

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción

**Tesis de Maestría
PEDECIBA Biología, Subárea Microbiología**

Cecilia Taulé

Tutor: Federico Battistoni

**Tribunal: Dra. Alicia Arias
Dr. Jorge Monza
Dra. Claudia Piccini**

**Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Montevideo, Uruguay 2011**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Fede por haberme orientado durante estos años, por alentarme día a día y por la confianza puesta en mí. Y por esa enorme energía que transmite y contagia.

Muuuuuchas gracias a Cintia por la amistad, la compañía, las ideas y opinión y por esas manos que ayudaron mucho!

También quiero agradecer a Margarita y a Claudia por compartir las salidas de campo así como las contribuciones y discusiones del grupo caña.

A Martín por ayudarme y permitirme amigar (temporalmente) con el programa ARB y Linux.

A Fernando Hackembruch del Departamento Agrícola de ALUR por su amabilidad y disposición para los muestreos, dudas y todo lo que pudiera ayudar.

A Alicia Castillo y el personal del Laboratorio de Biotecnología de INIA Las Brujas por las plantas micropropagadas y por las jornadas compartidas mientras aprendía la técnica.

A Verónica Reis del Laboratorio de Gramíneas, EMBRAPA-Agrobiología por recibirme y permitirme realizar una pasantía con ellos y a Sandy por haberme orientado durante la estancia.

A Fabio Olivares del Laboratorio de Biología Celular e Tecidual de la Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por recibirme en su laboratorio y por toda la dedicación brindada. Y a Dani que me acompañó y ayudó durante esos dos meses.

Al Departamento de Microbiología del IIBCE por haberme recibido los últimos meses como parte del grupo. A Claudia por toda la ayuda y el ánimo para realizar el FISH, a Paola y Ana por las ideas y la ayuda para cortar. Y a Matilde por las explicaciones del PCR en tiempo real!

A la ANII por la financiación.

Al tribunal por los aportes.

Y esta tesis tampoco habría sido posible sin el apoyo de **todos** los compañeros del Departamento BIOGEM (ex Laboratorio LEM). Por las vivencias y el apoyo diario y continuo para seguir. A las abejitas del lab, a mi familia y amigos.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1 BIOCOMBUSTIBLES Y EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR	3
1.1 Biocombustibles	3
1.2 La caña de azúcar	4
1.3 El cultivo de caña de azúcar en Uruguay	6
2 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV)	8
2.1 Nitrógeno y fijación biológica del nitrógeno (FBN)	9
2.2 Bacterias endófitas	11
2.2.1 Características del nicho ecológico endofítico	12
2.3 Mecanismos de infección y colonización de los tejidos vegetales	13
3 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN GRAMÍNEAS	16
3.1 Modelos de estudio de la interacción endófito diazótrofo-planta	16
Azoarcus sp. BH72 - plantas de arroz	17
3.2 Fijación biológica de nitrógeno en caña de azúcar	19
OBJETIVOS	21

CAPÍTULO 1

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ENDÓFITOS BACTERIANOS ASOCIADOS A VARIEDADES DE CAÑAS DE AZÚCAR CULTIVADAS EN URUGUAY	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
1 MATERIALES Y MÉTODOS	25
1.1 Formación de una colección de bacterias diazótroficas asociadas a variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay	25
1.1.1 Muestreo de material vegetal y suelo	25
1.1.2 Esterilización superficial de los tallos	27
1.1.3 Aislamiento de bacterias endófitas a partir de líquido apoplástico o del macerado de tallos de caña	27
1.1.4 Purificación de aislamientos bacterianos	29
1.2 Búsqueda de aislamientos diazótroficos	29
1.2.1 Inoculación en medio de cultivo semisólido sin nitrógeno	29
1.2.2 Amplificación por PCR del gen nifH	29
1.2.3 Ensayo de reducción de acetileno (ARA)	31
1.3 Solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético	31
1.3.1 Búsqueda de bacterias solubilizadoras de fosfatos	32
1.3.2 Búsqueda de bacterias productoras de ácido indol acético (AIA)	32
1.4 Identificación de los aislamientos	32
1.4.1 Amplificación por PCR del gen 16S ARNr	33
1.4.2 Estudios filogenéticos a partir del gen 16S ARNr	33

2 RESULTADOS.....	35
2.1 Formación de una colección de probables endófitos bacterianos asociados a variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay	35
2.2 Aislamientos con características diazotróficas	37
2.3 Búsqueda de aislamientos con potenciales características promotoras del crecimiento vegetal (PCV)	40
2.4 Identificación y estudio filogenético de los aislamientos bacterianos	42
3 DISCUSION	49
3.1 Construcción de una colección de aislamientos bacterianos asociados a variedades comerciales de caña de azúcar cultivadas en Uruguay.....	49
3.1.1 Estrategia utilizada para obtener una colección de aislamientos.....	49
3.1.2 Características de la colección de bacterias y relación entre los marcadores utilizados para bacterias diazotróficas.....	49
3.2 Caracterización de la colección de diazótrofos asociados a variedades comerciales de cañas de azúcar	51
3.3 Identidad de las bacterias asociadas a variedades comerciales de caña de azúcar cultivadas en Uruguay	52

CAPITULO 2:

EVALUACIÓN DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE CAÑAS DE AZÚCAR MICROPROPAGADAS POR POSIBLES ENDÓFITOS BACTERIANOS	55
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
1 MATERIALES Y METODOS.....	57
1.1 Cepas bacterianas y plantas de cañas de azúcar utilizadas.....	57
1.2 Búsqueda de bacterias cultivables en plantas de cañas de azúcar micropropagadas	58
1.3 Ensayo de promoción del crecimiento de cañas de azúcar micropropagadas por aislamientos bacterianos seleccionados de la colección	59
2 RESULTADOS.....	61
2.1 Presencia de bacterias cultivables en plantas de caña de azúcar micropropagadas	61
2.2 Respuesta en invernáculo de plantas de cañas de azúcar micropropagadas a la inoculación con bacterias seleccionadas por sus características PCV	61
3 DISCUSIÓN	65

CAPITULO 3:

ESTUDIOS DE LA INFECCIÓN Y LA COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR MICROPROPAGADAS POR POSIBLES ENDÓFITOS BACTERIANOS	69
OBJETIVOS ESPECIFICOS	69
1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1.1 Estudios de la interacción entre plantas de cañas de azúcar micropropagadas y aislamientos bacterianos marcados con genes reporteros	71
1.1.1 Preparación de células competentes de los aislamientos bacterianos	71
1.1.2 Transformación de células competentes de los aislamientos bacterianos.....	71
1.1.3 Inoculación de plantas de caña de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384 con Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662	74

1.1.4 Ensayo de adhesión de Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662 y Shinella sp. UYSO24-pMP4641 a Zea mays (maíz) como planta modelo	74
1.2 Estudio de la interacción entre Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662 y plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 a través de Microscopía Óptica, Electrónica de Transmisión y de Barrido.....	75
1.2.1 Procesamiento de las muestras para estudios de Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Transmisión.....	75
1.2.2 Procesamiento de las muestras para estudios de Microscopía Electrónica de Barrido	76
2 RESULTADOS	77
2.1 Estudios de interacción entre la variedad micropropagada LCP 85-384 de caña de azúcar y Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662 por microscopía de fluorescencia.....	77
2.1.1 Transformación de Enterobacter sp. UYSO10 y Shinella sp. UYSO24 con genes reporteros	77
2.1.2 Estudios de interacción entre cañas de azúcar micropropagadas y Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662.....	80
2.3 Estudios de interacción entre la variedad micropropagada LCP 85-384 de caña de azúcar y Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662 por microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido ..	81
<u>3</u> DISCUSION	89

CAPITULO 4:

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN PLANTAS EN ESTUDIOS DE DINÁMICA POBLACIONAL.....	97
OBJETIVOS PARTICULARES	97
1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
1.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH)	99
1.1.1 Diseño y marcado de sondas específicas.....	99
1.1.2 Hibridación de bacterias con sondas generales y específicas.....	101
1.1.3 Puesta a punto de la metodología para realizar cortes transversales de raíces de caña de azúcar para ensayos de FISH	103
1.2 PCR en tiempo real.....	104
1.2.1 Diseño de cebadores específicos	104
1.2.2 Extracción de ADN	105
1.2.3 Reacción de PCR en tiempo real	107
2 RESULTADOS	109
2.1 Hibridación in situ fluorescente.....	109
2.1.1 Diseño de sondas y puesta a punto de la técnica FISH en cultivos puros	109
2.1.2 Cortes de raíces de caña de azúcar.....	112
2.2 PCR en tiempo real.....	113
2.2.1 Diseño de cebadores y puesta a punto de la técnica PCR en tiempo real	113
2.2.2 Presencia de bacterias endófitas en tallos de caña de azúcar.....	117
3 DISCUSION	119
3.1 Visualización de la interacción: aplicación de la técnica de FISH al modelo caña de azúcar-bacteria PCV.....	120
3.2 Cuantificación de poblaciones de interés: aplicación de la técnica de PCR en tiempo real al modelo caña de azúcar-bacteria PCV.....	123

ANEXO	127
1 MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS	127
2 MEDIOS DE CULTIVO PARA PLANTAS	131
3 OTRAS SOLUCIONES	132
BIBLIOGRAFÍA	135

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Morfología de la planta de caña de azúcar.....	5
Figura 2. Diferentes asociaciones de las comunidades de bacterias promotoras del crecimiento vegetal con plantas.	10
Figura 3. Aplicaciones de las bacterias endófitas de plantas.....	12
Figura 4. Tipos de endófitos y su proceso de colonización.....	15

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ubicación de la ciudad de Bella Unión.	26
Figura 2. Estrategia utilizada para el aislamiento de bacterias endófitas diazotrofas.....	28
Figura 3. Búsqueda de características diazotróficas en la colección.....	38
Figura 4. Búsqueda de características PCV en los aislamientos de la colección..	40
Figura 5. Árbol filogenético de las Alfa y Betaproteobacterias basado en la secuencia del gen <i>16S ARNr</i> de los aislamientos asociados a caña de azúcar	45
Figura 6. Árbol filogenético de las Gammaproteobacterias basado en la secuencia del gen <i>16S ARNr</i> de los aislamientos asociados a caña de azúcar..	45

CAPÍTULO 2

Figura 1. Etapas del proceso de micropropagación de caña de azúcar..	58
Figura 2. Etapas del ensayo de promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar micropropagadas por aislamientos de interés.....	62
Figura 3. Vista del ensayo de PCV de plantas de cañas de azúcar micropropagadas inoculadas con diferentes aislamientos de interés..	63

CAPÍTULO 3

Figura 1. Visualización de la señal del gen reportero incorporado en cepas de <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10 y <i>Shinella</i> sp. UYSO24..	79
Figura 2. Extracción del ADN plasmídico..	79

Figura 3. Vista superficial de raíces de cañas de azúcar micropropagadas e inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662, 24 horas pi.	80
Figura 4. Vista de plantas de maíz inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662 y <i>Shinella</i> sp. UYSO24-pMP4641.	81
Figura 5. Adhesión de la cepa <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662 a raíces y tallos de plantas de caña de azúcar.	83
Figura 6. Micrografías ópticas mostrando la infección de plantas micropropagadas por <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662.	86
Figura 7. Comparación de la afinidad por el colorante azul de toluidina de las bacterias endófitas de plantas micropropagadas e inoculadas con a- <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662 y b- plantas control.	86
Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de cortes de la base del tallo de plantas micropropagadas e inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662.	87
Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de cortes de la base del tallo de plantas micropropagadas sin inocular.	88
Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de cultivos puros de la cepa <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10.	88

CAPÍTULO 4

Figura 1. Esquema de la estrategia utilizada para el diseño y síntesis de sondas específicas para estudios de hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	100
Figura 2. Esquema de la estrategia utilizada para la validación y puesta a punto de la hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas específicas diseñadas en este estudio.	102
Figura 3. Estrategia utilizada en el diseño de cebadores específicos para los aislamientos de interés.	105
Figura 4. Hibridación <i>in situ</i> de cultivos puros con sondas generales.	111
Figura 5. Hibridación <i>in situ</i> de cultivos puros de <i>Shinella</i> sp. UYSO24 con sondas específica para dicho aislamiento.	111
Figura 6. Cortes transversales de raíces de caña de azúcar.	113
Figura 7. Extracción de ADN genómico.	115
Figura 8. Curvas de disociación para los genes conservados.	116
Figura 9. Curvas de disociación utilizando cebadores específicos.	116
Figura 10. Producto de amplificación de la PCR en tiempo real con cebadores para genes constitutivos y cebadores específicos de aislamientos para interés.	117

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo.....	26
Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo.	30
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los suelos de los sitios muestreados.....	36
Tabla 4. Clasificación de la colección de aislamientos asociados a plantas de caña de azúcar cultivadas en Uruguay.	37
Tabla 5. Listado de los aislamientos que presentaron el gen <i>nifH</i> según metodología de aislamiento..	39
Tabla 6. Listado de los aislamientos <i>nifH</i> positivos que redujeron acetileno.	39
Tabla 7. Características PCV de los aislamientos <i>nifH</i> positivos asociados a variedades comerciales de caña de azúcar.	41
Tabla 8. Similitud de la secuencia nucleotídica del gen <i>16S ARNr</i> de aislamientos de caña de azúcar cultivadas en Uruguay.	44
Tabla 9. Clasificación de los géneros bacterianos identificados asociados a cultivos de caña de azúcar en Uruguay.	47

CAPÍTULO 2

Tabla 1. Respuestas de plantas micropropagadas a la inoculación con aislamientos seleccionadas.....	63
---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este estudio.	72
Tabla 2. Resistencia de los aislamientos a diferentes antibióticos.	77
Tabla 3. Listado de los transformantes obtenidos.	78
Tabla 4. Descripción de la presencia y localización bacteriana en los cortes analizados por microscopía óptica.....	84

CAPÍTULO 4

Tabla 1. Características de los cebadores y sondas generales utilizadas en este estudio.	103
Tabla 2. Sondas específicas diseñadas en este estudio para aislamientos de interés.	109
Tabla 3. Especificidad de hibridación de la sonda diseñada para <i>Shinella</i> sp. UYSO24.	112
Tabla 4. Cebadores específicos diseñados en este estudio para aislamientos de interés.	114
Tabla 5. Temperaturas de hibridación/extensión ensayadas para la amplificación con diferentes juegos de cebadores en PCR en tiempo real.	115

RESUMEN

La cadena agroindustrial ha sido fuertemente estimulada en el marco de la producción de biocombustibles con materias primas nacionales y renovables. Este es el caso del cultivo de caña de azúcar, principal materia prima en nuestro país para la producción de bioetanol. El cultivo de caña de azúcar presenta altos costos de producción relacionados a la fertilización química nitrogenada aplicada. Por otra parte es importante destacar que solo el 50 % de los nutrientes suministrados es utilizado por las plantas, perdiéndose el resto por escorrentía o lixiviación, causando graves efectos negativos en el ambiente. El presente trabajo se enmarca en una línea de investigación tendiente a contribuir en la sustentabilidad económica y ambiental del cultivo de la caña de azúcar, mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) en particular endófitas-diazótrofas.

Con dicho objetivo se construyó una colección de 227 posibles endófitos bacterianos, a partir de tallos esterilizados superficialmente de variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay. Del total de aislamientos obtenidos, 86 presentaron el gen *nifH* el cual codifica para una de las subunidades estructurales de la enzima nitrogenasa, clave en el proceso de fijación biológica del nitrógeno (FBN). Entre las características promotoras del crecimiento vegetal (PCV) se evaluó la capacidad de fijar nitrógeno, de solubilizar minerales y de producir fitohormonas. Aislamientos seleccionados por presentar características PCV *in vitro* diferentes perfiles genéticos, fueron identificados. Los análisis filogenéticos mostraron que los mismos se asocian con los géneros: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Shinella* y *Stenotrophomonas*. Ejemplares de dichos géneros han sido reportados como bacterias diazótrofas asociadas y algunos como posibles endófitos de diferentes cultivos. Este trabajo constituye el primer reporte en Uruguay de posibles endófitos bacterianos nativos asociados a caña de azúcar con potencial de promover el crecimiento vegetal.

Por otra parte 6 aislamientos de la colección fueron seleccionados de acuerdo a sus características PCV *in vitro* y su afiliación filogenética: *Enterobacter* sp. UYSO10, *Rahnella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Pantoea* sp. UYSO13 y *Pseudomonas* sp. UYSO14. Los mismos fueron evaluados en ensayos de inoculación de cañas de azúcar micropropagadas (variedad LCP 85-384) en invernáculo. Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables peso seco aéreo y radicular, altura y diámetro basales plantas

inoculadas con *Shinella* sp. UYSO24 y para todas las variables menos peso seco radicular al inocular con *Enterobacter* sp. UYSO10. Mediante técnicas de microscopía, se estudió la interacción entre plantas de cañas de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384 y *Enterobacter* sp. UYSO10, describiéndose por primera vez una cepa del género *Enterobacter* como endófito de plantas de caña de azúcar.

Por último se comenzó con el desarrollo de las técnicas de biología molecular: *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) y *Polymerase chain reaction* (PCR) en tiempo real, para estudiar la interacción planta-bacteria PCV, utilizando como modelo plantas de caña de azúcar de la variedad LCP 85-384 y los aislamientos *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24.

INTRODUCCIÓN

1 Biocombustibles y el cultivo de caña de azúcar

1.1 Biocombustibles

En los últimos años se ha retomado a nivel mundial, el interés en la producción y utilización de biocombustibles. Diversos son los motivos que han llevado a esto incluyendo: 1- la búsqueda de un manejo eficiente de los recursos energéticos, diversificando la oferta existente, 2- la reducción de la dependencia de los combustibles derivados del petróleo y por ende una disminución de las emisiones de gases con efecto invernadero, 3- la promoción de un desarrollo de la agricultura de manera sustentable (144).

En nuestro país, la matriz energética en el año 2009 estaba compuesta por: 58,4 % de petróleo y derivados; 1,4 % de gas natural; 14,1 % de energía eléctrica (3,1 % importada y un 11 % propia de origen hidráulico) y un 26,1 % de biomasa (leña y residuos de biomasa) (Balance energético 2009, MIEM en www.miem.gub.uy). Del análisis de estos porcentajes se desprende la fuerte concentración y dependencia actual en la energía derivada del petróleo, así como la dependencia de fuentes importadas. Asimismo, es de destacar el crecimiento de la energía proveniente de la biomasa, la cual aumentó de un 16-19 % en los años 2006-2007, a un 25-26,1 % en el año 2008-2009. Este crecimiento se debe principalmente al aumento de su uso por la industria (Balance energético 2009).

Dentro del Plan agroenergético nacional (PAN) planteado por el gobierno, se definió la incorporación de biocombustibles a la matriz energética uruguaya. La propuesta es el uso de bioetanol y biodiesel en mezcla con las naftas y el gasoil, con el objetivo de cumplir con la ley N° 18.195 (www.parlamento.gub.uy), donde se encomienda a ANCAP (www.ancap.com.uy) la incorporación de biocombustibles producidos en el país con materias primas nacionales y renovables. En la actualidad el emprendimiento más importante se desarrolla en la empresa estatal ANCAP, la cual ha definido dos grandes proyectos para generar alcohol etílico y biodiesel: el Proyecto Sucro-Alcoholero y el Proyecto Metropolitano. El Proyecto Sucro-Alcoholero, tiene como objetivo la creación de un complejo industrial situado en el norte del país donde se producirá en forma conjunta azúcar y etanol a partir de caña de azúcar, mientras que en el Proyecto Metropolitano se prevé la generación de biodiesel en el sur del país a partir de aceites vegetales principalmente soja y girasol.

En el caso particular de nuestro país, los beneficios posibles del uso de biocombustibles abarcan aspectos energéticos, económicos, sociales y ambientales. El objetivo de estos proyectos es aumentar la soberanía energética de la población, disminuir progresivamente el consumo de petróleo, impulsar el desarrollo de cadenas agroindustriales así como el desarrollo económico y social de regiones deprimidas del país, contribuyendo con prácticas menos nocivas al medio ambiente(144).

1.2 La caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) pertenece a la familia *Poaceae*. Botánicamente no es correcto hablar de *S. officinarum* debido a que los clones cultivados son híbridos provenientes en su mayoría de cruces interespecíficas entre varias especies del género *Saccharum*, principalmente con *S. spontaneum*, variedad que presenta alta resistencia a enfermedades (43). Se postula que el principal centro de origen donde *Saccharum officinarum* habría derivado de *Saccharum robustum* es el sureste asiático. En particular se considera que es en Nueva Guinea donde se encuentra la mayor diversidad genética del género. La caña de azúcar fue seleccionada por sus caracteres de mayor dulzura de los jugos, menor fibra, así como un mayor grosor y vigor de los tallos (43).

Morfología de la planta. En la germinación, el meristema apical de cada tallo da lugar a una serie de nodos e internodos (Figura 1ª). Si se realizan cortes transversales a la altura de los internodos se observa la presencia de tejido vascular rodeado de células de parénquima, limitados por una fina epidermis y una capa exterior de cera. Por su parte cada nodo posee una yema latente, una o más filas de primordios radiculares y el anillo de crecimiento conteniendo el meristema intercalar. Si se realiza un corte transversal del tallo a la altura del nodo no veremos una organización estructurada, a diferencia de los internodos los haces vasculares no son paralelos y se discontinúan. Es a nivel del nodo donde la base de las hojas se encuentra unida de forma envolvente. Las hojas más apicales envuelven completamente el tallo, mientras que las más basales no. De esta forma se define como "collarin" a la hoja de distribución más basal que envuelve completamente el tallo. Las mismas se presentan de forma alternada espacialmente en ese órgano. El tallo constituye en la planta de caña de azúcar el órgano donde se reserva más sacarosa, el principal producto de la fotosíntesis. Dependiendo de las condiciones de crecimiento éstos pueden alcanzar 2 o 3 metros y sus internodos una longitud de 30 cm. Una vez que se alcanza el crecimiento vegetativo y el

desarrollo de la planta llega a una etapa de madurez, el contenido de azúcar en el tallo se incrementa.

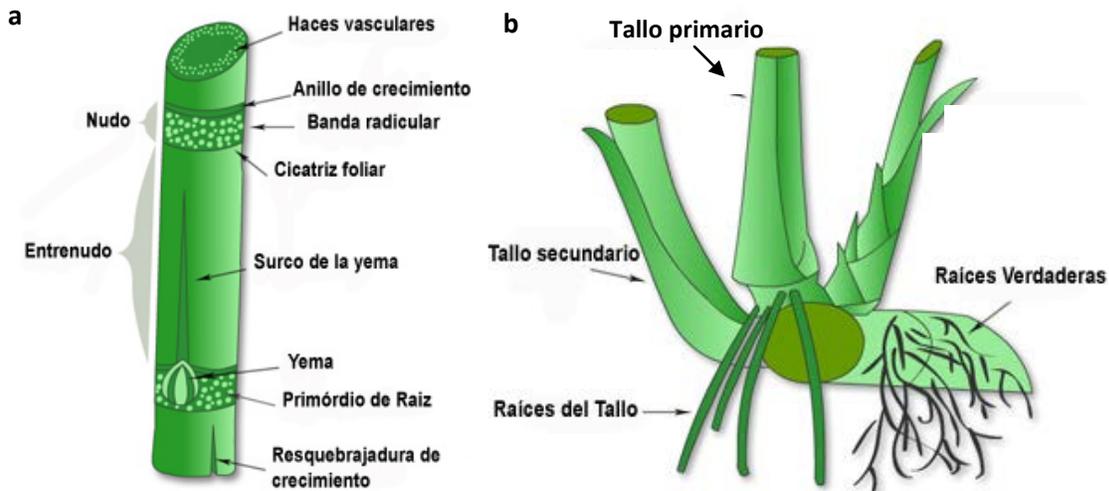


Figura 1. Morfología de la planta de caña de azúcar. a: tallo y b: yema. Tomado de: www.sugacrcanecrops.com.

