecological studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 141: 1691–1705.

- Yanni Y.G., Rizk R.Y., El-Fattah F.K.A, Squartini A., Corich V., Giacomini A., de Bruijn F., Rademaker J., Maya-Flores J., Ostrom P., Vega-Hernandez M., Hollingsworth R.I., Martinez-Molina E., Mateos P., Velazquez E., Wopereis J., Triplett E., Umali-Garcia M., Anarna J.A, Rolfe B.G, Ladha J.K, Hill J., Mujoo R., Ng P.K., Dazzo F.B. 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. Aust. J. Plant Physiol. 28:845–870
- Yeager C.M., Kornosky J.L., Housman D.C., Grote E.E., Belnap J., Kuske C.R. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. Appl Environ. Microbiol. 70: 973–983.
- Zakria M., Udonishi K., Ogawa T., Yamamoto A., Saeki Y., Akao S. 2008. Influence of inoculation technique on the endophytic colonization of rice by *Pantoea* sp. isolated from sweet potato and by *Enterobacter* sp. isolated from sugarcane. Soil Sc. Plant Nutrit 54: 224–236
- Zinniel D., Lambrecht P., Harris B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C., Arunakumari A., Barletta R. y Vidaver A. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2198-2208.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se evidenció la presencia y diversidad de bacterias diazotrofas endófitas y rizósfericas en dos variedades de maíz (NK940 y PAU871) crecidas con y sin fertilización nitrogenada.

La técnica de *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) empleada para evidenciar cambios en las comunidades de diazotrofos, relacionados al genotipo de la planta y al nivel de fertilización nitrogenada resultó sencilla, rápida y adecuada para generar perfiles de la comunidad diazotrófica asociada a plantas de maíz sin la necesidad de obtener cultivos puros.

El número y la diversidad de bacterias diazotrofas fueron superiores en el suelo rizosférico en comparación a las endófitas de la raíz y el tallo.

El genotipo de maíz afectó el número y la diversidad de bacterias diazotrofas endófitas, con valores superiores en la variedad NK940. Por el contrario, el efecto de la variedad sobre las poblaciones rizosféricas no fue significativo.

Las variedades de maíz estudiadas respondieron de forma distinta a la fertilización nitrogenada; la biomasa aérea de las plantas de la variedad PAU871 se incrementó proporcionalmente con la dosis de fertilizante nitrogenado, mientras que en la variedad NK940 no se observó diferencia significativa entre la dosis de 40 Kg N/ha y la de 80 Kg N/ha.

Se observó un efecto positivo de la fertilización nitrogenada sobre la densidad de diazótrofos endófitos de raíz y tallo, el cual no fue evidenciado en el número de diazotrofos rizósfericos.

La fertilización nitrogenada incrementó la diversidad de diazótrofos endófitos de raíz de ambas variedades. El análisis multivariado de los datos del T-RFLP evidenció menor similitud entre las comunidades endófitas de la variedad NK940 con y sin fertilización que entre las correspondientes de la variedad PAU871, demostrando diferencias en el efecto de la fertilización sobre los diazotrofos de cada variedad.

Los índices de riqueza y de diversidad de Shannon mostraron que la fertilización nitrogenada no afectó significativamente a las comunidades de diazotrofos rizósfericos; sin embargo, el análisis multivariado de los datos permitió diferenciar las comunidades de diazotrofos rizosféricos de plantas con y sin fertilización.

Se estableció una colección de 106 aislamientos de diazotrofos, donde el mayor número se obtuvo de la variedad NK940. En relación al sitio de donde se aislaron, la colección está integrada principalmente por aislamientos de raíz, seguida por los de suelo rizósferico y de tallo. El número de aislamientos obtenidos de plantas sin fertilizar fue similar al obtenido de plantas fertilizadas.

Los aislamientos fueron agrupados según el perfil de restricción del 16S rRNA e identificados por secuenciación parcial del gen 16S rRNA y pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Ochrobactrum* y *Achromobacter*, con predominancia de los géneros *Enterobacter* y *Pseudomonas*.

Los aislamientos presentaron variabilidad en las características promotoras del crecimiento vegetal (producción de ácido indol acético, solubilización de fosfato e inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en cultivos duales).

Las 8 cepas seleccionadas por sus características promotoras del crecimiento identificadas como *Enterobacter* sp. *Pseudomonas* sp. *Ochrobactrum* sp y *Raoultella terrigena*, afectaron en forma variable el crecimiento de ambas variedades en etapas tempranas del desarrollo vegetal.

Se observó una marcada diferencia en la respuesta a la inoculación entre ambas variedades, independientemente del sistema de crecimiento de las plantas (tubos o macetas con suelo). Un efecto positivo en la biomasa aérea de la variedad PAU871 fue consecuencia de la inoculación con la mayoría de las cepas, mientras que en NK940 el efecto fue variable.

La cepa *Raoultella terrigena* 10R fue la única que estimuló significativamente el crecimiento en la variedad PAU871 en los ensayos realizados. La aplicación de la técnica de T-RFLP en las plantas de la variedad PAU871 crecidas en macetas con suelo:arena determinó que la comunidad de endófitos de raíces de plantas inoculadas con la cepa 10R fue la que presentó mayor diferencia con las comunidades del tratamiento control y con el resto de las plantas inoculadas. Sin embargo, las comunidades de suelo rizosférico de las plantas inoculadas con la cepa 10R fueron 90% similares a las del control.

Los aislamientos evaluados presentaron una actividad hidrolítica moderada sobre los polímeros pectina y carboximetil celulosa, que podría contribuir al ingreso de las bacterias a la planta.

Los resultados del estudio de colonización con *Pseudomonas* sp. 79S (aislada de rizósfera de NK940) y *Enterobacter* sp. 59T (obtenida de tallo de PAU871) marcadas con *gusA*, mostraron que ambas cepas son capaces de colonizar las raíces de plantas de la variedad PAU871 con predominio en las raíces laterales jóvenes. Se observó actividad GUS principalmente en la epidermis y con menor intensidad en la corteza. No se detectaron diferencias entre ambas cepas en el número de bacterias presentes en la superficie ni en el interior de las raíces en etapas iniciales del crecimiento radical.

Este trabajo ha permitido verificar que la interacción del maíz con diazotrofos está fuertemente influenciada por múltiples factores, entre los cuales el genotipo de la planta constituye un factor determinante. Los resultados obtenidos aportan conocimientos que permitirán avanzar en la comprensión de los factores que regulan interacciones planta-microorganismo, en el caso de un cultivo de gran importancia económica como lo constituye el maíz.