Cultivo de caña de azúcar. El cultivo de la caña de azúcar se distribuye a lo largo de las fajas limitadas por ambos trópicos, extendiéndose a países en áreas sub-tropicales. Su propagación se realiza asexualmente a partir de las yemas presentes en los tallos. La brotación de las yemas da origen a un tallo primario y de las yemas presentes en el mismo que se encuentran bajo tierra, germinarán tallos secundarios desarrollándose las raíces radicales (Figura 1b). La cosecha del cultivo se realiza antes del período de floración, momento en el cual se reduce el contenido de azúcares del tallo. En la misma los tallos son cortados cerca del suelo dejando la base y el sistema radicular. El rebrote de estas plantas (remanente de la cosecha) dará lugar a una segunda generación de plantas llamada soca 1 y así sucesivamente cada nueva generación: soca 2, soca 3, etc. El rendimiento en cada soca va disminuyendo con respecto a la cosecha anterior debido al acúmulo de daños causados por la cosecha, las prácticas realizadas para el control de plagas y el impacto de posibles enfermedades, motivo por el cual después de 5 ó 6 cortes el cañaveral es renovado.

La plantación se realiza en parcelas llamadas tablones cuyo tamaño depende de las características de producción. El cultivo precisa de la preparación del suelo mediante el uso

de maquinaria y durante la siembra del control de malezas y aplicación de abonos y fertilizantes. Asimismo durante el crecimiento se requiere de riego. El cultivo acumula por temporada entre 100 y 200 kg de N por hectárea, el cual es mayormente removido del campo con la cosecha(116). El único residuo son las hojas senescentes de la planta, pero éstas son normalmente quemadas en prácticas comúnmente realizadas previamente a la cosecha(116).

Industrialización de la caña de azúcar: Una vez cosechadas las plantas, los tallos son transportados a la fábrica, separados de las hojas, machacados y triturados entre rodillos dentados. En esta fase llamada de molienda se extrae por filtración el jugo de caña separándose del bagazo (material sólido y pulposo). El bagazo es quemado para ser utilizado como combustible para la generación de vapor y energía eléctrica. Por otro lado al jugo de caña se le agrega cal llevándose la mezcla a temperatura de ebullición donde los ácidos grasos forman compuestos insolubles junto con otras impurezas que serán filtrados. A su vez el jugo es blanqueado al ser tratado con dióxido de azufre. Posteriormente el jugo procesado es evaporado por calentamiento de la solución hasta formar un jarabe espeso que posee los cristales de azúcar. El jarabe o melaza es separado por centrifugación y los cristales son llevados a la refinería donde son disueltos, decolorados y cristalizados con el tamaño deseado. La melaza es un subproducto valioso que puede ser vuelto a tratar para aprovechar el rico contenido en sacarosa utilizándose para la fabricación de etanol, ron, jarabe de mesa o comida para animales de granja (42).

1.3 El cultivo de caña de azúcar en Uruguay

La plantación del cultivo de caña de azúcar en Uruguay se restringe a la región más norte del país, en los alrededores de la ciudad de Bella Unión, Artigas. La misma se realiza principalmente bajo coordinación de Alcoholes del Uruguay S.A. (ALUR - www.alur.com.uy), empresa cuyo principal accionista es ANCAP. El cultivo de caña de azúcar posee en nuestro país dos objetivos principales: el tradicional con fines alimenticios mediante la producción de azúcar, y su nuevo uso como materia prima en la producción de biocombustibles mediante la generación de alcohol etílico. En el proceso de la cadena productiva se generan además diversos subproductos aprovechables, tales como energía que es usada por la propia industria y la materia seca, sobrante de la cosecha la cual es utilizada como alimento animal. Debido a que se obtienen varios productos a partir del cultivo de la caña de azúcar, a la misma se la

considera como un cultivo multipropósito, hecho que mejora la sustentabilidad del sistema productivo.

Como se mencionó anteriormente, la explotación del cultivo en nuestro país se enmarca dentro del "Proyecto Sucro-Alcoholero", el cual promueve su plantación como cultivo estratégico, de gran importancia económica y social. Dicha iniciativa gubernamental, se propuso como meta el incrementar el cultivo de la caña en el norte del país (de 3.400 hectáreas que había al comienzo del proyecto en el año 2005, a 10.000 hectáreas para finales del 2009). Asimismo, se plantea como objetivo que la producción de azúcar pase de 18.000 toneladas anuales a 50.000, produciendo conjuntamente 15.000 m³ de alcohol carburante. Este proyecto tiene como objetivo cumplir con la ley N° 18.195, donde se encomienda a ANCAP el incorporar biocombustibles producidos en el país con materias primas nacionales, en una proporción de un mínimo obligatorio de un 2 % sobre el volumen total de la mezcla (entre dicho producto y el gasoil) entre el 31 de diciembre de 2008 y el 31 de diciembre de 2011, elevándose a un 5 % a partir del 1° de enero de 2012. Si bien el proyecto aun no ha alcanzado los objetivos planteados inicialmente, la superficie ha ido incrementándose, cosechándose en la zafra 2010/11 unas 6.648 hectáreas de caña de azúcar (Azúcar. Cultivo de Caña y Producción Industrial. Zafra 2010/11, www.mgap.gub.uy) y esperándose alcanzar las 10.000 hectáreas en la próxima siembra (Hackembruch*com.pers.*).

En Uruguay no se cuenta con un programa de mejoramiento de variedades del cultivo de caña de azúcar. La estrategia utilizada por ALUR es estudiar la adaptabilidad de variedades plantadas en la provincia de Tucumán (Argentina) la cual posee un clima muy similar al de Bella Unión. En los últimos años se ha cultivado en un 80 % del área plantada la variedad TUC 77-42 debido al buen rendimiento de cosecha obtenido, repartiéndose el 20 % del área restante entre otras variedades de menor importancia. Actualmente ALUR plantea cambios en las características tradicionales de la plantación tendiendo a la plantación en áreas equivalentes de cinco variedades: TUC 77-42, TUC 78-14, LCP 85-384, CP 92-618 y NA 73-2596. Esta transformación de la plantación busca además de diversificar las variedades cultivadas, alargar el periodo de cosecha utilizando variedades de producción temprana y tardía, contemplando también otras características como es la resistencia a heladas. La cosecha se realiza desde mayo a octubre, comenzando con la quema controlada del tablón y posteriormente el corte manual de los tallos. Uno de los problemas que presenta el cultivo de caña de azúcar en nuestro país son los altos costos de producción relacionados a la

fertilización química nitrogenada necesaria para su óptimo desarrollo, alcanzando aproximadamente U\$S 215/hectárea (Hackembruch, *com. pers.*). A este hecho, se le suma que el cultivo fertilizado utiliza solo un 50% de los nutrientes suministrados, perdiéndose el resto por escorrentía o lixiviación a aguas superficiales y/o subterráneas o por volatilización (desnitrificación). El nitrógeno solubilizado en agua y transportado hacia cuerpos de agua causa gran contaminación por promover el aumento del crecimiento de algas y bacterias, fenómeno denominado eutrofización (51, 56).

2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

Bacterias y plantas han coevolucionado desarrollando distintos tipos de interacciones incluyendo interacciones comensalistas, mutualistas y deletéreas. Desde el punto de vista de la planta, una interacción beneficiosa puede incrementar el crecimiento vegetal (aumento del rendimiento), mientras que una interacción deletérea significa una disminución en el crecimiento de la planta y un posible desarrollo de enfermedad (46). Con respecto a las interacciones mutualistas se conocen dos formas en que las plantas responden a la presencia de las llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV): de forma directa o indirecta.

Los mecanismos de acción conocidos como promotores del crecimiento vegetal directo incluyen la producción de sustancias estimulantes del crecimiento como las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) (41), e incrementos en la capacidad de absorción de minerales como fósforo y nitrógeno (129, 154). También son conocidos mecanismos que estimulan la germinación de semillas así como la emergencia y el establecimiento de las plántulas, a través de la producción y liberación de sustancias fenólicas como las quinonas (46).

Como mecanismos de acción indirectos se describen el control biológico y la estimulación de la resistencia sistémica inducida de las plantas. El control biológico de bacterias y hongos patógenos por parte de las bacterias PCV es llevada a cabo por competencia (por espacio, nutrientes, agua, luz, oxígeno) o mediante interacciones amensalistas como la producción de antibióticos o toxinas específicas como las bacteriocinas (27, 134). Por otra parte, la resistencia sistémica inducida por bacterias PCV activa los mecanismos de defensa sistémicos de la planta confiriendo de esta forma protección frente a potenciales patógenos (158).

Las bacterias PCV pueden encontrarse en vida libre o en asociaciones con plantas como bacterias epífitas (incluye las bacterias rizosféricas), endófitas o en simbiosis con las plantas como es el caso particular de los rizobios en asociación con plantas de la familia leguminosa, formando estructuras especiales llamadas nódulos (Figura 2) (46). Esta clasificación de las bacterias muestra la existencia de diferentes grados de interacción entre bacterias y plantas, resultando en relaciones más o menos laxas. A mayor intimidad en la interacción, se presentarán características más complejas resultantes de un mayor grado de coevolución y traducido generalmente en mejores beneficios para ambas contrapartes. El fenotipo de la interacción es generalmente plástico, dependiendo de la especificidad de genotipo de ambas partes, del estado nutricional y del desarrollo así como también de factores ambientales (127).

2.1 Nitrógeno y fijación biológica del nitrógeno (FBN)

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para los seres vivos siendo parte estructural de las proteínas y el ADN entre otras moléculas de importancia biológica. Particularmente es limitante del desarrollo vegetal ya que es escaso como nutriente en los suelos. Solamente el 2 % del N total del suelo se encuentra en forma mineral asimilable por las plantas. Por este motivo se utilizan frecuentemente fertilizantes nitrogenados en la producción agrícola. Sin embargo, su utilización conlleva los problemas ambientales anteriormente mencionados. Una alternativa a la fertilización química nitrogenada, es el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno (diazótrofos).

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es el proceso por el cual el N_2 atmosférico es convertido en amonio, constituyendo la única forma en que los organismos pueden adquirir este elemento directamente de la atmósfera (32). El N es el principal componente de la atmósfera (80 %) siendo la misma su mayor reservorio ambiental. El 60 % del nitrógeno total incorporado cada año al suelo se debe a la FBN, mientras que un 30 % se debe al proceso industriales de Haber-Bosh y un 10 % proviene de procesos no biológicos realizados en la atmósfera (46). La utilización de la vía biológica de adquisición de nitrógeno, mediante la FBN, disminuye la pérdida de éste elemento en el suelo y el gasto proveniente de compuestos orgánicos altamente energéticos como el petróleo, necesarios para la producción de fertilizantes químicos.

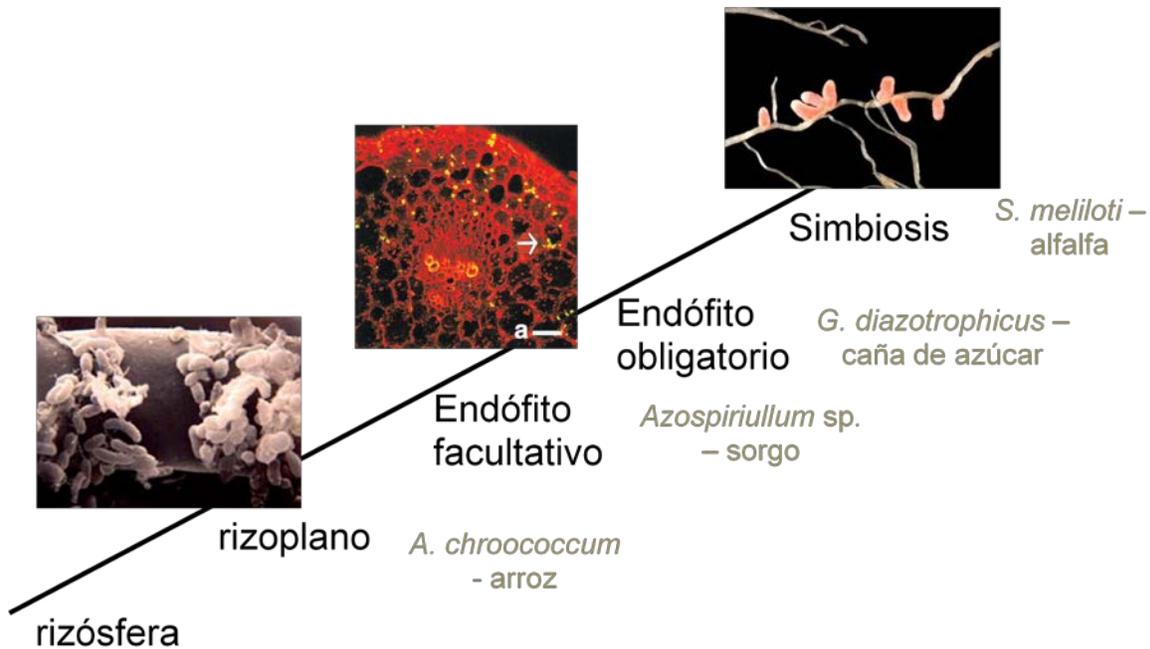


Figura 2. Diferentes asociaciones de las comunidades de bacterias promotoras del crecimiento vegetal con plantas.

La FBN es catalizada por la enzima nitrogenasa. Dicha enzima es la responsable de la reducción del dinitrogeno (N_2), siendo extremadamente sensible al O_2 . La nitrogenasa está integrada por dos componentes metaloproteicos, la dinitrogenasa (componentes Ia y Ib) y la dinitrogenasa reductasa (componente II), codificados por los genes *nifHDK*. La reacción catalizada por la enzima es la siguiente:



Este proceso se encuentra acotado a miembros pertenecientes a las arqueobacterias y eubacterias, siendo estas bacterias muy diversas incluyendo heterótrofas, aerobias, anaerobias, anaerobias facultativas, quimioautótrofas y bacterias fotosintéticas.

2.2 Bacterias endófitas

La etimología de la palabra endófito viene de endo (dentro) y fito (planta), literalmente significa “en la planta”. Wilson y colaboradores en el año 1995 definieron el término endófito en referencia a hongos o bacterias que durante parte o todo su ciclo de vida invaden los tejidos de plantas vivas causando una infección no aparente, o sea no provocan síntomas de enfermedad (156). En este caso el uso del término se aplica a un amplio espectro de huéspedes (bacterias y hongos) y hospederos (plantas e insectos en plantas), así como formas de vida considerando estrategias simbióticas, saprobióticas facultativas y parásitos. De esta forma se incluyen interacciones comensalistas, mutualistas y patogénicas en estado de latencia (127). Sin embargo, el término endófito también ha sido definido con fines prácticos en referencia a las limitaciones experimentales. Es así que Quadt-Hallmann y colaboradores en 1997 definieron el término endófito como aquellas bacterias que pueden ser aisladas o extraídas de tejidos de plantas esterilizados superficialmente y que no causan un daño visible en la misma (107). Esta definición no incluye aquellas bacterias no extraíbles o no cultivables. Posteriormente en 1998, Reinhold-Hurek y Hurek propusieron el criterio para identificar endófitos “verdaderos” (111). El mismo hace referencia a bacterias que no solamente fueron aisladas de tejidos superficialmente estériles sino que además se tenga evidencia microscópica de su presencia dentro de los tejidos. A su vez una bacteria endófitas debe cumplir con el postulado de Koch y ser capaz de infectar nuevos hospederos.

En términos evolutivos a las bacterias endófitas se las considera intermediarios entre bacterias saprófitas y patógenas, considerándolas como bacterias que potencialmente evolucionarán a un estado de patógenos o como bacterias más evolucionadas que han sido conservadas por el beneficio resultante (55). Para explicar la infección asintomática por dichas bacterias, se ha postulado que un balance entre las reacciones antagónicas causadas por endófitos virulentos y las respuestas de defensa de la planta han resultado en una colonización asintomática (127). Por otro lado se ha observado que en general las poblaciones de bacterias endófitas ocurren en más bajas densidades que las de patógenos y algunas no presentan respuestas de hipersensibilidad por parte de la planta (127).

Los endófitos pueden clasificarse como obligatorios o facultativos, siendo los endófitos obligatorios bacterias que dependen del huésped para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión. Por su parte los endófitos facultativos pueden ser caracterizados como bifásicos alternando una fase dentro de la planta y otra en el ambiente, generalmente el suelo (57).

2.2.1 Características del nicho ecológico endofítico

El nicho endofítico constituye un ambiente protegido en comparación con el suelo confiriendo una ventaja ecológica a las bacterias capaces de colonizarlo (55). Las bacterias encuentran en él una fuente de nutrientes y protección frente al estrés ambiental (temperatura, radiación ultravioleta, potenciales osmóticos) y se aseguran su dispersión por transferencia en forma pasiva. Se ha reportado que en algunos casos la dispersión entre hospedadores puede ser dependiente de vectores como insectos (127). La vida dentro de los tejidos permite a estas bacterias interactuar en una forma más directa con la planta pudiendo ser la transferencia de los efectos beneficiosos mayores que en las interacciones rizosféricas (67). Como el nicho ecológico colonizado por las bacterias endófitas es similar al ocupado por los patógenos se ha señalado que son indicadas como agentes de biocontrol (123). Dentro de los beneficios para el hospedador se citan el mejoramiento del crecimiento vegetal por FBN, producción de fitohormonas o solubilización de nutrientes (Figura 3). Por otro lado el nicho endofítico ha sido indicado como un sitio ideal para la transferencia horizontal de genes (123) y la adquisición de nuevas características por parte de las bacterias.

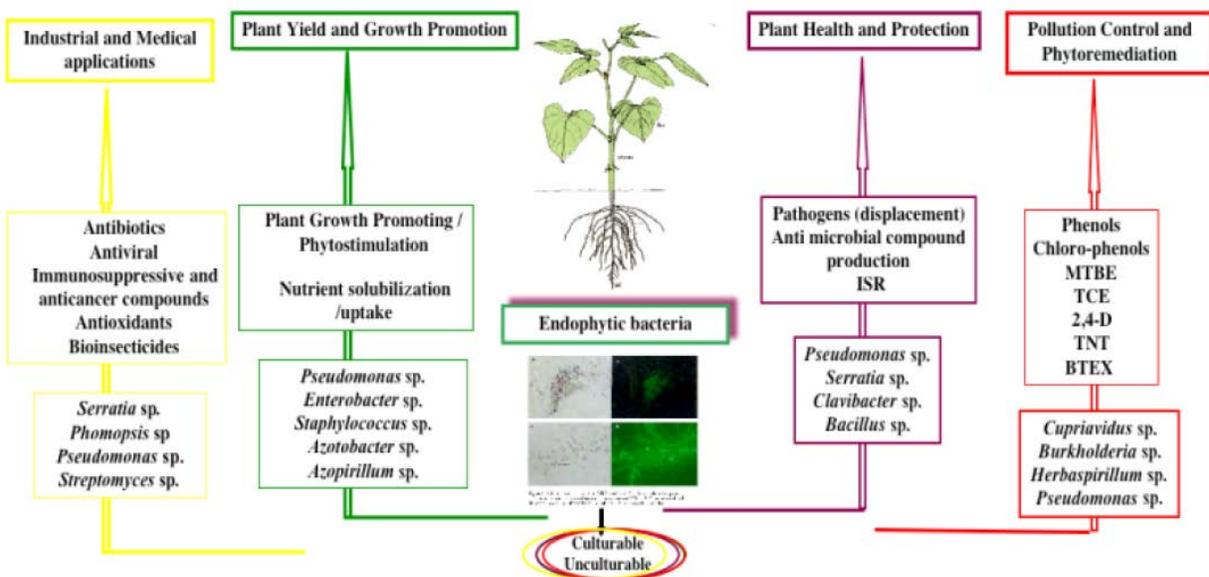


Figura 3. Aplicaciones de las bacterias endófitas de plantas. Tomado de (123).

La comunidad endofítica se encuentra influida por factores bióticos y abióticos, siendo la planta, en este caso, el principal factor biótico. Las bacterias dependen nutricionalmente de la planta por lo que cualquier cambio en ella repercutirá en la comunidad endofítica (55). Se han encontrado bacterias endófitas colonizando todos los tejidos de las plantas los cuales presentan diferentes hábitat ecológicos que a su vez, dependiendo de la complejidad morfológica de cada tejido/órgano, pueden presentar subnichos (123). En general se ha visto que la diversidad y densidad de bacterias endófitas es mayor en la raíz que en el tallo, considerándose que el número total de endófitos es controlado por la planta y factores ambientales (85, 120). Las bacterias endófitas que habitan un hospedador pueden ser clasificadas en ubicuas, específicas (bacterias que solo crecen en un hospedero/tejido), o que presentan preferencia por algún/os hospedador/es o tejido. Esta característica implica el desarrollo de una adaptación huésped-hospedero, huésped/tejido (127).

2.3 Mecanismos de infección y colonización de los tejidos vegetales

Las bacterias endófitas son bacterias epífitas del rizoplano o del filoplano que logran colonizar el interior de los tejidos de las plantas, o que están presentes en las semillas o en el material de propagación vegetativa (55). Se postula que existe una selección por parte de la planta de las bacterias más adaptadas a la vida endófitas siendo éstas "reclutadas" de un gran *pool* de bacterias rizosféricas (120). La interacción de las bacterias con la planta constituye un proceso dinámico que depende de un ambiente adecuado y de factores genéticos. Este proceso involucra el reconocimiento inicial de señales moleculares, seguido del movimiento de la bacteria en dirección de la planta hospedera, su adhesión a la superficie vegetal y posteriormente la penetración y multiplicación en el interior de la misma (114). Una colonización endofítica exitosa involucra un huésped compatible. En gramíneas se ha visto que la inducción de respuestas por parte de la planta contribuye a la restricción de la colonización de las bacterias (123). El proceso que lleva al desarrollo de la interacción ha sido dividido en 3 etapas: 1- la adhesión de la bacteria a la raíz, 2- la colonización de la superficie y 3- el ingreso de algunas células al interior de los tejidos vegetales (114).

Reconocimiento y adhesión. En el caso de los endófitos, los mecanismos de acercamiento espacial pueden ser pasivos, si la bacteria se encuentra en la semilla o en la yema de propagación vegetativa, o activos a través del movimiento por atracción quimiotáctica o

electrostática hacia la superficie de la raíz (120). Entre los quimioatrayentes más comunes de las raíces encontramos los ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos (57). Una vez en la superficie radicular se desarrolla la interacción con la pared celular vegetal a través de uniones electrostáticas débiles, las cuales son rápidas, inespecíficas y reversibles. La interacción bacteriana es clasificada en polar, si la bacteria se asocia por fuerzas puntuales de forma perpendicular a la pared o apolar si la misma se asocia a lo largo de toda su superficie.

Anclaje bacteriano y colonización de superficie. En esta etapa la interacción es específica e irreversible involucrando estructuras bacterianas para la ligación como fimbrias, pilis y modificaciones de la pared celular vegetal. Se ha visto que el establecimiento en los sitios de adhesión puede ser en forma de monocamada, en agregados y/o formando películas bacterianas. Particularmente se considera que los agregados constituyen un microambiente óptimo para la transferencia horizontal de genes así como para las señales de *quorum sensing*, adjudicándole a las finas capas que los cubren, posiblemente compuestas de exopolisacáridos, la función de barrera de difusión de dichas moléculas (94). La adhesión junto con el desarrollo de una población bacteriana presenta una ventaja selectiva para la bacteria, aumentando la probabilidad de ingresar al tejido. Por lo tanto los endófitos que infectan plantas tienen que ser colonizadores competitivos y posicionarse estratégicamente en los sitios de potencial ingreso a la raíz (57) (Figura 4).

Ingreso de las bacterias: infección y colonización. El ingreso bacteriano a los tejidos de la planta normalmente es pasivo y se realiza a través de los estomas, en la base de los tricomas y lenticelas en la parte aérea y en el área de emergencia de las raíces laterales y la cofia en las raíces (63). La infección también puede darse a través de heridas causadas por factores bióticos o abióticos. En algunos casos se han descrito procesos activos de ingreso al tejido vegetal a través de vectores o de la participación de enzimas celulolíticas y pectinolíticas como en el caso *Azoarcus*, *Klebsiella* y *Burkholderia* spp. (27, 64). La colonización por parte de las bacterias ocurre primariamente en los espacios intercelulares reportándose en el caso de *Azoarcus* sp. BH72 su presencia intracelular pero en células muertas. Una vez dentro de la planta, las bacterias endófitas pueden permanecer en un tejido específico o colonizar la

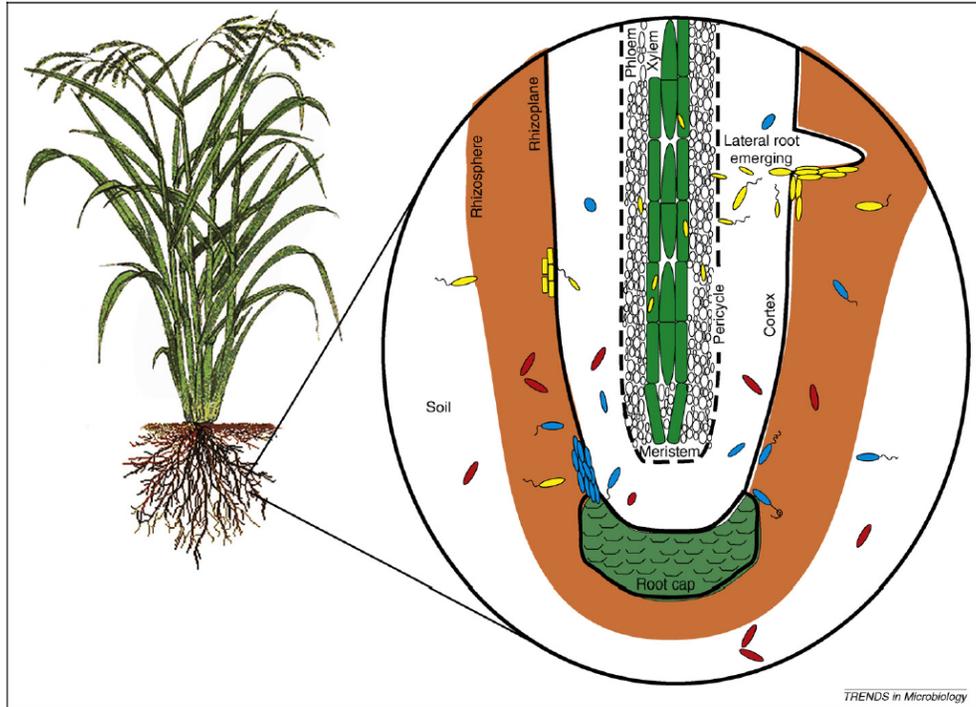


Figura 4. Tipos de endófitos y su proceso de colonización. Eventos estocásticos y factores determinantes de las bacterias llevan a la colonización del hábitat endofítico. Bacterias rojas: endófitos pasajeros, generalmente están restringidos al córtex de la raíz. Bacterias azules: endófitos oportunistas, colonizan el rizoplaneo e invaden los tejidos internos en presencia de aperturas de la emergencia de raíces laterales y en la punta de la raíz. Bacterias amarillas: endófitos competentes: poseen características de endófitos oportunistas y están adaptados al ambiente de la planta. Tomado de (57).

planta sistémicamente transportándose por los elementos conductores o el apoplasto (120). Se considera que las bacterias para atravesar la barrera que constituye la endodermis e ingresar así al tejido vascular, utilizan las rupturas naturales causadas por la aparición de raíces secundarias o lo hacen a través de las células indiferenciadas de la cofia. Hardoim y colaboradores definieron como endófitos competentes a aquellas bacterias que poseen la maquinaria genética para infectar el espacio endofítico y persistir en él (57). Se observó que algunas bacterias endofíticas han adoptado como estrategia exitosa para controlar la respuesta de resistencia de la planta a patógenos, el poder modular los niveles fisiológicos de etileno (57).

Por lo tanto, el estado endofítico de una bacteria particular dependerá de factores probabilísticos como la presencia de los niveles bacterianos necesarios para una colonización

endofítica exitosa y que los mismos entren en contacto con zonas de desarrollo de raíces secundarias. También dependerá de factores determinantes como la presencia de componentes genéticos dedicados a la interacción por ambas partes (57). Asimismo se conoce que dicha colonización aumenta durante el periodo de desarrollo vegetativo de la planta (127).

3 Fijación biológica de nitrógeno en gramíneas

Las bacterias endófitas han demostrado ser benéficas en la promoción del crecimiento vegetal y la salud de varios cultivos (9, 120, 123). La explotación de dicha interacción puede jugar un rol significativo en sistemas agrícolas sustentables tanto para cultivos alimenticios como no alimenticios. Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés en el estudio de BPCV asociadas a cultivos agrónomicamente importantes como arroz, maíz, trigo, caña de azúcar y sorgo, con especial interés en las bacterias que fijan N buscando extender a las gramíneas los conocimientos y usos de la FBN, muy estudiado en cultivos de leguminosas (18, 32). Es así que se han reportado varias bacterias fijadoras de nitrógeno promisorias para su uso biotecnológico en la rizósfera y en el interior de las plantas (152). Se postula que en la interacción endófito diazótrofo-planta, la eficiencia del intercambio del nitrógeno fijado es mayor al ser liberado en el interior de la planta, quedando rápidamente disponible para sus necesidades, en comparación a la interacción bacteria rizosférica-planta (70). Si bien, las bacterias endófitas diazótrofes parecen ser una menor población dentro de la comunidad de endófitos (137), se cree que el aumento en número de dicha población aumentaría el beneficio percibido por la planta a partir de la FBN (120).

3.1 Modelos de estudio de la interacción endófito diazótrofo-planta

El entendimiento de la interacción entre bacterias endófitas diazótrofes y gramíneas es de gran interés y ha sido estudiada en diversos modelos. A continuación se presentan tres modelos que representan distintas plantas hospedadoras y bacterias huéspedes en los cuales particularmente se han realizado estudios para demostrar el efecto de la FBN sobre el crecimiento de la planta. Sin embargo, esto no significa que no existen otros modelos de estudio en los que se han realizado avances en la investigación como es el caso de *Herbaspirillum* spp. con los cultivos de caña de azúcar, maíz, sorgo y arroz.

Azoarcus sp. BH72 - plantas de arroz

La Betaproteobacteria *Azoarcus* sp. BH72 fue aislada de raíces esterilizadas superficialmente del pasto kallar, planta pionera en suelos alcalinos de baja fertilidad de Pakistán. Aunque las bacterias del género no han podido ser aisladas de suelos rizosféricos, se observó que un mecanismo posible de infección de nuevos individuos de pastos kallar podría ser utilizando un hongo ascomicete como vector. Asimismo se ha postulado que el ingreso a las raíces es un proceso activo mediado por una exoglicanasa con actividad celobiohidrolasa y β -glucosidasa y una endoglucanasa (112). En este endófito se demostró también que un pili de tipo IV es necesario para la interacción con la planta (63). La expresión de la nitrogenasa y la FBN se observa en condiciones de microaerofilia y ausencia de altas concentraciones de N. En la planta se observó la transcripción del gen *nifH* y la PCV por otros mecanismos además de la FBN (63).

Azoarcus sp. BH72 coloniza de forma similar plantas del pasto kallar y de arroz. Esta bacteria infecta el córtex radical de forma intra e intercelular, principalmente en el arénquima que es una adaptación del parénquima a condiciones de microanaerobiosis (inundación del cultivo en el caso del arroz). En los casos en los cuales se visualizó una colonización intracelular es de destacar que dichas células se hallaban en estado moribundo o muertas (63). En menor proporción se visualizan bacterias colonizando los haces vasculares de las raíces. En el año 2006 se publicó el primer genoma de una bacteria endófito siendo *Azoarcus* sp. BH72 (72). En dicho estudio se lo caracterizó como un genoma aparentemente desarmado en comparación con el de los patógenos de plantas. Asimismo se describió la presencia de pocas enzimas degradadoras de la pared celular, la ausencia de sistemas de secreción tipo III y IV relacionados a la liberación de toxinas así como de señales de *quórum sensing*. En este genoma se resaltó la presencia de pocos elementos móviles sugiriendo una baja influencia de transferencia horizontal de genes probablemente justificado como una adaptación a microambientes de bajo estrés. También se encontraron genes relacionados con otros factores que podrían actuar en la interacción, entre ellos pili tipo IV, polisacáridos de superficie, sistema de secreción de proteínas tipo I y II, flagelos, proteínas quimiotácticas y un amplio sistema de transporte de sideróforos.

Klebsiella pneumoniae 342 - plantas de trigo

Klebsiella pneumoniae 342 es una Gammaproteobacteria diazótropa que fue originalmente aislada de plantas de maíz. Posteriormente, en estudios de especificidad de hospederos se observó que es capaz de colonizar diferentes cultivos en altas poblaciones (66). Se ha propuesto que las altas poblaciones endófitas encontradas podrían deberse a la falta de flagelos en *Klebsiella*, evitando de esta forma la activación de los sistemas de defensa de la planta. Particularmente para la variedad de trigo Trenton en ausencia de fertilizante N, se observó que la inoculación con *Klebsiella pneumoniae* 342 eliminó los síntomas de deficiencia de N y que pequeñas pero significantes cantidades de N eran asimiladas por la planta. En el mismo estudio se demostró también la expresión del gen *nifH* "en planta" así como la promoción del crecimiento vegetal a partir de la FBN mediante la medida de las variables peso seco, contenido y concentración de N (66). También se observó que la inoculación con dicha bacteria induce resistencia sistémica en plantas.

En el año 2008, Foutsy *colaboradores* publicaron la secuenciación del genoma de *Klebsiella pneumoniae* 342. En él, se predijeron genes de virulencia animal y resistencia a antibióticos, sin embargo en estudios de patogenicidad utilizando ratones como modelo experimental se observó una atenuación de la cepa. Estudios de comparación genómica con el presunto patógeno humano *K. pneumoniae* MGH78578 mostraron que los genes relacionados con la adhesión superficial, transporte, regulación y señalización variaban entre los genomas indicando posiblemente diferencias en las interacciones con sus huéspedes y formas de vida. Es así que el genoma de *K. pneumoniae* 342 fue señalado con la presencia de características patogénicas "atenuadas" postuladas como necesarias para la vida endofíticas en la planta. Entre ellas se describió la capacidad de FBN, la presencia sistemas de reconocimiento, transporte y catabolismo de algunos compuestos vegetales así como la absorción y degradación de derivados como son polisacáridos, compuestos celulósicos y aromáticos. También se encontraron genes relacionados a la resistencia a especies reactivas del oxígeno y al oxido nítrico involucrados en las respuestas de defensa por parte de la planta (44).

Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5- planta de caña de azúcar

Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5 es una Alphaproteobacteria que ha sido aislada de raíces, tallos y hojas de caña de azúcar esterilizados superficialmente en varias regiones del mundo (13, 25, 33, 49). Esta bacteria es ácido tolerante, incapaz de usar nitrato como única fuente de N y presenta la habilidad de FBN en presencia de amonio y altas concentraciones de azúcar. Además presenta otras características PCV como la producción de bacteriocina y actividad antifúngica (17). Es considerada un endófito obligatorio dado que su recuperación en suelos inoculados es muy baja y nula en suelos no inoculados. Sin embargo se conoce que la transmisión de dicha bacteria, una vez establecida en el tejido, se realiza a través del material vegetativo. Estudios de localización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 han mostrado su capacidad de colonizar los espacios intercelulares de la raíz y del tallo (68). A su vez, se propuso que la distribución sistemática se realiza vía los vasos de xilema (50).

En cañas de azúcar micropropagadas (plantas libres de microorganismos) e inoculadas con la cepa *G. diazotrophicus* Pal5 y una cepa mutante *nif⁻*, se demostró la asimilación del N fijado detectándose también PCV independiente de la FBN(129). En el año 2009, Bertalan y colaboradores publicaron el genoma completo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 observando la presencia en el "core" (núcleo) del genoma de genes asociados a mecanismos de PCV incluyendo la producción de auxinas como AIA, de giberelinas y de compuestos volátiles PCV como 3-hydroxi-2-butanona (acetoina). Curiosamente se encontró un número muy elevado de elementos móviles presentes en su mayoría en islas genómicas que fueron relacionadas con funciones en la interacción planta-bacteria. En las mismas se describieron genes asociados con sistemas de secreción tipo IV, flagelos, pili, quimiotaxis, formación de películas bacterianas así como transportadores proteicos y polisacáridos capsulares (17).

3.2 Fijación biológica de nitrógeno en caña de azúcar

Dadas las políticas energéticas y el balance energético positivo que posee la producción de etanol a partir del cultivo de caña de azúcar en Brasil, dicho país viene impulsando desde hace varios años el estudio del efecto de microorganismos PCV particularmente diazótrofos en dicho cultivo. Es así que diversos estudios muestran la importancia económica que posee la FBN en el cultivo de caña de azúcar (147). Se ha reportado que ciertas variedades son capaces de obtener hasta un 60 % del N necesario para su desarrollo a través de la asociación con

bacterias endófitas diazótrofes (21), factor dependiente del genotipo de la planta, de las bacterias asociadas y del ambiente. Particularmente para el caso de Brasil se ha sugerido que, las cantidades bajas de fertilización nitrogenada incorporada en la producción de caña de azúcar por los últimos 100 años, han seleccionado variedades con baja respuesta al nitrógeno fertilizado y con una mayor habilidad para el nitrógeno fijado (22). Estos resultados han llevado a estudiar cuáles son las bacterias responsables de la contribución de N vía FBN en cultivos de caña de azúcar (77).

Se han realizado muchos esfuerzos utilizando técnicas dependientes e independientes de cultivo para el aislamiento e identificación de las bacterias asociadas a este cultivo. Es así que diversas bacterias han sido descritas como asociadas a caña de azúcar, pero como endófitos verdaderos solamente los géneros: *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* (152). En Brasil se está realizando un gran esfuerzo para desarrollar la formulación de un inoculante para este cultivo. Es así que se han evaluado diferentes inóculos bacterianos en cultivares de caña de azúcar utilizando como estrategia un *pool* de bacterias diazótrofes, incluyendo bacterias endófitas (97). Actualmente se ha definido la formulación y se están realizando ensayos de validación del inoculante a campo bajo diferentes condiciones ambientales (suelos, variedad de caña de azúcar, clima). Si bien hay resultados prometedores, los mismos presentan una gran variabilidad y baja reproducibilidad.

Recientemente y con el objetivo de estudiar las bacterias diazótrofes en actividad, se han realizado nuevos enfoques estudiando los transcriptos del gen *nifH* extraídos de plantas de caña de azúcar cultivadas. Curiosamente las secuencias nucleotídicas encontradas presentan similitud con otras bacterias diazótrofes que no son las "típicamente" aisladas y cuya afiliación es con los géneros conocidos como rizobios (23, 145). Estos resultados demuestran que se requieren más estudios con respecto a la interacción entre las bacterias diazótrofes asociadas y las plantas, quien/es son los responsables y qué condiciones favorecen la actividad de dicha población y por ende la FBN.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Contribuir a la sustentabilidad económica y ambiental del cultivo de caña de azúcar en el Uruguay mediante la inoculación de bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal.

La tesis se encuentra estructurada en 4 capítulos que responden a los objetivos particulares planteados.

CAPÍTULO 1

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ENDÓFITOS BACTERIANOS ASOCIADOS A VARIEDADES DE CAÑAS DE AZÚCAR CULTIVADAS EN URUGUAY

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Generar una colección de bacterias diazótrofes asociadas a cultivos comerciales de cañas de azúcar cultivadas en Uruguay.
- 2- Caracterizar la colección bacteriana buscando características promotoras del crecimiento vegetal (PCV) e identificar aislamientos que presenten dichas características.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Formación de una colección de bacterias diazótrofias asociadas a variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay

1.1.1 Muestreo de material vegetal y suelo

Para esta actividad se tuvieron en cuenta las diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivadas y en vías de ser introducidas, así como los diferentes manejos empleado por los productores. Las variedades muestreadas fueron: TUC 77-42, TUC 78-14, TUC 67-27, LCP 85-384, CP 92-618 y FAM 81-77, originarias de Tucumán, Argentina (TUC) y Louisiana, Estados Unidos (CP y LCP). Los sitios escogidos se localizaron en predios pertenecientes a productores coordinados por ALUR S.A. en las afueras de la ciudad de Bella Unión, departamento de Artigas. Los mismos fueron elegidos siguiendo las recomendaciones de los técnicos de la misma empresa.

Fueron realizadas dos giras de prospección en abril y setiembre del 2009, de las cuales se obtuvieron un total de 17 muestras (Tabla 1 y Figura 1). Las mismas incluyeron: suelo (de 0-20 cm de profundidad) y el tercio superior de tallos de 6 distintos individuos de cañas de azúcar maduras. El suelo se almacenó en bolsas plásticas a 4 °C hasta su análisis y los tallos fueron guardados envueltos en papel húmedo dentro de bolsas plásticas.

Una alícuota de 500 g de cada suelo muestreado fue enviada para su análisis al Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de INIA La Estanzuela. Los parámetros analizados fueron: pH del suelo (en H₂O y en KCl), Carbono orgánico (C. org), Nitrógeno (N) nitrato (NO₃), amonio (NH₄), sulfato (SO₄), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe) sodio (Na), capacidad de intercambio cationico (CIC) y Bases totales (Bases T).

Por otro lado, yemas de tallos traídos del campo fueron sembradas en macetas para obtener nuevas plantas. Para esto se utilizaron macetas lavadas con HClO₃ puro y enjuagadas con agua. Como sustrato se utilizó aproximadamente 1 kg de arena lavada con agua corriente y esterilizada dos veces en autoclave por 40 minutos. Trozos de 5 cm de esquejes conteniendo una yema (1 nodo) se limpiaron superficialmente con EtOH 70 % y se sembraron en forma

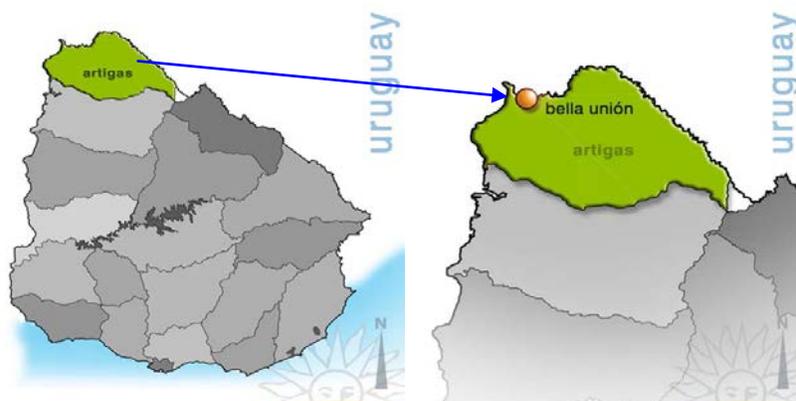


Figura 1. Ubicación de la ciudad de Bella Unión.

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo

Muestra	Coordenadas GPS	Fertilización	Variedad	Observaciones
MUESTREO ABRIL 2009				
A	S 30°20'56,5" W 57°37'19,1"	Alta*	TUC 78-14	Soca 4
B	S 30°20'57,7" W 57°37'15,6"	Alta	TUC 77-42	Soca 4
C	S 30°20'56,5" W 57°37'19,1"	Alta	TUC 77-42	
D	S 30°21'3,5" W 57°37'11,2"	Alta	LCP 85-384	
E	S 30°21'11,5" W 57°37'11,1"	Sin fertilizar	TUC 77-42	Al borde de monte natural
F	S 30°21'11,5" W 57°37'11,1"	Sin fertilizar	TUC 67-27	Al borde de monte natural
G	S 30°20'3,7" W 57°37'3,6"	Baja	CP 92-618	Soca 2
H	S 30°20'0,1" W 57°37'8,9"	Sin fertilizar	TUC 77-42	Al borde del camino
J	S 30°19'56" W 57°36'53,3"	Baja	TUC 77-42	Soca 1
K	S 30°19'51,7" W 57°36'55,2"	Baja	LCP 85-384	Soca 3
L	S 30°19'13,4" W 57°34'45,7"	Baja	FAM 81-77	Soca 1
MUESTREO SETIEMBRE 2009				
N	S 30°20'55,0" W 57°37'23,4"	Alta	TUC 77-42	Soca 4, tallos quemados por frío
O	S 30°19'57,4" W 57°36'53,2"	Baja	CP 92-618	Soca 1
O	S 30°19'57,4" W 57°36'53,2"	Baja	LCP 85-384	Soca 1
O	S 30°19'57,4" W 57°36'53,2"	Baja	TUC 78-14	Soca 1
O	S 30°19'57,4" W 57°36'53,2"	Baja	TUC 77-42	Soca 1
L	S 30°19'13,4" W 57°34'45,7"	Baja	FAM 81-77	Soca 1

*Alta: alta fertilización correspondiente a 150 kg N/ha, Baja: baja fertilización correspondiente a 50 kg N/ha.

horizontal cubriéndose con arena. La brotación se realizó en condiciones de oscuridad a 25 °C, pasando posteriormente a un fotoperíodo de 12 horas (luz/oscuridad). Las macetas fueron regadas en el plato con medio líquido Fahraeus sin nitrógeno (Anexo). A los 30 días se cosecharon las plantas, tiempo en el cual los rebrotes presentaban una altura aproximada de 10 cm (medida desde la base del tallo hasta el collarín). El tallo de las mismas se utilizó como material de partida para el aislamiento de bacterias.

1.1.2 Esterilización superficial de los tallos

Fueron evaluados diferentes métodos de esterilización buscando maximizar la esterilización superficial del órgano, con el menor detrimento en la capacidad de aislar microorganismos de su interior. Se ensayaron 2 procedimientos: el primero se utilizó para los tallos traídos de campo, donde un corte de aproximadamente 5 cm de largo fue sumergido en EtOH 70 % y flambeado 2 veces (34). El segundo método fue utilizado para los tallos de plantas crecidas en el laboratorio y consistió en un primer lavado con EtOH 70% ensayándose diferentes tiempos de exposición (2, 3, 4, 5 y 10 minutos) con el agente esterilizante utilizado (HClO₄ 4 %), seguido de 6 lavados con agua destilada estéril(54). En ambos casos como control de esterilización, los tallos procesados se deslizaron en medio rico sólido TY (Anexo) observándose la ausencia de crecimiento bacteriano a las 24 horas de incubación en estufa a 30 °C.

1.1.3 Aislamiento de bacterias endófitas a partir de líquido apoplástico o del macerado de tallos de caña

Para la obtención de bacterias asociadas a las variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay, se utilizaron dos estrategias: extracción del líquido apoplástico de los tallos o el macerado de los mismos (Figura 2).

En el caso de la extracción del líquido apoplástico, los tallos esterilizados superficialmente se cortaron con el fin de obtener trozos de 5 cm del internodo en el caso de tallos traídos de campo o de tallos provenientes de plantas crecidas. Los mismos fueron colocados en tubos de 30 ml y sometidos a una primera centrifugación a 300 g durante 5 minutos descartándose el líquido obtenido. En una segunda instancia, el material se centrifugó a 3.000 g durante 20 minutos considerándose el líquido obtenido como líquido apoplástico (34).

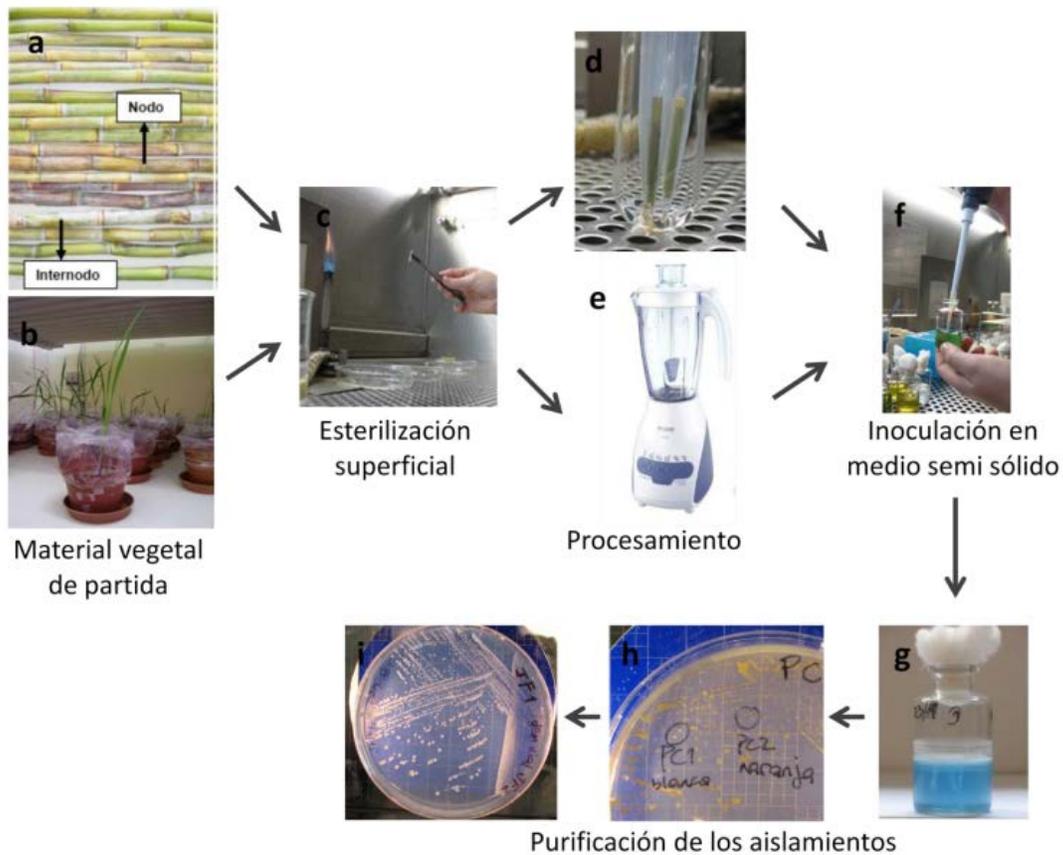


Figura 2. Estrategia utilizada para el aislamiento de bacterias endófitas diazótrofás. a-b) Material vegetal utilizado para el aislamiento de bacterias potencialmente endófitas: a) nodos e internodos de tallos traídos de campo y b) plantas rebrotadas a partir de yemas. c-f: Ilustración del procedimiento utilizado para el aislamiento bacteriano: c) esterilización superficial, d) obtención del apoplasto, e) macerado de los tallos mediante uso de licuadora y f) inoculación de los viales conteniendo medio semisólido sin nitrógeno. g-i: Purificación de los aislamientos: g: visualización de la película de crecimiento característica de bacterias diazótrofás, h: estriamiento de una película de crecimiento en medio sólido sin nitrógeno, i: purificación de los aislamientos en medio rico de cultivo.

Para el macerado de tallos esterilizados, provenientes del campo directamente o provenientes de cañas germinadas en el laboratorio, se utilizó una licuadora doméstica. Los elementos empleados fueron esterilizados superficialmente por inmersión en EtOH 70 % y por exposición a luz U.V. durante 20 minutos. En cada caso 10 g de tallo (nodo) estéril se maceró con 90 ml de NaCl 0.9 % conteniendo 300 µg/ml cicloheximida con la finalidad de inhibir el crecimiento de hongos.

1.1.4 Purificación de aislamientos bacterianos

Con 100 µl de las suspensiones obtenidas a partir de los 2 métodos utilizados para obtener aislamientos bacterianos, se inocularon en profundidad en viales que contenían medios semisólidos semiselectivos sin nitrógeno: LGI, LGI-P y JNFb (Anexo) (115). Los viales fueron incubados a 30 °C por 7 días, evidenciándose el crecimiento bacteriano por la visualización de una película de crecimiento característica de bacterias diazótrofes (152). Los viales "positivos" fueron repicados en viales que contenían el mismo medio. Las películas de crecimiento de aquellos viales en los cuales se observó nuevamente crecimiento bacteriano, fueron estriadas en placas conteniendo el mismo medio, pero sólido. A los 2-3 días se identificaron los diferentes morfotipos de colonias y se aislaron en una nueva placa con el mismo medio de cultivo. La purificación final de las colonias se realizó en medio rico TY (Figura 2).

1.2 Búsqueda de aislamientos diazótrofes

1.2.1 Inoculación en medio de cultivo semisólido sin nitrógeno

Fue evaluada la capacidad de cada aislamiento purificado de crecer en medio de cultivo semisólido sin nitrógeno. Para ello se inocularon 100 µl de un cultivo crecido toda la noche en medio TY, en el centro de un vial con 10 ml del mismo medio semiselectivo empleado en el proceso de aislamiento. Las muestras fueron incubadas en una estufa a 30 °C por 7 días.

1.2.2 Amplificación por PCR del gen *nifH*

Todos los aislamientos obtenidos presentaran o no película de crecimiento en medio semisólido, fueron sometidos a la reacción de amplificación mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) del gen *nifH*. Dicho gen codifica para la subunidad dinitrogenasa reductasa de la nitrogenasa, enzima clave en el proceso FBN. La reacción de amplificación se realizó utilizando como molde de ADN los lisados celulares.

Para esto, una anizada de colonias aisladas crecidas en medio TY sólido fue suspendida en 100 µl de agua destilada estéril, agitándose fuertemente con Vortex. La suspensión obtenida fue centrifugada a 5.900 g por 2 minutos, descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido se

suspendió en 100 µl de NaOH 0.05 M, calentándose a 100 °C por 4 minutos, deteniéndose la reacción por la incubación en hielo por al menos 2 minutos. Finalmente se agregaron 900 µl de agua destilada estéril centrifugándose nuevamente a 5.900 g por 2 minutos. Como solución de trabajo se guardaron 700 µl del sobrenadante a -20 °C (118).

En la reacción de PCR ensayada se utilizaron los cebadores Eufornif y Eurevnif (Tabla 2), que amplifican 327 pb correspondientes a la subunidad dinitrogenasa reductasa. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 2,5 µl de buffer 10 X de PCR, 3,0 µl de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µl de una mezcla de deoxi-nucleótido trifosfatos (dNTPs) 2 mM, 1,0 µl de cada cebador 20 µM, 0,1 µl de Taq polimerasa de Fermentas (5 U/µl) y 2,0 µl del lisado celular. El programa utilizado para la reacción de amplificación fue: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de una primera etapa de 10 ciclos de un minuto a 95 °C (desnaturalización del ADN), un minuto a 60 °C (hibridación de los cebadores al molde de ADN) y un minuto a 72 °C (polimerización del ADN), a continuación una segunda etapa de 25 ciclos de un minuto a 95 °C, un minuto a 59 °C y un minuto a 72 °C, por último se realizó un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72 °C.

El producto de amplificación se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) (Anexo) sometido a 90 V. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y expuestos a la luz U.V. para su visualización.

Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo para amplificar el gen *nifH* y *16S ARNr*.

Cebadores	Secuencia	Referencia
Eufornif	5'-ATYGTCGGYTGAYCCSAARGC-3'	(99)
Eurevnif	5'-ATGGTGTTGGCGGCRTAVAKSGCC-3'	
Eub 27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	(74)
Eub 1492r	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	

1.2.3 Ensayo de reducción de acetileno (ARA)

En aquellos aislamientos que presentaron el gen *nifH*, se evaluó la funcionalidad de la enzima nitrogenasa mediante el ensayo de actividad de reducción del acetileno (58).

Los aislamientos se crecieron en medio rico Dygs (Anexo) a 30 °C con agitación por 24 horas. Con 20 µl de cada cultivo se inocularon viales de 10 ml conteniendo 5 ml (50 % de su volumen) del medio semisólido utilizado para su aislamiento, con excepción de los aislamientos obtenidos en medio LGI, los cuales fueron evaluados en el medio BGMG (Anexo). A los 7 días de incubación a 30 °C, se cambió el tapón de algodón del vial por uno de goma sustituyéndose el 10 % del volumen atmosférico del vial por gas acetileno (1 ml). Los viales fueron incubados a 30 °C por 1 hora. Muestras de 0,5 ml de la parte gaseosa de cada vial fueron inyectadas en un cromatógrafo de fase gaseosa con detector de llama ionizante (Perkin, modelo FII) provisto de una columna Porosa por N de socnia (24). Las medidas de etileno y acetileno fueron registradas por un integrador digital PE Nelson modelo 1022 acoplado al cromatógrafo. Cada aislamiento se evaluó por duplicado.

Las cepas utilizadas como control positivo dependieron del medio de cultivo utilizado en el ensayo: en el caso del medio de cultivo LGI-P se utilizaron las cepas de *Burkholderia tropica* PP8 (BR11366) y *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (BR11285) crecidas por 5 días. Para el medio de cultivo BMGM se utilizó *Azospirillum amazonensis* CBAMC (BR11145) crecida por 5 días y para el medio JNFb se usó *Herbaspirillum seropediacae* Hrc54 (BR11335) crecido por 2 días. Como control negativo se utilizó para cada medio de cultivo un vial sin inóculo.

Modificaciones del ensayo de ARA fueron realizadas con el fin de optimizar las condiciones y contemplar que la diversidad de los aislamientos testados fuese capaz de expresar la nitrogenasa. Las variables evaluadas fueron: la toma de muestras a los 3 y 6 días de crecimiento en medio semisólido, la incubación con acetileno por 1 y 24 horas y el agregado o no de 50 mg de extracto de levadura al medio de cultivo (35, 38, 100).

1.3 Solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético

En aquellos aislamientos que amplificaron el gen *nifH* se realizaron ensayos adicionales con el fin de buscar la presencia de otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PCV), tales como la solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético (AIA).

1.3.1 Búsqueda de bacterias solubilizadoras de fosfatos

La capacidad de solubilizar fosfatos de los aislamientos fue evaluada mediante la formación de halos de solubilización en placas conteniendo medio rico y una fuente de fósforo precipitada, en este caso CaHPO_4 (fosfato ácido de calcio) (153). Para esto, 10 μl de un cultivo bacteriano crecido en Dygs toda la noche y normalizado a una densidad óptica medida a 620 nm (D.O._{620}) de 0.2, fueron sembrados por triplicado en forma de gota en placas conteniendo medio de cultivo GL (Anexo). Un aislamiento se consideró solubilizador de fosfato cuando se observó un halo traslúcido alrededor de la colonia. El diámetro de la colonia y de la colonia más el halo de solubilización fue medido a las 24 horas, 72 horas y 6 días. Como control positivo se utilizó la cepa *Burkholderia tropica* PP8 (149).

1.3.2 Búsqueda de bacterias productoras de ácido indol acético (AIA)

La capacidad de producir auxinas por los aislamientos fue evaluada mediante el método de la microplaca (126). Cada aislamiento a ensayar fue crecido en medio Dygs líquido conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano. La D.O._{620} de los cultivos fue medida a las 24, 48 y 72 horas y en paralelo 1 ml de cultivo fue centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. A 150 μl del sobrenadante obtenido se le agregó 100 μl del reactivo de Salkowski (Anexo), incubándose en la oscuridad por 30 minutos. La reacción fue seguida midiendo la absorbancia a 450 nm. Cada aislamiento fue evaluado por triplicado. La cuantificación del AIA producido por las bacterias se calculó en base a una curva de calibración preparada con diluciones seriadas de una solución patrón de AIA (entre 5-60 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo en este ensayo se utilizaron las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15 y de *Herbaspirillum seropedicae* H54 y como control negativo medio de cultivo sin inocular (11).

1.4 Identificación de los aislamientos

Los aislamientos bacterianos a ser identificados fueron seleccionados en base a la presencia del gen *nifH*, sus características PCV *in vitro* y la diversidad genómica. Esta última fue realizada en el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (IIBCE) mediante la técnica de tipificación *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR) (61) definiéndose 16 grupos diferentes.

1.4.1 Amplificación por PCR del gen 16S ARNr

Se amplificó la casi totalidad del gen *16S ARNr* a partir de 21 aislamientos seleccionados usando los cebadores universales Eub27f y Eub1492r (Tabla 2). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl, conteniendo 5,0 µl de buffer de reacción de PCR 10X, 3,0 µl de MgCl₂ 25 mM, 5,0 µl dNTPs 2,0 mM, 2,0 µl de cada cebador 20 µM, 0,4 µl de Taq polimerasa Fermentas (5 U/µl) y 4,0 µl del lisado celular descrito anteriormente en el punto 3.2.1. El programa de ciclado fue el mismo que el utilizado para la amplificación del gen *nifH*.

El producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (p/v) en buffer TAE sometido a 90 V, teñido con Bromuro de Etidio y observado en luz U.V.

Los productos de PCR fueron secuenciados en MACROGEN Inc. (Corea) a partir de ambos extremos. Las secuencias obtenidas fueron purificadas y empalmadas mediante el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2010) (www.dnabaser.com). Para obtener el género de los aislamientos, las secuencias resultantes se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

1.4.2 Estudios filogenéticos a partir del gen 16S ARNr

Las secuencias de ADN del gen *16S ARNr* editadas fueron alineadas junto con las secuencias de cepas de referencia de los géneros identificados. El alineamiento se obtuvo empleando la herramienta NAST (31) del Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>). Los árboles filogenéticos fueron construídos usando 1507 nucleótidos con el programa Mega4 (142). Para ello se utilizó el algoritmo Neighbour-joining (124), con el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura dos parámetros. La robustez de las ramas del árbol fue estimada con un bootstrap de 1.000 réplicas (132).

2 RESULTADOS

2.1 Formación de una colección de probables endófitos bacterianos asociados a variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay

Se realizaron dos giras de prospección en los meses de abril y setiembre del 2009, en predios de productores de caña de azúcar que están bajo la coordinación de técnicos de ALUR S.A. en Bella Unión, departamento de Artigas. El recorrido por el área elegida, reveló marcadas diferencias entre los predios de los agricultores en cuanto a las variedades de caña utilizadas, años del cultivo (soca 1, 2, etc.) y fertilización química nitrogenada aplicada. A la hora de seleccionar las parcelas de muestreo, se puso especial énfasis en elegir aquellos sitios que tuvieran información detallada sobre la fertilización utilizada por el agricultor. Teniendo en cuenta la alta incidencia de la fertilización en los cultivos de caña de azúcar y a efectos comparativos, se decidió elegir plantas de cultivos con alta fertilización: 150 kg N/ha, baja fertilización: 50 kg N/ha y sin fertilización nitrogenada en los últimos 4-5 años. En cada sitio de muestreo seleccionado (Tabla 1) se colectaron tallos de 6 plantas elegidas al azar dentro de un tablón. Asimismo se analizaron las propiedades fisicoquímicas de los suelos correspondientes (Tabla 3). No todos los sitios muestreados fueron analizados, ya que se consideró que las propiedades fisicoquímicas del sitio de muestreo N son semejantes a las de los sitios A, B, C y D y la del sitio O semejantes a las muestras de suelo J, K y G. Para los sitios E, F y H no se realizó análisis de suelos debido a que son plantas aisladas, crecidas al costado de caminos de acceso a los tablones. El pH de los suelos fue cercano a 6, excepto para las muestras J y K que fue de 8,3. En los sitios A, B, C y D que corresponden a tablones de alta fertilización natural, como es de esperar se observaron valores más elevados de N mineral disponible para las plantas, P y K.

Para el aislamiento de bacterias asociadas se ensayaron las metodologías de extracción del apoplasto del internodo de tallos traídos de campo y a partir de tallos de plantas crecidas en el invernáculo, así como el macerado de los nodos de tallos traídos de campo. El método de esterilización superficial de los tallos de plantas germinadas que resultó más adecuado fue el que empleó 10 minutos en HClO_4 . La puesta a punto de la metodología de aislamiento bacteriano se realizó con las muestras de la primera salida, seleccionándose como metodología el macerado de nodos de tallos de caña debido a que presentó mayor número de viales con formación de la película de crecimiento característica de diazótrofos. Teniendo en

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los suelos de los suelos de los sitios muestreados.

Muestra	Bray I µg P/g	Ca meq/100g	Mg meq/100g	K meq/100g	Na meq/100g	A. Tit meq/100g	CIC pH 7 meq/100g	Bases T. meq/100g	Fe mg/kg
A, B, C*	8,0	12,6	3,0	0,34	0,28	3,8	20,0	16,2	105,2
D	5,1	12,3	3,2	0,23	0,39	3,1	19,3	16,2	68,3
G	5,5	6,9	1,2	0,09	0,23	2,2	10,6	8,4	103,7
J, K*	5,3	9,8	2,5	0,11	0,36	0,7	13,4	12,7	13,1
L	1,0	13,9	4,5	0,15	0,39	2,4	21,4	19,0	129,0

Muestra	S-SO4 µg S/g	pH (H2O)	pH (KCl)	C. Org %	N %	N-NO3 µg N/g	N-NH4 µg N/g	% Sat Bases
A, B, C	3,9	6,0	5,2	1,74	0,16	35,8	63,7	80,8
D	0,7	5,7	4,9	1,14	0,11	16,1	8,6	83,8
G	1,2	6,1	4,8	0,7	0,1	2,1	2,3	79,4
J, K	0,7	8,3	7,0	0,92	0,11	2,7	3,6	94,8
L	2,2	6,5	5,2	1,38	0,14	3,4	6,6	88,8

* en estos casos se utilizó una única muestra de suelo en representación de los sitios de muestreo

Se consideró que las propiedades fisicoquímicas del sitio de muestreo N son semejantes a las de los sitios A, B, C y D y la del sitio O semejantes a las muestras J, K y G.

cuenta este precedente, la totalidad de las muestras de la segunda salida fue procesada por macerado de nodos de tallos traídos de campo, proveniente la mayoría de los aislamientos obtenidos de este último muestreo. De esta forma se obtuvieron en total 227 aislamientos, clasificados en 173 obtenidos a partir de nodos de tallos traídos de campo, 51 a partir de internodos de tallos traídos de campo y 3 de plantas rebrotadas a partir de nodos traídos de campo. En la Tabla 4 se describe la colección bacteriana clasificada según las variedades de caña de azúcar de la que son originarios los aislamientos y los medios de cultivos utilizados para el aislamiento de los mismos.

Tabla 4.Resúmen de la colección de aislamientos asociados a plantas de caña de azúcar cultivadas en Uruguay.

Variedad de caña de azúcar	Medio de cultivo			Sub-total
	LGI	LGI-P	JNFb	
TUC 77-42	27	5	31	63
TUC 67-27	7	3	11	21
TUC 78-14	3	4	16	23
FAM 81-77	13	2	15	30
CP 92-618	15	5	16	36
LCP 85-384	19	13	22	54
Sub-total	84	32	111	
			TOTAL	227

2.2 Aislamientos con características diazotróficas

Con el fin de identificar diazótrofos en la colección obtenida, los aislamientos fueron inoculados individualmente en viales conteniendo medios de cultivos semisólidos sin N. Las bacterias crecidas en medio semisólido sin N buscan la tensión de oxígeno óptima para expresar y permitir la actividad de la enzima nitrogenasa, por lo tanto la altura de la película de crecimiento formada en el vial nos da idea de que grado de aerofilia posee dicho aislamiento. Teniendo en cuenta esto, la colección fue clasificada según la altura de la película a los 7 días de crecimiento. Los resultados mostraron 148 aislamientos capaces de crecer en película de las cuales 123 presentaron crecimiento superficial/sub superficial y 25 crecimiento bajo (Figura 3). Asimismo, lisados celulares de cada uno de estos aislamientos fueron sometidos a la reacción de PCR con el objetivo de amplificar el gen *nifH*. De los 227 aislamientos en los que se buscó la presencia del gen *nifH*, 86 aislamientos mostraron amplificación de un fragmento de ADN de tamaño similar al esperado (Figura 3). Si cruzamos los resultados obtenidos para estas dos propiedades diazotróficas (capacidad de formar película de crecimiento en medio semisólido y amplificación del gen *nifH*), observamos que:

- De los 148 aislamientos que presentaron crecimiento en forma de película en medio semisólido, solamente 61 presentaron el gen *nifH* con los cebadores usados.
- De los 86 aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, 61 mostraron crecimiento en forma de película en medio semisólido (51 películas superficiales, 6 sub superficiales y 4 películas de crecimiento bajas). Los 25 aislamientos restantes no consiguieron crecer en forma de película bajo las condiciones evaluadas.

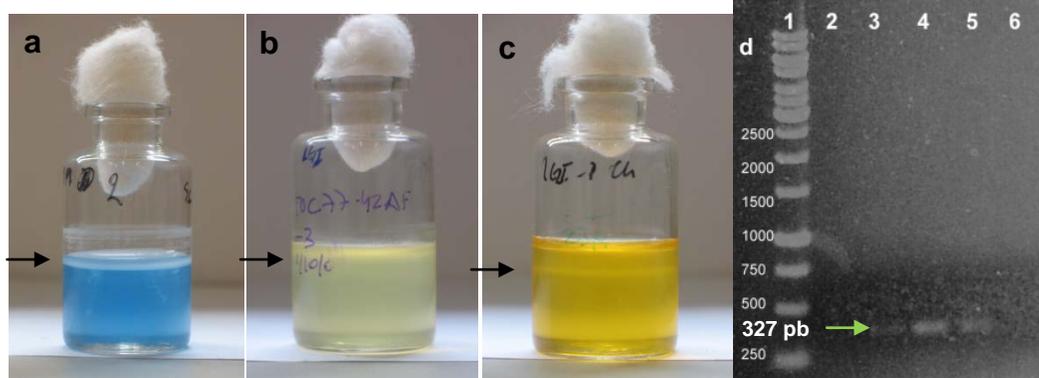


Figura 3. Búsqueda de aislamientos diazotróficos en la colección. **a, b y c-** Visualización de la altura de la película de crecimiento de bacterias diazotróficas en medio semisólido sin N. **a-** película de crecimiento superficial, **b-** película de crecimiento subsuperficial y **c-** película de crecimiento baja. **d-** amplificación por PCR del gen *nifH*. Carriles: 1- Marcador de peso molecular: Generuler 1 Kb Fermentas, 2-control negativo de la PCR, 3 al 5- aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, 6- aislamiento que no amplificó el gen *nifH*.

Los aislamientos a los que se pudo amplificar el gen *nifH* fueron clasificados según: medios de cultivos, método de extracción y variedades de caña de azúcar de la cual fueron aisladas (Tabla 5).

La actividad de la enzima nitrogenasa fue evaluada en los 86 aislamientos que presentaron el gen *nifH* mediante el ensayo de reducción de acetileno. Para ello los aislamientos fueron crecidos en viales conteniendo medio semisólido sin N hasta la detección de la presencia de crecimiento bacteriano en forma de película, realizándose el ensayo de ARA en el mismo vial. Se consideró como un aislamiento ARA positivo, a aquellos en los cuales se observó la formación de un pico correspondiente al gas etileno con un área correspondiente al doble del área obtenida para el control negativo. El ensayo fue utilizado cualitativamente, con el fin de clasificar los aislamientos como "ARA positivo o negativos". En las condiciones ensayadas, solamente se obtuvo la producción de etileno en 12 aislamientos (Tabla 6).

Tabla 5. Resumen de los aislamientos que presentaron el gen *nifH* según medio de cultivo, método de extracción y variedad de caña de azúcar.

Variables		Número de aislamientos (%)*
Medio de cultivo de aislamiento	JNFb	40
	LGI	37
	LGI-P	34
Método de extracción	Centrifugación**	47
	Macerado**	36
Variedad de caña de azúcar	TUC 77-42	27
	TUC 78-14	65
	TUC 67-27	10
	LCP 85-384	24
	CP 92-618	66
	FAM 81-77	43

* Se considera 100% al número total de aislamientos dentro de cada variable.

** El apoplasto fue extraído a partir de internodos y tallos y el macerado de nodos.

Tabla 6. Aislamientos que presentaron el gen *nifHy* redujeron acetileno.

Aislamiento	Variedad de caña de azúcar	Medio de cultivo	Condiciones
UYSO03	TUC 77-42	JNFb	5 días de crecimiento, 1 hora de incubación con acetileno
UYSO14	TUC 78-14		
UYSO19	FAM 81-77		
UYSO21	FAM 81-77		
UYSO27	TUC 78-14		
UYSO30	FAM 81-77		
UYSO36	LCP 85-384		
UYSO97	TUC 78-12	BMGM	5 días de crecimiento, 1 hora de incubación con acetileno
UYSO22	TUC 77-42		
UYSO23	TUC 77-42	LGI-P	7 días de crecimiento, 1 hora de incubación con acetileno
UYSO10	FAM 81-77		
UYSO24	TUC 77-42		

Asimismo, los resultados obtenidos mostraron que el agregado de extracto de levadura al medio de cultivo inhibe la reducción de acetileno bajo las mismas condiciones ensayadas en aquellos aislamientos que mostraron pico de etileno. Cambios en el tiempo de crecimiento de los aislamientos o en el tiempo de incubación con el gas acetileno no mejoraron la producción de etileno, sino que resultaron cambios neutros o negativos.

2.3 Búsqueda de aislamientos con potenciales características promotoras del crecimiento vegetal (PCV)

Con el fin de identificar las características PCV en los aislamientos de la colección, se buscó la capacidad de producir ácido indol acético y de solubilizar fosfatos fueron evaluadas *in vitro* en los aislamientos que evidenciaron la presencia del gen *nifH* (Figura 4). Los resultados mostraron que 17 aislamientos fueron capaces de solubilizar fosfato (Tabla 7) y 46 de producir ácido indol acético en las condiciones ensayadas (Tabla 7). Los aislamientos fueron clasificados en productores de AIA: rápidos (UYSO02, UYSO10, UYSO11, UYSO12, UYSO13, UYSO16, UYSO21, UYSO22, UYSO23, UYSO24, UYSO25, UYSO26, UYSO27 y UYSO28), medios (UYSO03, UYSO05, UYSO06, UYSO08 y UYSO18), o lentos (UYSO07, UYSO17, UYSO20, UYSO29 y UYSO32) teniendo en cuenta el tiempo (20, 42 o 72 horas respectivamente) en el cual se detectó la máxima producción.

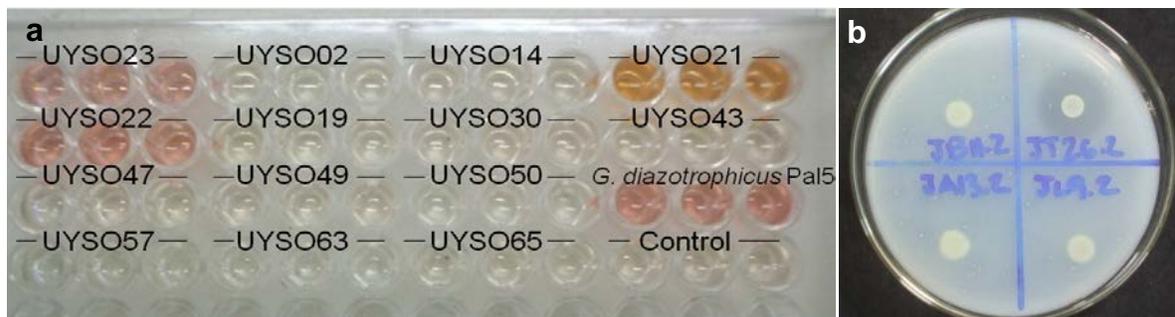


Figura 4. Características PCV en los aislamientos de la colección. **a**-ensayo colorimétrico de Sarkowski para evaluar la producción de AIA, un aislamiento positivo presenta coloración roja en el pocillo de la placa. **b**-ensayo de solubilización de fosfatos, un aislamiento positivo presenta un halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana.

Tabla 7. Características PCV de los aislamientos que presentaron el gen *nifH* asociados a variedades comerciales de caña de azúcar.

Aislamiento*	Variedad de caña de azúcar	ARA	Producción de AIA (µg/ml)	Solubilización de fosfato (relación halo/colonia)
UYSO01	CP 92-618	-	14,66	2,07
UYSO03	TUC 77-42	+	10,03	2,74
UYSO10	FAM 81-77	+	10,66	-
UYSO11	TUC 77-42	-	16,75	2,95
UYSO12	LCP 85-384	-	19,8	-
UYSO13	CP 92-618	-	13,86	2,29
UYSO14	TUC 78-14	+	0	-
UYSO19	FAM 81-77	+	0	1,56
UYSO20	FAM 81-77	-	22,61	-
UYSO21	FAM 81-77	+	13,02	-
UYSO22	TUC 77-42	+	41,07	1,14
UYSO23	TUC 77-42	+	35,64	-
UYSO24	TUC 77-42	+	11,36	-
UYSO25	TUC 78-14	-	6,87	-
UYSO26	LCP 85-384	-	6,88	-
UYSO27	TUC 78-14	+	13,69	-
UYSO28	LCP 85-384	-	16,24	-
UYSO29	CP 92-618	-	31,8	-
UYSO30	FAM 81-77	+	0	-
UYSO32	LCP 85-384	-	17,6	-
UYSO33	TUC 77-42	-	7,61	2,86
UYSO97	TUC 78-12	+	16,44	-
UYSO36	LCP 85-384	+	5,32	-
UYSO37	TUC 78-12	-	20,75	1,47
UYSO38	TUC 78-14	-	7,43	-
UYSO40	CP 92-618	-	23,65	-
UYSO41	CP 92-618	-	29,37	-
UYSO42	CP 92-618	-	11,31	1,54
UYSO43	LCP 85-384	-	0	2,65
UYSO44	TUC 77-42	-	15,13	2,32
UYSO47	TUC 78-14	-	0	2,38
UYSO48	CP 92-618	-	13,54	2,5
UYSO51	LCP 85-384	-	20,65	-
UYSO52	TUC 77-42	-	19,36	1,38
UYSO53	TUC 77-42	-	26,25	-
UYSO54	TUC 77-42	-	35,53	-

Aislamiento*	Variedad de caña de azúcar	ARA	Producción de AIA (µg/ml)	Solubilización de fosfato (relación halo/colonia)
UYSO55	TUC 78-14	-	8,55	2,29
UYSO60	TUC 78-12	-	13,91	-
UYSO61	TUC 78-12	-	7,44	-
UYSO62	CP 92-618	-	8,06	-
UYSO68	FAM 81-77	-	16,74	-
UYSO70	LCP 85-384	-	4,85	-
UYSO71	TUC 77-42	-	6,9	2,79
UYSO72	TUC 77-42	-	13,11	-
UYSO73	TUC 77-42	-	4,71	1,16
UYSO87	LCP 85-384	-	6,86	-
UYSO88	LCP 85-384	-	6,43	-
UYSO90	TUC 77-42	-	14,19	-
UYSO94	FAM 81-77	-	30,26	-
UYSO95	LCP 85-384	-	17,96	-
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5		+	31.9	N.D.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> H54		+	15.4	N.D.
<i>Burkholderia tropica</i> PP8		+	N.D.	5
<i>Azospirillum amazonensis</i> CBAMC		+	N.D.	N.D.

* Se presentan únicamente los aislamientos que presentaron al menos una característica promotora del crecimiento vegetal.

N.D. no determinado.

2.4 Identificación y estudio filogenético de los aislamientos bacterianos

En paralelo en el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas se realizó la caracterización genotípica de los aislamientos que presentaron el gen *nifH*. Para ello se utilizó la técnica de tipificación ERIC-PCR. Se definió como un mismo grupo ERIC a los aislamientos cuyo perfiles de banda presentaron un 80 % de similitud. La aplicación de dicha técnica permitió determinar 16 grupos genéticamente diferentes.

Aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, pertenecientes a distintos grupos ERIC y que presentaron características PCV, fueron seleccionados e identificados por secuenciación del gen *16S ARNr*. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en primera instancia por comparación con las disponibles en la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo BLAST. De esta forma se asignó un género a los aislamientos (Tabla 8), detectándose afiliaciones con

las Alfacaproteobacterias (*Shinella*), Betaproteobacterias(*Achromobacter*) y Gammaproteobacterias (*Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*). Como segunda aproximación se estudiaron las relaciones filogenéticas de los aislamientos a partir de la construcción de un árbol filogenético para las secuencias pertenecientes a las Alfa- y Betaproteobacterias (Figura 5) y otro para los aislamientos pertenecientes a las Gammaproteobacterias (Figura 6), usando 1507 nucleótidos de las secuencias del gen *16S ARNr*.

Los resultados mostraron un único aislamiento asociado a las Alfacaproteobacterias: UYSO24, el cual presentó 99 % de homología con la cepa *Shinella* sp. CTN 13 (Tabla 8) y se relacionó filogenéticamente con la cepa de referencia *S. zoogloeoides* ATTC 19623^T (Figura 5).

En cuanto a las Betaproteobacterias, los aislamientos UYSO01 y UYSO02 tuvieron 99 % de identidad con la cepas de *Achromobacter xylosoxidans* X96 y de *Alcaligenes* sp. 159 respectivamente (Tabla 8). Sin bien en el árbol filogenético ambos aislamientos se encuentran juntos y asociados a *Achromobacter xylosoxidans* X96 (Figura 5).

Como se observa en la Figura 6, dentro de las Gammaproteobacterias, las *Stenotrophomonas* spp. formaron un único nodo. Los aislamientos UYSO25, UYSO27, UYSO28, UYSO29, UYSO32 y UYSO33 formaron un grupo monofilético con la cepa tipo de la especie *S. maltophilia* LMG 958^T y con *S. maltophilia* PSM-6 con la cual comparten entre 99-100 % de identidad de secuencia (Tabla 8). Por su parte el aislamiento UYSO30 compartió el mismo nodo del grupo de las *Stenotrophomonas*, pero se ubicó en una rama diferente sin ninguna cepa de referencia cercana (Figura 6).

Todos los aislamientos pertenecientes a las *Pseudomonas* se agruparon en un mismo nodo. Dentro de este grupo, los aislamientos UYSO19, UYSO20 y UYSO21 se agruparon con dos cepas de la especie *P. fluorescens* incluyendo la cepa tipo *Pseudomonas fluorescens* LMG 1794^T. Mientras que el aislamiento UYSO14 se agrupó con la cepa *Pseudomonas lutea* PSB2.

Por su parte el aislamiento UYSO03 que presentó una homología de secuencia del 99 % con la cepa *Acinetobacter* sp. BMC-4 (Tabla 8), en el árbol filogenético se relacionó con la cepa de referencia *Acinetobacter baumannii* LMG 1041^T (Figura 6).

Tabla 8. Similitud de la secuencia nucleotídica del gen *16S ARNr* de aislamientos de caña de azúcar cultivadas en Uruguay.

Aislamiento	Variedad de caña de azúcar	Grupo ERIC	Mejor hit	Similitud (%)	Nº de acceso en la base de datos NCBI
UYSO01	CP 92-618	5	<i>Achromobacter xylooxidans</i> strain X96 (HM137034)	99	JF262577
UYSO02	CP 92-618	10	<i>Alcaligenes</i> sp. 159 (AJ002804)	99	JF262578
UYSO03	TUC 77-42	4	<i>Acinetobacter</i> sp. BMC-4 (GU451168)	99	JF262567
UYSO10	FAM 81-77	24	<i>Enterobacter</i> sp. HY241 (EU784139)	99	JF262582
UYSO11	TUC 77-42	2	<i>Pantoea ananatis</i> strain pY2-2 (EU331415)	99	JF262565
UYSO12	LCP 85-384	9	<i>Pantoea</i> sp. J1-13-7 ^a (EU816766)	99	JF262566
UYSO13	CP 92-618	7	<i>Pantoea agglomerans</i> strain BJCP2 (HM130693)	99	JF262564
UYSO14	TUC 78-14	7	<i>Pseudomonas</i> sp. MW6 (HQ231962)	99	JF262570
UYSO19	FAM 81-77	27	<i>Pseudomonas</i> sp. DK2009-3 ^a (FN600406)	100	JF262574
UYSO20	FAM 81-77	N.D.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> S16 (DQ095904)	99	JF262575
UYSO21	FAM 81-77	N.D.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 14675 (GU198125)	99	JF262576
UYSO22	TUC 77-42	4	<i>Rahnella</i> sp. Pc201 (EU333141)	99	JF262562
UYSO23	TUC 77-42	11	<i>Rahnella</i> sp. Pc201 (EU333141)	99	JF262563
UYSO24	TUC 77-42	N.D.	<i>Shinella</i> sp. CTN-13 (FJ598327)	99	JF262583
UYSO25	TUC 78-14	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262559
UYSO26	LCP 85-384	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	100	JF262555
UYSO27	TUC 78-14	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262558
UYSO28	LCP 85-384	8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262556
UYSO29	CP 92-618	12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262560
UYSO30	FAM 81-77	13	<i>Stenotrophomonas</i> sp. I_Gauze_K_8_5 (FJ267572)	99	JF262561
UYSO32	LCP 85-384	N.D.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262557
UYSO33	TUC 77-42	N.D.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	100	JF262554

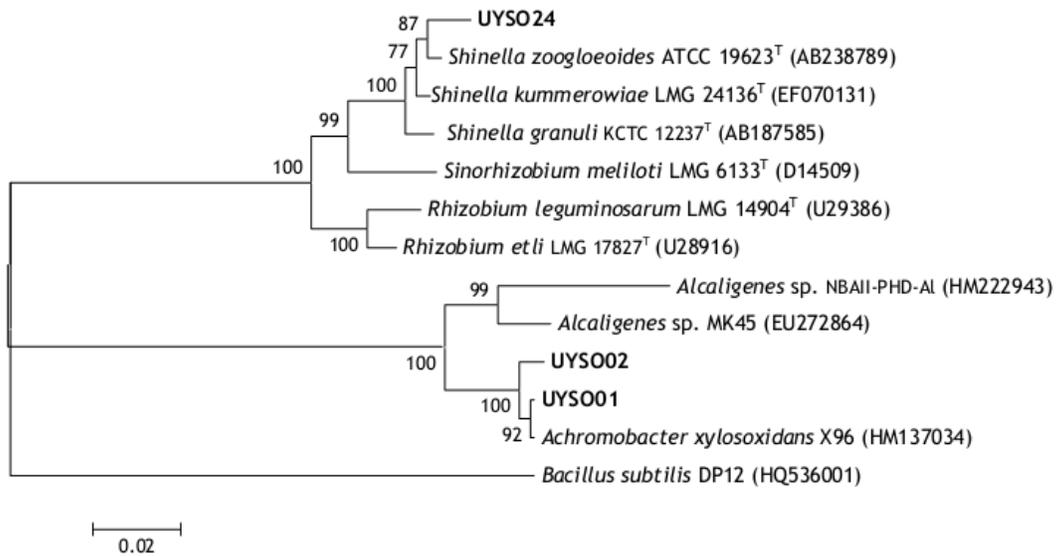


Figura 5. Árbol filogenético de Alfa y Betaproteobacterias basado en la secuencia del gen *16S ARN* de los aislamientos asociados a caña de azúcar. Se incluyeron los aislamientos asociados a caña de azúcar de la colección y cepas referencia de los géneros más cercanos. Como grupo externo se utilizó *Bacillus subtilis*. Las secuencias se analizaron por Neighbour Joining y como modelo de sustitución se utilizó Kimura 2 parámetros. Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

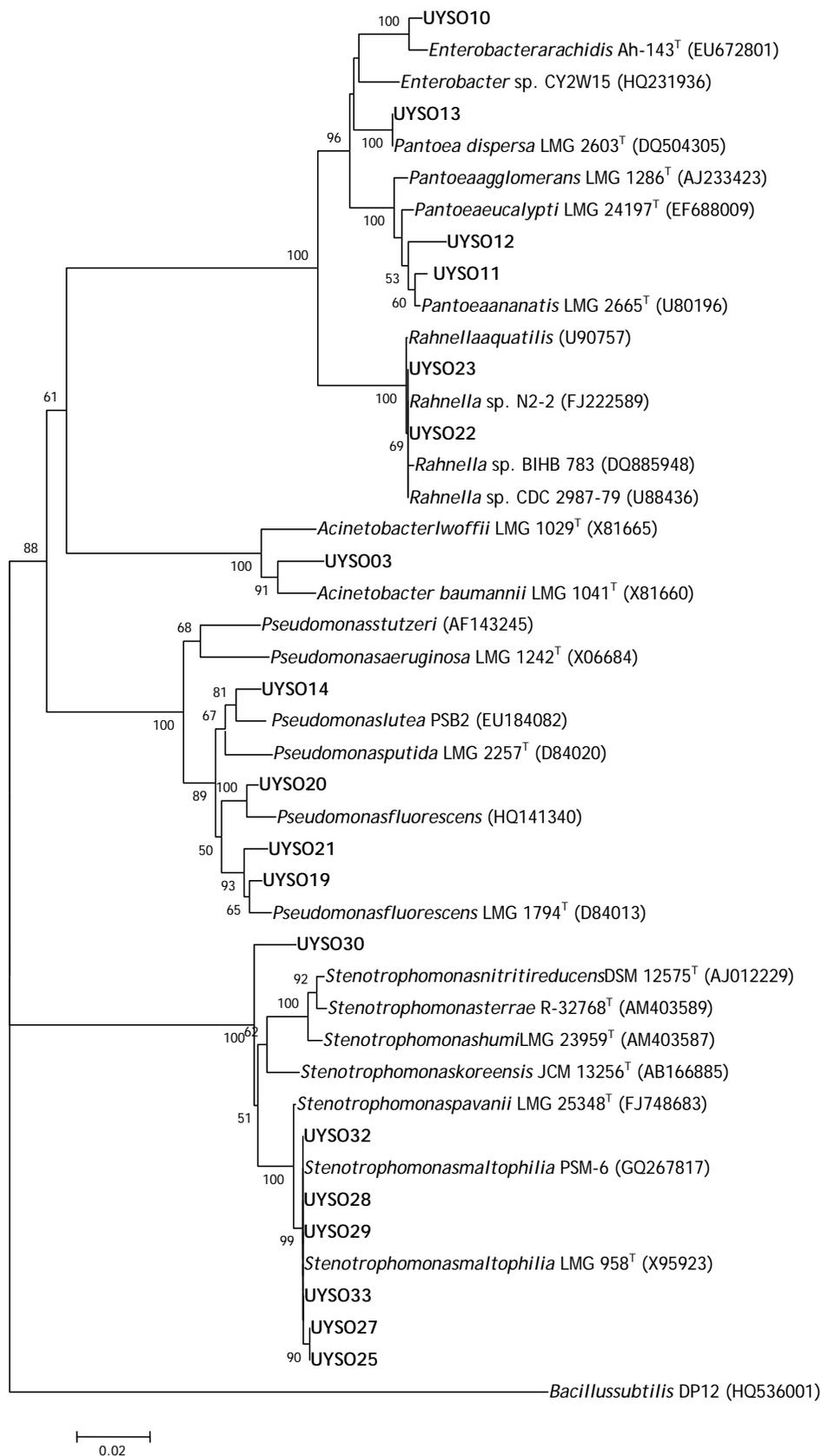


Figura 6.Árbol filogenético de Gammaproteobacterias basado en la secuencia del gen *16S ARNr* de los aislamientos asociados a caña de azúcar. Se incluyeron los aislamientos asociados a caña de azúcar de la colección y cepas referencia de los géneros más cercanos. Como grupo externo se utilizó *Bacillus subtilis*. Las secuencias se analizaron por Neighbour Joining y como modelo de sustitución se utilizó Kimura 2 parámetros. Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

Finalmente dentro de las Gammaproteobacterias, la familia de *Enterobacteriaceae* se agrupó en un mismo nodo representado por los géneros *Pantoea*, *Rahnella* y *Enterobacter*. Los aislamientos y cepas pertenecientes al género *Enterobacter* y *Pantoea* formaron un grupo monofilético. En el caso del género *Enterobacter*, el aislamiento UYSO10 se asoció con la cepa de referencia *E. arachidis* Ah-143^T. Por su parte los aislamientos UYSO11 y UYSO12 se asociaron con *Pantoea ananatis* LMG 2665^T, mientras que, si bien el aislamiento UYSO13 presentó 99 % identidad con la cepa *P. agglomerans* BJCP2, en el árbol filogenético mostró mayor homología con *P. dispersa* DSM 2603^T. Por su parte los aislamientos UYSO22 y UYSO23 presentaron 99 % de homología con la cepa *Rahnella* sp. Pc201 (Tabla 8) y en el árbol filogenético se agruparon con la cepa de referencia de la única especie definida del género: *Rahnella aquatilis* LMG 2794^T (Figura 6).

Con el objetivo de asignarle un género taxonómico a mas aislamientos que los que fueron identificados por secuenciación del gen *16S ARNr*, se identificaron aislamientos de la colección como pertenecientes a estos mismos géneros por comparación de sus características morfológicas y la pertenencia a los grupos ERIC. Teniendo en cuenta las asunciones anteriores, se analizó la presencia de los géneros identificados según la variedad de caña de azúcar, nivel de fertilización y estrategia de aislamiento (Tabla 9).

Los resultados mostraron que, debido a la mayor diversidad genética presentada, el género *Stenotrophomonas* fue el más secuenciado de la colección. Los aislamientos pertenecientes a dicho género fueron obtenidos utilizando las dos metodologías de extracción ensayadas, pero solamente a partir de plantas cultivadas en condiciones de baja fertilización. Por su parte el género *Acinetobacter* solo fue detectado en plantas crecidas en niveles de alta fertilización nitrogenada, mientras que aislamientos pertenecientes al género *Pantoea* se encontraron en ambos niveles de fertilización. Sin embargo, como el esfuerzo de identificación de los aislamientos no fue el mismo según la variedad de caña de azúcar, el nivel de fertilización y la estrategia de aislamiento, no podemos realizar conclusiones generales. Por lo tanto, los resultados son simplemente ilustrativos de las características de los grupos de aislamientos identificados.

Tabla 9. Clasificación de los géneros bacterianos identificados asociados a cultivos de caña de azúcar en Uruguay.

Género	Cantidad de aislamientos	Variedad de caña				
		TUC77-42	TUC78-14	LCP85-384	CP92-618	FAM81-77
<i>Stenotrophomonas</i>	21	X	X	X	X	X
<i>Shinella</i>	1	X				
<i>Rahnella</i>	3	X	X			
<i>Pseudomonas</i>	6		X			X
<i>Pantoea</i>	5	X		X	X	X
<i>Enterobacter</i>	2				X	X
<i>Acinetobacter</i>	1	X				
<i>Achromobacter</i>	2				X	

Género	Cantidad de aislamientos	Nivel de fertilización		Estrategia de aislamiento		
		AF	BF	Macerado	Apoplasto	
				Nodo	Internodo	Tallo
<i>Stenotrophomonas</i>	21		X	X	X	X
<i>Shinella</i>	1		X	X		
<i>Rahnella</i>	3		X	X		
<i>Pseudomonas</i>	6		X	X	X	
<i>Pantoea</i>	5	X	X	X	X	
<i>Enterobacter</i>	2		X	X		
<i>Acinetobacter</i>	1	X		X		
<i>Achromobacter</i>	2		X	X		

AF: Alta fertilización, BF: baja fertilización.

3 DISCUSION

3.1 Construcción de una colección de aislamientos bacterianos asociados a variedades comerciales de caña de azúcar cultivadas en Uruguay

3.1.1 Estrategia utilizada para obtener una colección de aislamientos

Si bien se ha reportado que la mayor diversidad de endófitos y bacterias asociadas a caña se encuentra en la raíz (85, 120), a la hora de seleccionar el órgano a partir del cual realizar una colección bacteriana se priorizaron los nodos del tallo, dado que en ellos se encuentran las yemas vegetativas que permiten la reproducción asexual del cultivo. Los nodos portan además de la yema y nutrientes necesarios para el desarrollo inicial del nuevo plantín, una carga bacteriana debida a los endófitos y epífitos que se encuentran en la caña “madre” (135). Por lo tanto, postulamos que estas bacterias se encuentran en ventaja frente a las potenciales bacterias, que hallándose en el suelo, logren ingresar a la nueva planta. A su vez, el uso de esta estrategia permite trabajar con aquellas bacterias que son capaces de alcanzar los tejidos aéreos de plantas maduras, particularmente el tallo, por lo que una bacteria que colonice el material vegetativo de reproducción se asegurará su propagación en la próxima generación. Por estos motivos, en el presente trabajo se optó por la realización de una colección de bacterias que se encuentre ocupando este nicho que consideramos preferencial a la hora de la propagación a nuevas plantas.

3.1.2 Características de la colección de bacterias y relación entre los marcadores utilizados para bacterias diazotróficas

Las bacterias endófitas han sido reportadas como ocupantes de los espacios intercelulares y en menor cantidad, en los tejidos vasculares de diferentes órganos (67). Distintas metodologías se utilizan para su aislamiento, siendo las principales el macerado de tejidos estériles, la extracción del apoplasto por presión, vacío o centrifugación. Éstas últimas técnicas colectan en general menor número de aislamientos, focalizándose en el espacio intercelular, así como en los tejidos conductores de la planta (62). Estas características podrían explicar en parte el bajo número de aislamientos obtenidos a través de la centrifugación, así como justificar la mayor recuperación de aislamientos por macerado de nodos que de internodos de tallos de caña de azúcar. Debido a estas observaciones realizadas

a partir de las muestras de la primera colecta, se optó por generar la colección de aislamientos a partir del macerado de nodos de tallos de caña de azúcar.

Para la obtención de los aislamientos se utilizó una técnica ampliamente reportada, que consiste en inocular medios semisólidos sin N con suspensiones procedentes de tallos procesados(152). Esta estrategia ha sido utilizada para la recuperación de bacterias que presentan la capacidad de fijar nitrógeno, debido a que bajo estas condiciones muestran una forma de crecimiento característico fácilmente reconocible (110). Posteriormente cada aislamiento fue purificado y evaluado en cuanto a la presencia del gen *nifH* y la capacidad FBN mediante ARA. La presencia del gen *nifH* ha sido utilizada como marcador de aislamientos con capacidad potencial de fijar N empleando cebadores de secuencias degeneradas para su amplificación. Esto se debe a que si bien la enzima nitrogenasa se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución, su secuencia nucleotídica ha divergido mucho entre la diversidad filogenética existente entre bacterias fijadoras de N (64). En este estudio, los cebadores utilizados fueron diseñados con baja degeneración de secuencia buscando ser específicos para diazótrofos aerobios y microaerobios (99). Los resultados mostraron la amplificación del gen *nifH* para aproximadamente un 30-40 % de los aislamientos obtenidos sin relación según el medio de cultivo utilizado. Este bajo porcentaje ya ha sido reportado en otras colecciones (35) y podría deberse a que: 1- los cebadores utilizados no pueden reconocer la gran divergencia de secuencia de este gen en los aislamientos, 2- se trata de aislamientos contaminantes en los viales sin N que consiguieron crecer con el extracto de levadura de los medios de cultivo sólidos, 3- el inóculo utilizado para los ensayos proviene de medios ricos, los cuales podrían tener el N suficiente necesario para permitir el crecimiento de bacterias no fijadoras de N.

Por otro lado, la presencia del gen *nifH* no implica que los genes de la nitrogenasa se estén expresando o que la enzima sea funcional. Como se mencionó el ensayo de ARA, es un método que puede determinar la actividad de esta enzima en los aislamientos de interés. En este trabajo se obtuvo un bajo porcentaje de aislamientos *nifH* positivos capaces de reducir el acetileno en ensayos de ARA. Similares resultados han sido reportado en otras colecciones de endófitos-diazótrofos (35, 100). La fijación biológica del nitrógeno es un fenómeno sensible a varias condiciones, entre ellas el crecimiento bacteriano, la tensión de oxígeno así como la presencia de formas asimilables del N. Teniendo en cuenta que no todos los aislamientos consiguieron formar buenas películas de crecimiento en los medios ensayados y que

actualmente se conoce la identidad de los mismos, se propone como perspectiva realizar nuevamente el ensayo utilizando medios semiselectivos para los géneros identificados. Cabe resaltar que los medios utilizados en este trabajo fueron diseñados con el fin de que crezcan selectivamente bacterias de los géneros: *Herbaspirillum* (JNFb), *Burkholderia* y *Azospirillum* (LGI) y *Gluconacetobacterdiazotrophicus* (LGI-P) (67). Otra causa que puede explicar el bajo número de aislamientos reductores de acetileno, podría ser que algunos de los aislamientos sean oligotróficos y por ende la actividad de la enzima esté siendo inhibida por el medio de cultivo (100). En el caso de los aislamientos que formaron películas de crecimiento bajas, los mismos pueden haberse visto afectados por las condiciones de ARA ensayadas, debido a que al ser organismos anaeróbicos son de crecimiento lento y la producción y funcionalidad de la enzima podría verse enlentecida. Otra variable a considerar es la fuente de carbono de los medios de cultivo, las cuales han sido reportadas como determinantes en algunas bacterias. Asimismo se podría evaluar el agregado de molibdeno o vanadio, elementos estructurales de los sitios activos de la nitrogenasa necesarios para una correcta funcionalidad de la enzima (63, 89).

Como resultado de este trabajo se obtuvo una colección de 227 aislamientos, de los cuales en 86 se pudo amplificar el gen *nifH* y fueron seleccionados para ser caracterizados en profundidad. De este conjunto de aislamientos, 12 mostraron la expresión y actividad de la nitrogenasa determinada por la capacidad de reducir acetileno. Sin embargo, la no expresión de la enzima *in vitro* no descarta la posibilidad de que dichos aislamientos la puedan expresar bajo otras condiciones como ser en asociación con plantas. A pesar de ello, la técnica de ARA constituye un buen ensayo a la hora de evaluar colecciones de aislamientos buscando actividad de la enzima.

3.2 Caracterización de la colección de diazótrofos asociados a variedades comerciales de cañas de azúcar

La producción de fitohormonas por bacterias y sus efectos benéficos en la promoción del crecimiento de las plantas han sido extensamente reportados (130). En particular el ácido indol acético juega un rol importante no solamente en el desarrollo de la planta sino también en la activación de las defensas de la misma. Además ha sido propuesta como posible molécula señal en la comunicación bacteriana (57). Por otra parte, la solubilización de hierro y fosfatos por bacterias asociadas con plantas juega un papel clave en la interacción planta-

bacteria, así como en el biocontrol de fitopatógenos (130, 149). Particularmente, el fósforo es considerado el segundo elemento esencial limitante del crecimiento de las plantas. La disponibilidad del mismo en suelos es máxima a pH cercanos a 7, encontrándose en formas insolubles por precipitación principalmente con aluminio y hierro a pH ácido y con calcio a pH alcalino. El principal mecanismo por el cual los microorganismos solubilizan fosfato es mediante la producción de ácidos orgánicos, que actúan sobre los complejos insolubles formados con iones de metales como el Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} (46). Otra vía de acción es a través de la síntesis de fosfatasas que actúan sobre la materia orgánica.

En la colección de aislamientos se obtuvo un alto porcentaje de aislamientos productores de AIA (68 %) y solubilizadores de fosfato (20 %). Conocer las características de la colección es esencial para el desarrollo de futuros inoculantes, donde se priorizará el uso de bacterias con diferentes capacidades PCV. Por lo tanto, aislamientos que presenten una o varias características, serán candidatos prometedores para ensayos de promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar.

3.3 Identidad de las bacterias asociadas a variedades comerciales de caña de azúcar cultivadas en Uruguay

Estudios dirigidos a la amplificación y secuenciación del gen *16S ARNr*, han sido extensivamente utilizados para determinar la diversidad e identidad de los organismos, así como para conocer sus relaciones filogenéticas. Dicho gen está presente en todas las bacterias y posee regiones de secuencias conservadas y otras variables que permiten la clasificación taxonómica (74). Por otro lado, este gen no puede ser transmitido por transferencia horizontal.

A partir de la secuenciación del gen *16SARNr* se identificaron aislamientos pertenecientes a los géneros *Shinella* de las Alfarproteobacterias, *Achromobacter* perteneciente a las Betaproteobacterias y *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella* y *Stenotrophomonas* pertenecientes a las Gammaproteobacterias. Es interesante resaltar que los medios semiselectivos usados en este trabajo no permitieron aislar los géneros bacterianos para los que fueron diseñados. Una posible explicación puede ser que la composición de la comunidad de bacterias asociadas y endófitas, dependa de la especificidad entre genotipo bacteriano y cultivar de caña de azúcar, así como del clima y de los niveles de fertilización utilizados (113). En lo que concierne a los géneros identificados en este estudio, muchos de

los mismos ya han sido reportados como posibles endófitos promotores del crecimiento vegetal (PCV) asociados a diferentes cultivos (120, 123). De acuerdo a la bibliografía consultada, este sería el primer reporte en el cual el género *Shinella* es identificado como probable endófito.

Tomando en cuenta los aislamientos obtenidos en la colección, los más abundantes y diversos fueron las Gammaproteobacterias. Dentro de los Enterobacteriales, *Pantoea*, *Rahnella* y *Enterobacter* han sido reportados previamente como posibles endófitos. Varios aislamientos del género *Pantoea* han sido descritos como diazótrofos asociados a caña de azúcar (85), maíz (88) y como endófito en arroz (151). Es interesante mencionar que *P. agglomerans* y *P. ananatis* han sido reportadas como patógenos de planta (28, 29) e interesantemente *P. agglomerans* también como PCV de arroz (41). Uno de los aislamientos de la colección construida en este trabajo se asoció con el fitopatógeno *P. ananatis*. Por otro lado, las *Enterobacter* spp. han sido aisladas como posibles endófitos de varias plantas (120) mientras que algunos aislamientos han sido reportados como PCV en caña de azúcar (87). En el caso del género *Rahnella*, *R. aquatilis* ha sido descrita asociada a tomate y manzana con capacidad biocontroladora y fijadora de nitrógeno en la rizósfera de trigo y maíz (15), siendo también reportado como posible endófito en el álamo de Virginia (35).

Dentro del orden de *Pseudomonales*, se identificaron bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. El género *Pseudomonas* ha sido extensivamente reportado como PCV y como potencial endófito de varias plantas, entre ellas caña de azúcar (35, 83, 146). Por otro lado, las *Acinetobacter* spp. han sido reportadas como diazótrofes y posible endófitas en caña de azúcar (150) y en el álamo de Virginia (35). Particularmente *A. baumannii* LMG 1041 fue descrita como posible endófito asociado a soja con potencial PCV (73).

En este trabajo se identificaron aislamientos relacionados a *S. maltophilia*, la cual fue inicialmente reportado como patógeno humano (123). Recientemente la misma especie ha sido descrita como PCV de varias plantas de interés agronómico (65). En particular, *S. pavanii* LMG 25348, se reportó como potencial endófito de caña de azúcar (110).

Aislamientos de la clase Betaproteobacteria, pertenecientes al género *Achromobacter*, fueron descritos previamente como potenciales endófitos asociados con citrus y girasol (6). Por su lado *Shinella* fue el único género representante de la clase Alfaproteobacteria reportado en la presente colección de aislamientos de caña de azúcar. Aunque *Shinella* spp. no han sido reportadas con anterioridad como endófitas, recientemente *S. kummerowiae* fue aislada de

nódulos y descrita como una bacteria simbiótica con presencia del gen *nifH*(79). Dada la novedad de un aislamiento perteneciente al género *Shinella* como bacteria asociada a plantas y con capacidades PCV *in vitro*, sería interesante el poder profundizar en la realización de estudios filogenéticos y ecológicos con esta cepa.

Por otro lado, cabe destacar que este es el primer reporte en que aislamientos pertenecientes a los géneros *Rahnella*, *Shinella* y *Achromobacter* son identificados como posibles endófitos asociados a variedades de caña de azúcar. A su vez, este es el primer reporte de bacterias asociadas a cultivos de caña de azúcar en el país.

CAPITULO 2:

EVALUACIÓN DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE CAÑAS DE AZÚCAR MICROPROPAGADAS POR POSIBLES ENDÓFITOS BACTERIANOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la capacidad promotora del crecimiento de plantas de cañas de azúcar por aislamientos asociados a variedades cultivadas en Uruguay.

1 MATERIALES Y METODOS

1.1 Cepas bacterianas y plantas de cañas de azúcar utilizadas

Seis aislamientos provenientes de la colección de bacterias asociadas a variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay, fueron seleccionados por su pertenencia a diferentes géneros bacterianos y la presencia *in vitro* de características PCV. Las mismas fueron: *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO14, *Rahnella* sp. UYSO22 y *Shinella* sp. UYSO24. Como referencia en los ensayos se utilizó la cepa de *Gluconacetobacterdiazotrophicus* Pa15.

Para la realización de los ensayos de interacción entre bacterias potenciales PCV y cañas de azúcar, se utilizaron cañas micropropagadas de la variedad LCP 85-384. La micropropagación o propagación clonal es la aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* donde, a partir de un fragmento de la planta madre (explante), se obtienen varias plantas clonales (53). La técnica de cultivo *in vitro* se basa en el postulado de Haberlandt sobre la totipotencia celular en plantas, que refiere a la capacidad de las mismas de crecer a partir de células aisladas (86). El proceso implica la reproducción *in vitro* de las condiciones fisicoquímicas y principales factores que influyen en el desarrollo de la planta, como el uso de hormonas en el medio de cultivo. Mediante el cultivo de tejidos meristemáticos jóvenes y la aplicación de técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos (termoterapia o quimioterapia), el cultivo *in vitro* consigue eliminar o reducir los microorganismos que viven en el interior de los tejidos, obteniéndose un material fitosanitario estéril (53). El proceso de micropropagación posee varias etapas: 1- desinfección de yemas o semillas del material madre, 2- introducción del material seleccionado *in vitro*, 3- multiplicación de brotes, 4- enraizamiento y 5- aclimatación (Figura 1).

Las plantas de caña de azúcar utilizadas en el presente estudio fueron micropropagadas por el Laboratorio de Biotecnología de INIA Las Brujas. El aprendizaje de esta técnica para su aplicación en el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, se realizó en el contexto de una pasantía en el laboratorio mencionado.

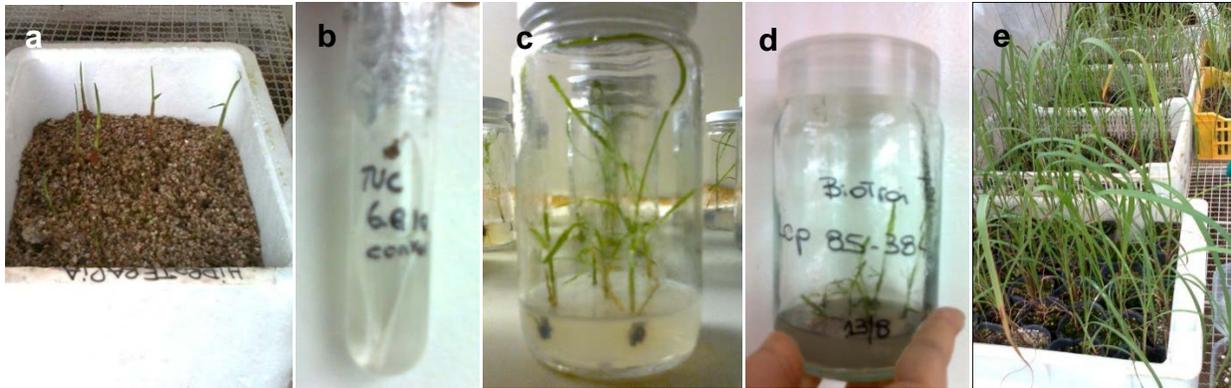


Figura 1. Etapas del proceso de micropropagación de caña de azúcar. a- desinfección y germinación de yemas, b- introducción *in vitro* de yemas apicales, c- multiplicación de brotes, d- enraizamiento y e- aclimatación.

1.2 Búsqueda de bacterias cultivables en plantas de cañas de azúcar micropropagadas

Con el objetivo de conocer si las plantas micropropagadas se encontraban libres de bacterias, se realizó un procedimiento estándar de aislamiento de bacterias cultivables. Plantas de caña de azúcar (tejido aéreo y radicular) fueron esterilizadas superficialmente mediante Cloramina T por 15 minutos (94, 152), seguido de 6 lavados con agua destilada estéril. El control de esterilización superficial se realizó por deslizamiento del tejido estéril en medio Dygs sólido. El tejido esterilizado se maceró en NaCl 0.9 % y diluciones de la suspensión fueron estriadas en placas con medio sólido Dygs, JNFb, LGI y LGI-P. Las colonias aisladas se purificaron en nuevo medio Dygs.

A partir de lisados de los aislamientos, se amplificó el gen *16S ARNr* y se secuenció el amplicón obtenido como se describió en el Capítulo 1 (Punto 4). La secuencia nucleotídica fue editada utilizando el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x y posteriormente comparada mediante el uso del algoritmo BLAST con la base de datos del NCBI con el fin de identificar los aislamientos.

1.3 Ensayo de promoción del crecimiento de cañas de azúcar micropropagadas por aislamientos bacterianos seleccionados de la colección

Frascos de vidrio de 250 ml fueron preparados con 20 ml de medio MS (Anexo) modificado (117). En los mismos se colocaron asépticamente entre cuatro y cinco plantas de caña micropropagadas de similar tamaño en etapa de enraizamiento (98). A los tres días, los frascos que no presentaron contaminación fueron inoculados con 1×10^7 células/frasco (117) con los siguientes aislamientos: *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Rahnella* sp. UYSO22, *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Shinella* sp. UYSO24. Como cepa de referencia se utilizó *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15 y como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. Asimismo, se incluyó un tratamiento donde se inocularon los 6 aislamientos evaluados en este ensayo (MIX), a una concentración final de 1×10^7 células/frasco (52). Para cada tratamiento se realizaron 10 réplicas. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar.

Diez días posteriores a la inoculación (pi), las plantas fueron traspasadas a almacigueras con arena:vermiculita estéril (2:1) y regadas con medio MS modificado sin N. Como las gramíneas no pueden adquirir el total del N a partir de FBN, se regó alternadamente con medio MS con N para que las plantas no presenten déficit de éste elemento. La humedad de las plantas se mantuvo mediante el uso de bolsas de nylon transparentes. Durante estas primeras etapas las plantas fueron mantenidas a 30°C con un fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad. A los 25 días pi se transplantaron las plantas a macetas conteniendo 1.5 kg de arena:vermiculita estéril (2:1) trasladándose al invernáculo con un fotoperíodo controlado de 8/16 horas luz/oscuridad.

A los 4 meses pi se cosechó el ensayo midiéndose las variables biométricas: altura de la planta (desde la base del tallo hasta el collarín) y diámetro del tallo (medido en la base de la planta). Asimismo se determinó el peso seco de la parte aérea y radicular. Para esto las plantas se seccionaron en raíz y parte aéreo, secándose a 60 °C hasta alcanzar peso constante. Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat usando ANAVA con un $p < 0.05$. En caso de obtener diferencias significativas, los tratamientos fueron comparados usando el test de Tukey.

2 RESULTADOS

2.1 Presencia de bacterias cultivables en plantas de caña de azúcar micropropagadas

Con el objetivo de evaluar la presencia de bacterias cultivables en plantas micropropagadas, se maceraron plantas esterilizadas superficialmente. La suspensión obtenida fue estriada en placas conteniendo los medios de cultivo Dygs, JNFb, LGI y LGI-P, obteniéndose aislamientos únicamente en placas conteniendo medio rico Dygs. La morfología de los dos aislamientos purificados fue la misma, mostrando colonias pequeñas, redondas y de color amarillo. Un único aislamiento fue secuenciado e identificado. El mismo presentó 99 % de identidad de secuencia del gen *16S ARNr* con el aislamiento *Microbacterium ginsengisoli* cepa Gsoil 259^T (NR041516). Ésta actinobacteria es la cepa tipo de su especie y fue aislada de suelo como aislamiento productor de beta glucosidasa (102). Asimismo, aislamientos que presentaron alta homología de secuencia del gen *16S ARNr* con *Microbacterium ginsengisoli* fueron obtenidos a partir de nódulos de *Lespedeza* sp. los cuales presentaron actividad PCV *in vitro* (101).

2.2 Respuesta en invernáculo de plantas de cañas de azúcar micropropagadas a la inoculación con bacterias seleccionadas por sus características PCV

Con el fin de evaluar el efecto de la inoculación de plantas de cañas de azúcar con aislamientos bacterianos seleccionados, se realizó un ensayo utilizando plantas micropropagadas (Figura 2). Para esto seis aislamientos fueron seleccionados de acuerdo a sus características PCV *in vitro*, así como a los géneros bacterianos a los que pertenecen. Como referencia se utilizó la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 y como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. Los resultados obtenidos para las variables biométricas medidas se presentan en la Tabla 1. De las variables medidas, la altura y el diámetro precisaron ser transformadas utilizándose las funciones cuadrado y logaritmo respectivamente, para cumplir con los requisitos del modelo lineal utilizado.

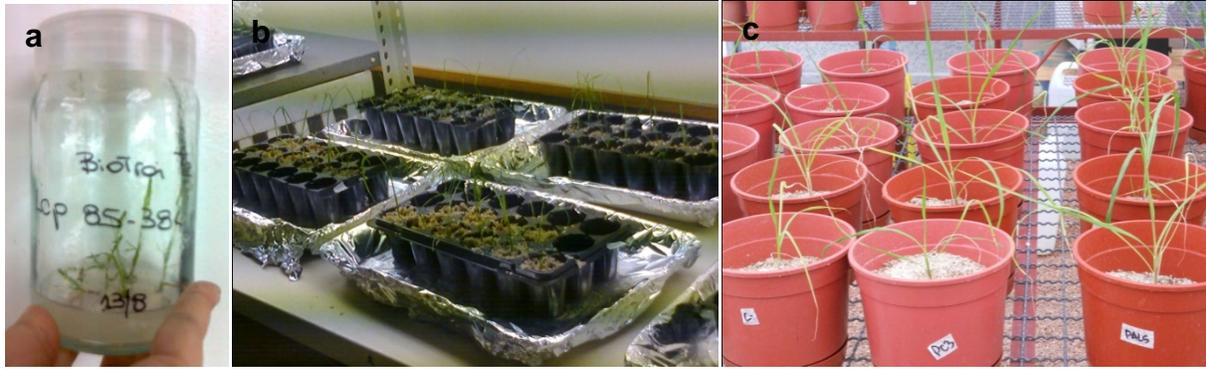


Figura 2. Etapas del ensayo de promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con aislamientos seleccionados. a- Inoculación aséptica de plantas enraizadas en frascos, b- aclimatación y c-en macetas en invernáculo.

Como se observa en la Tabla 1, los tratamientos inoculados con *Enterobacter* sp.UYSO10y *Shinella* sp.UYSO24 se diferenciaron significativamente ($p<0.05$) del control negativo para las variables peso seco aéreo y diámetro del tallo. En cuanto al peso seco radicular *Shinella* sp. UYSO24 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 mostraron diferencias significativas con el control. Por otro lado y con el fin de determinar si habían diferencias en el crecimiento de la planta se calculó la relación peso seco aéreo/peso seco radicular. Los análisis mostraron que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados (datos no mostrados). Por último, cuando se evaluó la altura de los tratamientos, se observó que las cepas *Enterobacter* sp.UYSO10, *Shinella* sp. UYSO24 *Pantoea* sp. UYSO13, *Rahnella* sp. UYSO22, MIX de aislamientos y *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 se diferencian significativamente del control (Tabla 1). Es de resaltar que el tratamiento inoculado con la cepa *Shinella* sp. UYSO24 mostró diferencias significativas con el control para todas las variables medidas y que la cepa *Enterobacter* sp.UYSO10 para tres de ellas (Figura 3).

Tabla 1. Respuestas de plantas micropropagadas a la inoculación con aislamientos seleccionados.

TRATAMIENTO	VARIABLES EVALUADAS							
	PS AEREO (gr)		PS RADICULAR (gr)		DIAMETRO (cm) *		ALTURA (cm) *	
Control	0,72	A **	1,29	A	5,09	A	8,14	A
<i>Pseudomonas sp.</i> UYSO14	0,93	A	1,75	AB	5,36	AB	9,04	AB
<i>Pantoea sp.</i> UYSO13	0,97	AB	1,82	ABC	5,29	AB	10,34	BCD
<i>Acinetobacter sp.</i> UYSO03	1,08	ABC	1,93	BC	5,77	AB	9,64	ABC
<i>Rahnella sp.</i> UYSO22	1,09	ABC	1,71	AB	5,97	AB	10,14	BCD
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	1,10	ABC	1,75	AB	5,97	AB	10,73	CD
MIX	1,11	ABC	1,85	ABC	5,70	AB	10,42	BCD
<i>Enterobacter sp.</i> UYSO010	1,46	C	1,60	AB	6,40	B	10,18	BCD
<i>Shinella sp.</i> UYSO024	1,37	BC	2,34	C	6,19	B	11,13	D

PS: peso seco.

MIX: Tratamiento que incluye la mezcla de las 6 cepas ensayadas en este estudio.

El análisis estadístico se hizo mediante el test de ANAVA con un $p < 0,05$.

* Los datos fueron transformados para cumplir los requisitos para aplicar el test de ANAVA.

** Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test de Tukey con un $p < 0,05$.

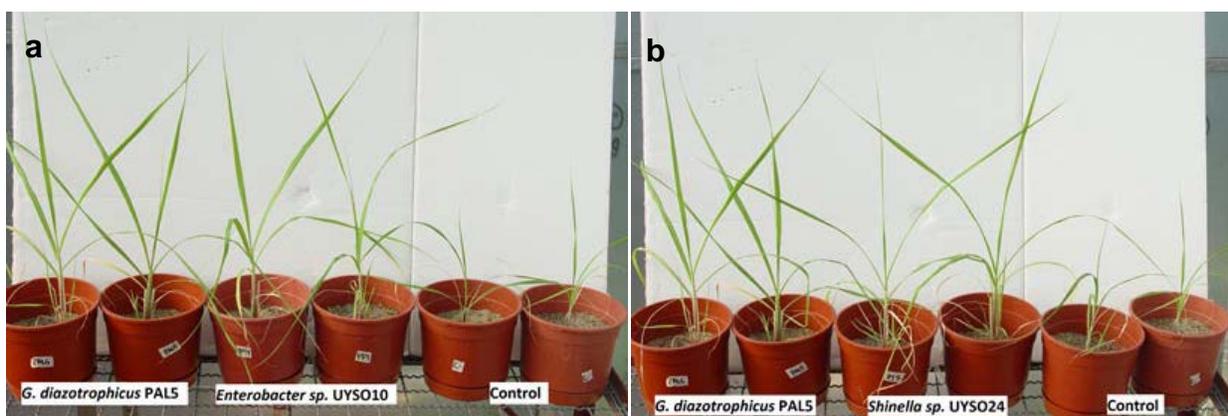


Figura 3. Vista del ensayo de PCV de plantas de cañas de azúcar micropropagadas inoculadas con diferentes aislamientos de interés. De izquierda a derecha: plantas inoculadas con *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, aislamientos ensayados (a-*Enterobacter sp.* UYSO10 y b- *Shinella sp.* UYSO24) y control negativo sin inocular.

3 DISCUSIÓN

Varios estudios realizados en plantas de caña de azúcar inoculadas con bacterias aisladas de los mismos cultivos han mostrado un efecto promotor del crecimiento vegetal dependiendo en ciertas ocasiones de la especificidad genotipo planta - genotipo bacteria. Este hecho justificó la creación de una colección de bacterias adaptadas a las variedades y a las condiciones de plantación del cultivo en Uruguay y la evaluación de las mismas como promotoras del crecimiento de las variedades de caña de azúcar utilizadas en el país. En el capítulo 1 se describió la generación de una colección de bacterias aisladas a partir de cultivos de caña cultivadas en nuestro país y su caracterización en búsqueda de capacidades PCV *in vitro*. En el presente estudio la estrategia adoptada para la evaluación de bacterias seleccionadas por sus características PCV *in vitro*, fue la inoculación de plantas de caña de azúcar en sistemas asépticos y controlados de laboratorio, proyectando sentar la base para futuros ensayos en sistemas más complejos.

Las condiciones de inoculación de plantas de caña de azúcar micropropagadas con el objetivo de favorecer la colonización endofítica, fue descrita y optimizada para *Gluconacetobacter diazotrophicus* (69, 117). Posteriormente, en diversos estudios se ha evaluado los efectos PCV de bacterias asociadas o endófitas sobre plantas micropropagadas así como su distribución en los tejidos de la planta (91, 97, 129). Normalmente en los ensayos de PCV, las plantas son inoculadas en la etapa de micropropagación para después ser transferidas a maceta de forma de permitir el desarrollo de la misma. Dependiendo de los objetivos planteados las macetas se mantienen hasta su cosecha en el invernáculo o se considera ésta una etapa de aclimatación, cuando el destino final es su plantación en el campo (52, 98). Utilizando la metodología recomendada en la bibliografía, los aislamientos *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO14, *Rahnella* sp. UYSO22 y *Shinella* sp. UYSO24 seleccionados por sus características PCV *in vitro* y su afiliación filogenética, fueron evaluados en invernáculo y comparados con la cepa de *G. diazotrophicus* Pal5 y un control sin inocular. La variedad de caña de azúcar utilizada en este trabajo fue LCP 85-384, la misma fue micropropagada en el Laboratorio de Biotecnología de INIA y es de interés para ALUR. La cosecha del ensayo se realizó a los 4 meses post-inoculación y a partir de la medición y comparación de variables biométricas de la planta se observó que, las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 promovieron significativamente el

crecimiento de las plantas. Ambas cepas mostraron *in vitro* la capacidad de reducir acetileno y producir ácido indol acético bajo las condiciones ensayadas. *In vivo* promovieron el incremento del peso seco de la parte aérea así como el diámetro y altura del tallo con respecto al control y en el caso de *Shinella* se observó además incremento en el peso seco radicular. Si bien se observaron diferencias en el efecto causado por la inoculación de bacterias PCV a los 4 meses, no debemos descartar que los mismos se potencien o aparezcan nuevos efectos a mayores tiempos de cosecha como ha sido reportado (97). Aislamientos pertenecientes al género *Enterobacter* han sido reportados por su efecto PCV en ensayos de inoculación de plantas de arroz y en el álamo de Virginia (71, 140). Particularmente en el caso de cañas de azúcar micropropagadas se ha indicado que la inoculación con cepas pertenecientes al género *Enterobacter* resultó en la PCV de la planta y la incorporación a los tejidos vegetales de N proveniente de la FBN calculado en un 28 % (87). En el caso del género *Shinella*, este es el primer estudio en que se describe como bacteria PCV en asociaciones no simbióticas.

En referencia a la inoculación con la cepa de referencia *G. diazotrophicus* Pal5 no se observaron diferencias significativas en las variables de la planta medidas con respecto al control bajo las condiciones ensayadas, excepto en la altura. Teniendo en cuenta que *G. diazotrophicus* Pal5 es una cepa que ha sido señalada por su capacidad de PCV de plantas de caña de azúcar y que en el presente estudio no se observaron dichos efectos, una posible explicación es que la interacción genotipo planta - genotipo bacteriano no sea compatible. En estudios en variedades plantadas en India de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* y *B. vietnamensis* se observó ausencia del efecto PCV documentado para el caso de *H. seropedicae* (52). De esta forma el presente ensayo constituye un nuevo ejemplo de la especificidad de la interacción planta-bacteria y justifica la ya realizada construcción de una colección bacteriana a partir de plantas cultivadas en el país.

Con referencia al tratamiento donde se inoculó una mezcla de las cepas, solamente se observaron diferencias significativas con respecto al control en la variable altura de la planta. En estudios donde se inocularon cañas de azúcar micropropagadas con distintas formulaciones de mezclas bacterianas, se obtuvieron diferentes respuestas por parte de la planta. Ciertas combinaciones potenciaron los efectos individuales de las cepas mientras que otras combinaciones redujeron dichos efectos sugiriendo la ocurrencia de interacciones negativas

entre algunas cepas (52, 97). Dichas interacciones de competencia entre cepas fueron posteriormente visualizadas mediante la aplicación de la técnica de FISH y el recuento por NMP en plantas de caña de azúcar (96). Estos resultados indican la importancia del ambiente en que se realiza la inoculación de una cepa, resultando en que la presencia de ciertas características competitivas en cuanto a la colonización e infección de tejidos serán importantes en la interacción con el hospedador.

A partir de las plantas micropropagadas sin inocular y esterilizadas superficialmente se realizó el aislamiento de una bacteria que se asoció filogenéticamente con el género *Microbacterium*. Aislamientos pertenecientes a dicho género han sido reportados asociadas a plantas de caña de azúcar así como también en plantas de sorgo, trébol y frijol (150). Por otro lado, *Microbacterium* junto con *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* y *Pseudomonas* han sido señalados como exhibidores de los mayores niveles de colonización y habilidad para persistir en el interior de los tejidos (123). Como dicho aislamiento fue realizado a partir de plantas provenientes de cultivos *in vitro*, se sugiere que puede existir una estrecha relación entre el mismo y las plantas de caña de azúcar. Por lo tanto, si bien el objetivo inicial fue estudiar el efecto PCV por bacterias individuales, los resultados obtenidos siguen siendo comparables y resultan interesantes frente al estrecho vínculo sugerido de *Microbacterium* con la caña de azúcar.

El presente ensayo mostró la existencia, en la colección de bacterias asociadas a caña de azúcar, de al menos dos aislamientos que bajo las condiciones ensayadas evidenciaron PCV de plantas de caña de azúcar. Sin embargo se sugiere que el ensayo de PCV de plantas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con dichos aislamientos sea repetido para obtener mayor rigor estadístico en los resultados.

En la última década varios estudios han sido realizados buscando mejorar y optimizar el beneficio del crecimiento vegetal, a partir de varias interacciones planta-endófito. Sin embargo la mayoría de los experimentos en que se evaluaron dichos efectos han sido conducidos en condiciones controladas. Cuando las plantas inoculadas son llevadas a condiciones de campo se observa una disminución en el efecto promotor del crecimiento vegetal, pudiendo ser afectada por el tipo de suelo, la variedad y edad de la planta y en el caso de los diazotófos, por el contenido N de los suelos. Por dicho motivo, las investigaciones tienden a la búsqueda de la reducción de la cantidad de N agregado buscando optimizar la relación fertilizante nitrogenado-bacterias diazotófas eficientes (18). Siguiendo estas líneas

de pensamiento, el resultado del presente trabajo constituye el insumo básico para futuros ensayos donde se podrá evaluar el desempeño de los aislamientos en sistemas más complejos en condiciones no controladas. El esfuerzo a realizar en la búsqueda de un inoculante bacteriano para un cultivo es muy grande y más aislamientos han de ser evaluados así como diferentes formulaciones de mezclas bacterianas. En referencia a la evaluación de la PCV de plantas de caña por los aislamientos seleccionados, la próxima etapa sería la realización de ensayos en invernáculo inoculando las mismas bacterias sobre esquejes de cañas (yemas) en sustrato no estéril para finalmente realizar ensayos a nivel de campo. Los ensayos a nivel de campo permitirán además de evaluar la agresividad de la colonización bacteriana, la medición de otras variables del cultivo que son importantes en la productividad como ser los azúcares totales.

CAPITULO 3

ESTUDIOS DE LA INFECCIÓN Y LA COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR MICROPROPAGADAS POR POSIBLES ENDÓFITOS BACTERIANOS

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Determinar la naturaleza endofítica de *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. mediante estudios de interacción planta-bacteria.
- 2- Estudiar mediante microscopía la distribución de *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 en plantas de caña de azúcar.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Estudios de la interacción entre plantas de cañas de azúcar micropropagadas y aislamientos bacterianos marcados con genes reporteros

Enterobacter sp. UYSO10 y *Shinella sp.* UYSO24 fueron seleccionados por su capacidad promotora del crecimiento de cañas de azúcar de la variedad LCP 85-384 micropropagadas en invernáculo para realizar estudios microscópicos de infección y colonización. Para ello, se realizaron dos enfoques metodológicos: 1- Inoculación de plantas de caña de azúcar con aislamientos marcados con genes reporteros visualizándose mediante microscopía de fluorescencia y 2- inoculación de plantas de caña de azúcar con los aislamientos de interés visualizándose mediante microscopía óptica y electrónica. En ambos casos se utilizaron plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384.

1.1.1 Preparación de células competentes de los aislamientos bacterianos

Los aislamientos de interés (*Shinella sp.* UYSO24 y *Enterobacter sp.* UYSO10) fueron crecidos en Dygs o TY a 30°C por 24 horas. Un inóculo de 100 µl de cada cultivo fue utilizado para inocular matraces conteniendo 220 ml de medio NFB malato + N + P (Anexo), TY o Dygs. Una vez alcanzada la densidad óptica (D.O.₆₂₀) de 0.6, los cultivos fueron centrifugados a 4 °C a 3.000 g por 10 minutos. El pellet celular obtenido fue lavado en primera instancia con 40 ml de H₂O destilada estéril centrifugándose en iguales condiciones. Posteriormente las células se suspendieron en 40 ml de glicerol 15 % estéril centrifugándose a 3.000 g por 25 minutos. Finalmente el sobrenadante fue descartado y las células suspendidas en el glicerol residual de forma de obtener una suspensión densa (128). Todo el protocolo se realizó manteniendo las muestras en hielo. A partir de la suspensión final se tomaron alícuotas de 35 µl las cuales fueron guardadas a -80 °C.

1.1.2 Transformación de células competentes de los aislamientos bacterianos

Treinta y cinco microlitros de células competentes se dejaron incubando en hielo conjuntamente con 15 µl de glicerol 15 % y entre 500-5000 ng del plásmido a introducir por 30 minutos (Tabla 1).

Posteriormente las células competentes de *Enterobacter* sp. UYSO10 incubadas con el plásmido, fueron colocadas en una cuba de 2 mm y sometidas al programa de choque eléctrico pre-programado para *Pseudomonas*: 350 V de descarga eléctrica y 330 μ F de capacitancia (128) en un Electro cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System). Las células fueron recuperadas en 1 ml de medio rico TY sin antibiótico e incubadas a 30 °C por 2 horas.

Los aislamientos que incorporaron el plásmido que contiene el gen reportero se seleccionaron teniendo en cuenta la resistencia a antibiótico codificada en el mismo plásmido. Con el objetivo de elegir la concentración de antibiótico adecuada al momento de la selección, se estudió previamente la resistencia natural a antibióticos por las células competentes y electroporadas. Se evaluó la resistencia a los antibióticos: Tetraciclina (Tc), Kanamicina (Km) y Gentamicina (Gm). Las concentraciones ensayadas según los antibióticos fueron: Tc 10, 40, 80 y 160 μ g/ml, Km y Gm 10, 20, 40, 80 y 160 μ g/ml.

Finalmente la suspensión de células transformadas se plaqueó en medio TY con el antibiótico correspondiente según el plásmido utilizado. Las colonias obtenidas se purificaron repicándolas nuevamente en placas conteniendo el mismo medio con antibiótico.

Tabla 1. Plásmidos y genes reporteros utilizados en este estudio.

Plásmidos	Resistencia al antibiótico	Reportero	Máxima excitación/emisión (nm)	Tamaño (pb)	Referencia
pMP4655	Tc	EGFP	484/507	14200	
pMP4641	Tc	ECFP	436/476	14200	(19)
pMP4658	Tc	EYFP	514/527	14200	
pMP4662	Tc	DsRed	558/500, 583	14200	
pHRGFPGUS	Amp, Km	GFP, GUS	395/508, espectro visible	10313	(109)
pHRGFPTc	Amp, Cm, Tc	GFP	395/508	9233	

En el caso de *Shinella* sp. UYSO24 las condiciones de transformación utilizadas anteriormente no fueron eficaces por lo que se decidió en primera instancia realizar pruebas para establecer las condiciones utilizando el plásmido pMP4641. Se evaluaron diferentes condiciones de descargas eléctricas: 0.35, 1.2 y 2.5 KV y de resistencia del sistema por el aumento del volumen de células competentes (35 y 65 μ l) en un Electroporador de BIORAD Micropulser. Las células fueron recuperadas en 1 ml de medio TY e incubadas a 30 °C por 5 horas. A continuación la suspensión fue distribuida en placas conteniendo medio TY con el antibiótico correspondiente y finalmente las colonias obtenidas fueron purificadas repicándolas en placas conteniendo el mismo medio de cultivo con antibiótico.

Para corroborar la incorporación del plásmido en los aislamientos, a los transformantes obtenidos se le extrajo el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (125). Para esto 2 ml de cultivos crecidos en medio TY toda la noche, se centrifugaron a 10.000 g por 1 minuto. El pellet obtenido se suspendió en 200 μ l de Solución I (glucosa 50 mM, Tris.Cl 25 mM pH 8 y EDTA 10 mM pH 8). A continuación a la suspensión obtenida se le agregó 200 μ l de la Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) preparada en el momento, se la agitó suavemente y se la dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se le agregó 200 μ l de la Solución III (acetato 5 M, ácido acético 11,5 %) enfriándose en hielo por 3 minutos. A continuación se agregaron 100 μ l de cloroformo centrifugándose a 10.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue extraído y se le agregó 0.7 volúmenes de isopropanol, agitándose por inversión y dejándose precipitar el ADN en hielo por al menos 20 minutos. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 10.000 g por 20 minutos y el pellet se lavó con EtOH 70 %. Finalmente, después de secar el pellet en vacío durante 10 minutos utilizando una speedvack LAXBCONCO, el ADN se suspendió en 30 μ l de T₁₀E₁ (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), conteniendo ARNasa 20 μ g/ml. La presencia de los plásmidos se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (p/v) en buffer TAE sometido a 90 V. Los geles fueron posteriormente teñidos con Bromuro de etidio y expuestos a U.V. para su visualización.

En paralelo la incorporación de los plásmidos en las células hospederas también fue evaluada por la visualización de la señal característica emitida por el gen reportero. En el caso del gen reportero *gusA*, los transformantes fueron estriados en placas conteniendo medio TY con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D glucurónido (X-Gluc) 200 μ g/ml. En el caso de los transformantes que incorporaron el plásmido conteniendo el gen codificante para la proteína fluorescente GFP o alguna de sus variantes, cultivos líquidos de los mismos crecidos en medio con el

antibiótico correspondiente, fueron observados en el microscopio de fluorescencia Olympus IX81 invertido con los filtros adecuados. Los transformantes que incorporaron EYFP no pudieron ser observados con los filtros disponibles en los microscopios de fluorescencia y se observaron en microscopio Confocal Olympus BX 61 directo, fluoview FV300.

1.1.3 Inoculación de plantas de caña de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384 con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662

Plantas micropropagadas en etapa de enraizamiento de la variedad LCP 85-384 fueron transferidas a un nuevo frasco conteniendo medio de cultivo MS modificado. Al tercer día los frascos que no mostraron contaminación fueron inoculados con 1×10^7 células de los transformantes *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 (DsRed). Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. Las plantas fueron cosechadas a las 6, 12, 24, 48 horas y 6 días post inoculación (pi), donde se separó el tejido aéreo y el radicular. Las muestras fueron guardadas en PBS:agua (1:10) (Anexo) hasta su análisis. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

La visualización se realizó en el Laboratorio de Biología Celular e Tecidual, de la Universidad Estadual do Norte Fluminense en el marco de una pasantía. Raíces enteras y cortes longitudinales realizados a mano con bisturí fueron observadas en microscopio de fluorescencia Axioplan (Zeiss). En paralelo fragmentos de raíces fueron teñidos con 4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI) mediante inmersión en una solución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 10 minutos como es recomendado por el fabricante.

1.1.4 Ensayo de adhesión de *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 y *Shinella* sp. UYSO24-pMP4641 a *Zea mays* (maíz) como planta modelo

Semillas de maíz fueron esterilizadas superficialmente mediante lavado con EtOH 70% seguido de inmersión en NaClO 4 % por 5 minutos y 6 lavados con agua destilada estéril (54). A continuación, las semillas se dejaron en remojo por 6 horas y se depositaron para su germinación en placas de agar-agua 0,8 % a 25 °C en oscuridad. Las semillas germinadas se transfirieron a tubos de planta conteniendo 20 ml en volumen de vermiculita estéril. Las semillas fueron cubiertas con una nueva capa de vermiculita e inoculadas con 1×10^7 células. Los tratamientos fueron: plantas inoculadas con la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662

(DsRed) y plantas inoculadas con *Shinella* sp. UYSO24-pMP4641 (ECFP). Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. A las 6, 12, 24 y 72 horas pi las plantas fueron cosechadas, realizándose inmediatamente observaciones de la superficie de las raíces y de cortes longitudinales realizados a mano con bisturí, utilizando el microscopio de fluorescencia Axioplan (Zeiss).

1.2 Estudio de la interacción entre *Enterobacter* sp.UYSO10-pMP4662 y plantas micropropagadas de la variedadLCP 85-384 a través de Microscopía Óptica, Electrónica de Transmisión y de Barrido

El material vegetal procesado en este punto proviene del ensayo realizado para el estudio de interacción entre cañas de azúcar micropropagadas y bacterias marcadas con genes reporteros, descrito en el punto 1.1.3.

1.2.1 *Procesamiento de las muestras para estudios de Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Transmisión*

Procesamiento de muestras vegetales. El material seleccionado para analizar fue la base del tallo y las raíces, por ser los sitios con mayor probabilidad de encontrar bacterias endófitas. En una primera instancia las muestras fueron seccionadas a mano con gillete sobre placa de parafina. Los segmentos obtenidos fueron lavados con solución PBS y fijados toda la noche a temperatura ambiente en solución de glutaraldehído 5 % y paraformaldehído 4 % en PBS, (69). Con la finalidad de remover el fijador residual, las muestras se lavaron con PBS. A continuación se procedió a la deshidratación del material mediante incubación de los tejidos en una serie de soluciones de concentración creciente de EtOH (15, 30, 50, 70, 90 y 2 veces en 100 %) (v/v) durante 15 minutos en cada una de las soluciones. Posteriormente las muestras se sometieron a infiltración con la resina acrílica "LR White" mediante inmersión de la muestra en concentraciones crecientes de la misma a 4 °C durante un periodo de 7 días (69). Las muestras individuales, fueron cuidadosamente transferidas a cápsulas transparentes de gelatina conteniendo resina, orientadas para obtener cortes transversales y puestas a polimerizar toda la noche a 60 °C. Las cápsulas polimerizadas fueron llevadas a la lupa del ultramicrotomo Reichert ultracut Leica y seccionadas a mano con el fin de obtener bloques de forma trapezoidal que incluyeran la muestra. A partir de estos bloques se realizaron cortes para obtener muestras semifinas (0.9 - 1 µm) para microscopía óptica con cuchillas de vidrio

preparadas en Knife maker II Reichert-Jung. Las secciones semifinas fueron colectadas en portaobjetos de vidrio conteniendo una gota de agua, fijadas en placa metálica caliente e inmediatamente teñidas con azul de toluidina 0.2 % por unos segundos (69). Los cortes se visualizaron en microscopio óptico de campo claro utilizando los lentes: 10x, 20x, 40x y 100x.

Para los estudios con microscopía electrónica de transmisión se realizaron cortes ultra-finos de 60 - 70 nm en el ultramicrotomo Reichert ultracut Leica utilizando una cuchilla de diamante. Las secciones fueron colectadas en gradillas de cobre hexagonal de malla 300 - 400. Las muestras secadas en papel de filtro, se contrastaron por inmersión en una solución de acetato de uranilo 5 % durante 20 minutos seguido de 2 lavados con agua destilada. A continuación el material se incubó con citrato de plomo 0.2 % preparado en NaOH 0.01 N por 4 -5 minutos, seguido de 2 lavados con agua destilada (94). Las muestras fueron examinadas en microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-900.

Procesamiento de cultivos bacterianos. Un mililitro y medio de un cultivo de *Enterobacter* sp. UYSO10 crecido toda la noche en medio Dygs fue centrifugado a 10.000 g por 10 minutos y las células lavadas con PBS. Posteriormente las células se sometieron a una serie de deshidratación etanólica como fue descrito anteriormente, con la variación de que los tiempos de incubación en cada solución fueron de 5 minutos. Por último las células fueron sometidas a una serie de concentración creciente de resina "LR White" a 4 °C durante 4 días e incluidas en cápsulas de resina polimerizada. Los cortes en el ultra-microtomo se realizaron como se describió anteriormente.

1.2.2 Procesamiento de las muestras para estudios de Microscopía Electrónica de Barrido

Muestras de raíces fueron fijadas, lavadas y deshidratadas con etanol como fue descrito en el punto anterior. A continuación las muestras fueron transferidas para su secado completo (117) en el equipo Critical Point Drying (CPD 030 BALTEC), donde el etanol es sustituido inicialmente por CO₂ líquido, el cual posteriormente se transforma en gas por aumento de la temperatura y la presión hasta alcanzar el punto crítico de secado. Posteriormente las muestras fueron cubiertas con un metal conductor, en este caso con una película de paladio de aproximadamente 10 - 20 nm de espesor, por la aplicación de una corriente de 40 mA por 150 segundos en un Sputter Coater SCD 050 (BALTEC). Las muestras se observaron en Digital Scanning Microscope Zeiss DSM-962 utilizando un voltaje entre 15 y 24 kv.

2 RESULTADOS

2.1 Estudios de interacción entre la variedad micropropagada LCP 85-384 de caña de azúcar y *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 por microscopía de fluorescencia

2.1.1 Transformación de *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 con genes reporteros

Con la finalidad de conocer y estudiar la naturaleza endofítica de las cepas de interés, se realizaron diferentes aproximaciones. La primera de ellas implicó la introducción de plásmidos conteniendo genes reporteros en los aislamientos de interés. Para ello, en una primera instancia se estudio la sensibilidad natural de los mismos a los antibióticos de selección (Tabla 2). Una vez conocida la misma, se ensayaron varias condiciones de transformación, obteniéndose transformantes tanto para *Enterobacter* sp. UYSO10 como para *Shinella* sp. UYSO24 (Tabla 3).

La incorporación de los plásmidos fue corroborada mediante: 1- la selección de colonias resistentes a los antibióticos introducidos con los plásmidos, 2- la visualización de una señal fluorescente en el rango del espectro adecuado para cada fluoróforo o color azul en el espectro visible visualizada en el caso del plásmido conteniendo el gen *gusA*, y 3- la extracción del plásmido incorporado y su visualización en geles de agarosa (Figura 5).

Tabla 2. Resistencia de los aislamientos a diferentes antibióticos.

Aislamiento	Máxima dosis del antibiótico en la cual se observa crecimiento ($\mu\text{g/ml}$)		
	Tc	Km	Gm
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	10	40	40
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	40	160	40

En el caso de *Enterobacter* sp. UYSO10 se obtuvieron transformantes mediante la preparación de células competentes a partir de un cultivo crecido en NFB malato +N +P y electroporación con todos los plásmidos menos pMP4655 (Tabla 3). Las variables de la transformación fueron la aplicación de un choque eléctrico de 350 V y 330 μF . Para casi todas las transformantes, se

corroboró la visualización del gen reportero en el espectro de excitación/emisión adecuado (Figura 1), así como la presencia del plásmido introducido. En el caso *Enterobacter* sp. UYSO10-pHRGFPGUS, se observó una señal muy débil de la proteína GFP, lo mismo fue reportado en transformantes de *G. diazotrophicus* Pal5 con dicho plásmido (121). Sin embargo, la excepción fue *Enterobacter* sp. UYSO10- pHRGFPTc donde no se observó señal en el espectro adecuado, pudiendo deberse a un problema de expresión de la proteína verde fluorescente en dicho contexto genético. En la Figura 2 se muestran los resultados de la extracción plasmídica a partir de algunas de las transformantes obtenidas.

Transformantes de la cepa *Shinella* sp. UYSO24 con el plásmido pMP4641 (ECFP) fueron obtenidas cuando se utilizaron células competentes a partir de cultivos crecidos en medio rico TY. Las condiciones de transformación ensayadas que resultaron efectivas para esta cepa fueron en las que se empleó tanto 350 V como 2.5 KV de choque eléctrico, a 65 o 35 μ l de células competentes. Si bien se obtuvieron transformantes en varias condiciones, la eficiencia de la transformación fue baja, obteniéndose mayor número de transformantes cuando se aplicó un choque eléctrico de 350 V a 65 μ l de células competentes. La incorporación del plásmido fue corroborada por visualización del gen reportero en el espectro de excitación/emisión adecuado (Figura 1), así como por extracción de un plásmido de tamaño similar al esperado (14.200 pb).

Tabla 3. Listado de los transformantes obtenidos.

Cepa	Plásmido	Reportero
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	pHRGFPGUS	GFP y GUS
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	pHRGFPTc	GFP
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	pMP4658	EYFP
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	pMP4641	ECFP
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	pMP4662	DsRed
<i>Shinella</i> sp. UYSO024	pMP4641	ECFP

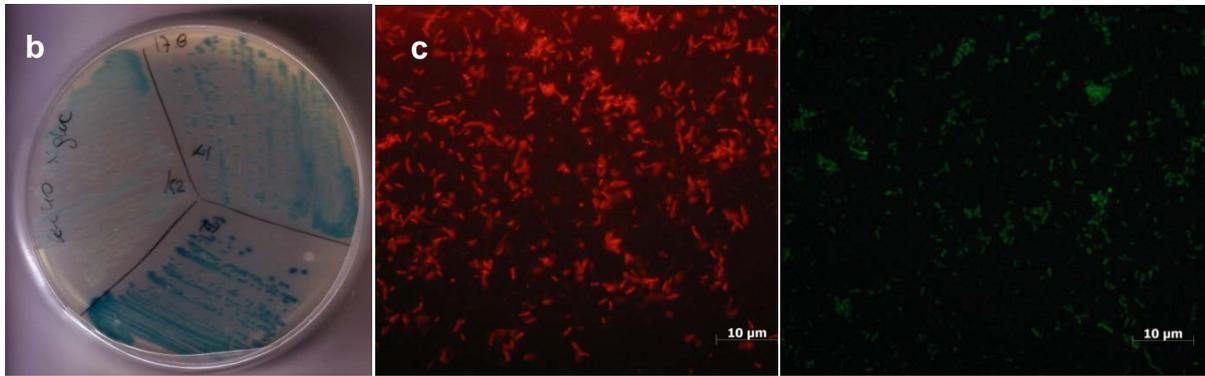


Figura 1. Visualización de la señal del gen reportero incorporado en cepas de *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24. *Enterobacter* sp. UYSO10 con los plásmidos a- pHRGFPGUS, b- pMP4662 y c- *Shinella* sp. UYSO24 con el plásmido pMP4641.

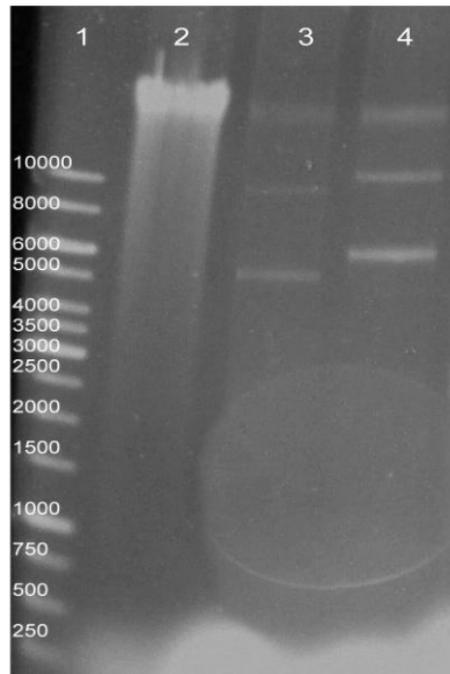


Figura 2. Extracción del ADN plasmídico. Carriles: 1- Marcador del peso molecular Generuler 1 Kb, 2- *Enterobacter* sp. UYSO10 (salvaje), 3- *Enterobacter* sp. UYSO10-pHRGFPGUS y 4- *Enterobacter* sp. UYSO10-pHRGFPGUS.

2.1.2 Estudios de interacción entre cañas de azúcar micropropagadas y *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662

Con el fin de estudiar los mecanismos de infección y localización de los aislamientos seleccionados, la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 fue inoculada en plantas de cañas de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384. Muestras de raíces y tallos fueron cosechadas a diferentes tiempos con la finalidad de realizar un seguimiento de la infección bacteriana durante el tiempo. Las muestras fueron observadas por microscopía de fluorescencia. Usando esta aproximación no se observó señal positiva de los genes reporteros cuando se examinó la superficie de las raíces, así como cortes longitudinales de las mismas. Esto puede deberse a varios factores: ausencia de bacterias asociadas al tejido que se está examinando, problemas de expresión de la proteína en la bacteria bajo las condiciones ensayadas, o la pérdida del plásmido por parte de la bacteria por presión de las condiciones ensayadas. Para descartar que la falta de señal fluorescente fuese debido a la ausencia de bacterias en el tejido estudiado, el mismo fue teñido con DAPI y observado por microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron la presencia de bacterias en la superficie de las raíces de plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662, siendo la señal poco frecuente y dispersa (Figura 3).

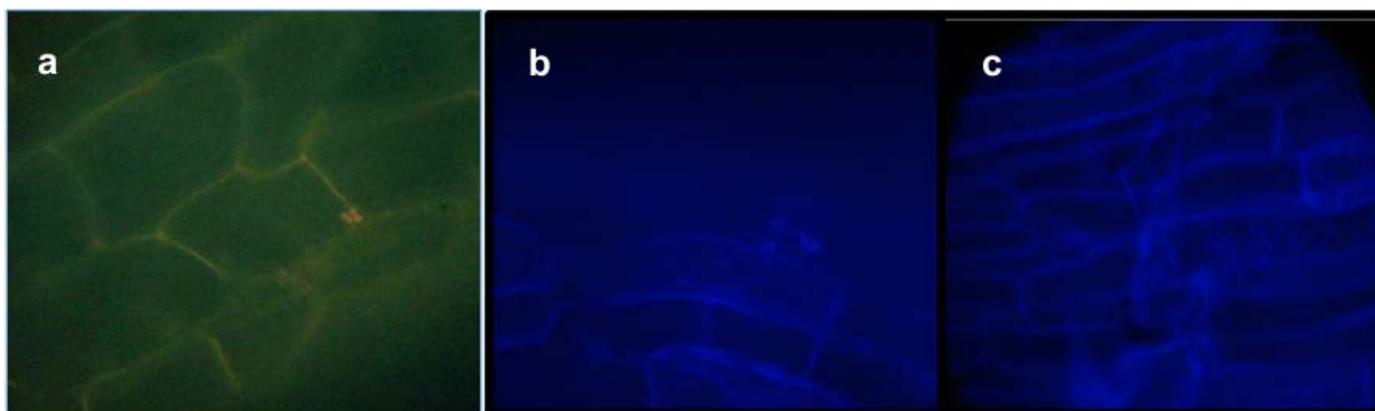


Figura 3. Vista superficial de raíces de cañas de azúcar micropropagadas e inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662, 24 horas pi. **a-** vista con los filtros adecuados para visualizar la proteína DsRed, **b** y **c**-tinción con DAPI.

Otra posible causa pudo haber sido que la ausencia de fluorescencia se deba a que la emisión de la DsRed esté siendo interferida por las condiciones ensayadas, como ser el pH ácido del medio de cultivo utilizado. Para evaluar esta posibilidad, se realizó el mismo ensayo utilizando como planta modelo maíz y como sustrato vermiculita estéril (Figura 4). El material fue procesado de la misma manera y las muestras obtenidas se analizaron por microscopía de fluorescencia. Mediante esta aproximación tampoco se consiguió visualizar señal fluorescente.



Figura 4. Plantas de maíz inoculadas con *Enterobacter sp.* UYSO10-pMP4662 y *Shinella sp.* UYSO24-pMP4641. Como control negativo se utilizaron plantas de maíz sin inocular.

2.3 Estudios de interacción entre la variedad micropropagada LCP 85-384 de caña de azúcar y *Enterobacter sp.* UYSO10-pMP4662 por microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido

Debido a que no se consiguió estudiar la interacción bacteriana a través del uso de genes reporteros, se utilizó como aproximación complementaria el estudio de las mismas muestras empleando microscopía óptica así como electrónica de transmisión y de barrido. Los resultados se presentan siguiendo las etapas definidas en el proceso de interacción: primero se estudió la adhesión superficial de las bacterias y luego su distribución (infección y colonización).

Adhesión bacteriana a raíces y tallos de caña de azúcar: Para este estudio se prepararon muestras de raíces y tallos de plantas micropropagadas inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 o sin inocular como control negativo. Las muestras fueron visualizadas por microscopía óptica y electrónica de barrido. Los resultados mostraron la presencia de bacterias individuales y aisladas, adheridas de forma apolar a la superficie de las raíces a las 6 horas pi (Figura 5^a). A mayores tiempos pi, las bacterias se encontraron únicamente formando agregados ubicados en la zona pilífera de la raíz (Figura 5b-d). Los agregados fueron más frecuentes y grandes después de las 24 horas pi. Asimismo en un ejemplar se visualizó la adhesión bacteriana en forma de película sobre la emergencia de una raíz lateral (Figura 5e). En la misma las bacterias parecen adheridas por una sustancia mucosa. Es de destacar que las aberturas naturales y heridas en la raíz son un típico sitio de infección por parte de bacterias endófitas. Por otra parte, en las muestras analizadas no se observaron bacterias en los tallos. En las plantas control se observó la presencia puntual a nivel de las hojas de 2 bacterias aisladas. En el resto del tejido no se observó la formación de agregados ni la presencia de películas bacterianas.

Infección y colonización de raíces y base del tallo de plantas de caña de azúcar por *Enterobacter* sp UYSO10-pMP4662. Mediante estudios de microscopía óptica, se observó la presencia bacteriana en casi todos los cortes de raíces y base de tallo en plantas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662. En la Tabla 4 se muestra una breve descripción de la presencia y localización de las bacterias según tejido (raíz o tallo) y el tiempo post-inoculación en que se tomaron las muestras.

Los estudios de visualización de la infección bacteriana a lo largo del tiempo mostraron la presencia de bacterias en los espacios intercelulares de las raíces a partir de las 6 horas pi. A las 12 horas pi, se observaron bacterias en los haces vasculares de las raíces y a partir de las 24 horas pi se las observó tanto en los espacios intercelulares como en los haces vasculares de raíces y base del tallo (Figura 6). Si bien la mayoría de las veces que se las encontró en espacios intercelulares fue en el cortex del tallo, también se las observó en el cilindro central del mismo.

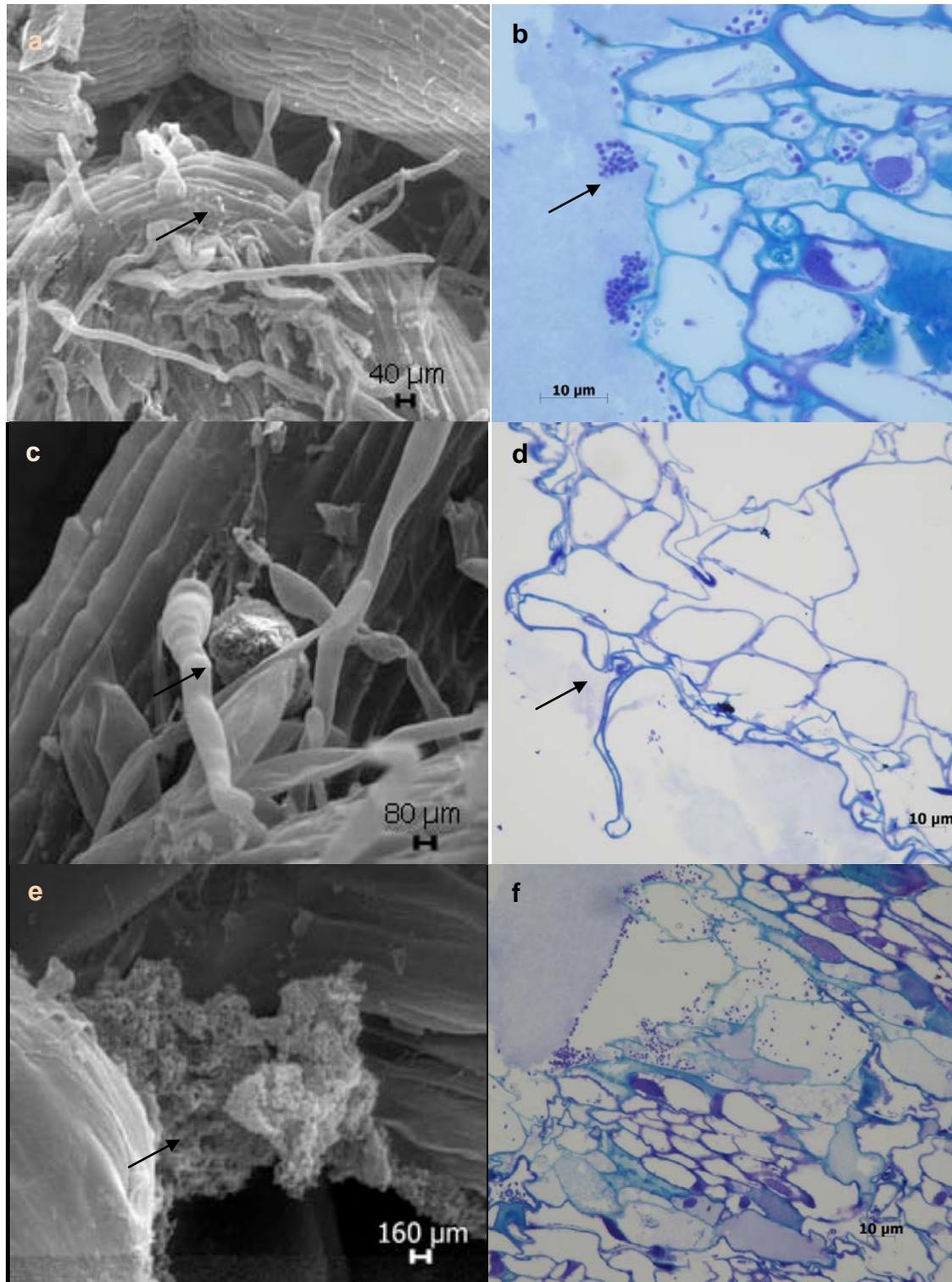


Figura 5. Adhesión de la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 a raíces y tallos de plantas de caña de azúcar. a- Microscopía electrónica de barrido (MEB) 6 horas pi, se observa la adhesión de bacterias aisladas a la superficie de raíces y base del tallo, b- Microscopía óptica (MO) 12 horas pi, vista de

agregados en la superficie de la base del tallo, c- MEB 24 horas pi, se ve un agregado superficial cerca de la base de los pelos radicales, d- MO 6 horas pi, vista de pequeño agregado en la base de un pelo radicular, e- MEB 24 horas pi, se observa una película bacteriana sobre la abertura natural de una raíz lateral y f- MO 12 horas pi, se visualiza infección bacteriana a partir de heridas presentes en la base del tallo.

MO: microscopía óptica, MEB: microscopía electrónica de barrido, pi: post inoculación.

Las escalas de las fotos de MO se encuentran en las fotos.

Tabla 4. Descripción de la presencia y localización bacteriana en los cortes analizados por microscopía óptica.

Tiempo de cosecha pi	<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10-pMP4662		Control (sin inocular)	
	Raíz	Base del tallo	Raíz	Base del tallo
6 horas	(3/3)* Infección de EI**	(2/2) Infección de EI en parénquima medular y cortical		
12 horas	(1/2) Infección bacteriana en gran número en EI y TV**	(1/1) Poca infección EI		
24 horas	(2/3) Infección de EI	(2/2) Colonización de EI parénquima medular y cortical y gran infección de TV	(2/2) Pocas bacterias aisladas en IC	(1/1) Pocas bacterias EI y TV
48 horas	(3/3) Infección de EI y escasa en TV			(1/1) Varias infecciones en EI y puntualmente en TV
6 días	(2/2) Infección de EI	(2/2) Infección EI y en gran número en TV		

* Presencia de bacterias en un corte/ total de cortes analizados

** EI: espacios intercelulares, TV: tejido vascular, pi: post inoculación

Asociada a la colonización de las bacterias en los espacios intercelulares se observa la apertura espacial de los mismos (Figura 6b y Figura 7a), probablemente debido a que las bacterias degradan la lámina media que une las paredes de las células vegetales. Por otra parte, no se visualizaron estructuras de la planta que se encontraran aparentemente involucradas en el proceso de infección y conducción de las bacterias a través de los tejidos. Sin embargo, se observó la producción de una sustancia mucosa por parte de la planta (Figura

6b y c). Se conoce que la producción de sustancias de este tipo puede estar asociada a respuestas patogénicas, sin embargo las técnicas de microscopía no pueden evidenciarlo.

En las plantas usadas como control negativo también se observó la presencia bacteriana. Sin embargo, entre las bacterias endófitas observadas en ambos casos se observaron algunas diferencias: 1- la densidad aparente de colonización: las bacterias vistas en plantas inoculadas aparecen en mayor densidad e infectando áreas más grandes de los cortes; 2- distribución de la infección: en plantas inoculadas se observaron distribuciones discretas y distales con respecto al centro de la base del tallo y 3- afinidad por el colorante azul de toluidina: las bacterias de plantas inoculadas absorben más dicho colorante (Figura 7). Estas diferencias entre las bacterias observadas podrían explicarse por la presencia de al menos una especie bacteriana contaminante en las plantas de caña de azúcar micropropagadas. Por otro lado, en todos los tratamientos se observó reacción mucosa por parte de la planta.

Con el objetivo de complementar las observaciones realizadas y aportar más datos al estudio de la infección de plantas micropropagadas de caña de azúcar por *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662, se realizaron estudios por microscopía electrónica de transmisión. Mediante esta técnica se observó en plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 la presencia de dos morfotipos bacterianos. La diferencia aparente entre ambos morfotipos radica en el contorno externo celular, distinguiéndose un morfotipo liso (Figura 8a y b) y uno rugoso (Figura 8c y d). Por otro lado, en las plantas usadas como control, se observó solamente el morfotipo bacteriano rugoso (Figura 9a y b). Estas observaciones apoyan la hipótesis anteriormente planteada de que las plantas micropropagadas usadas en este estudio no se encontraban libres de bacterias, sino que al menos presentaban un tipo bacteriano "contaminante". Por lo tanto en plantas micropropagadas e inoculadas se espera encontrar las bacterias "contaminantes" y *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662.

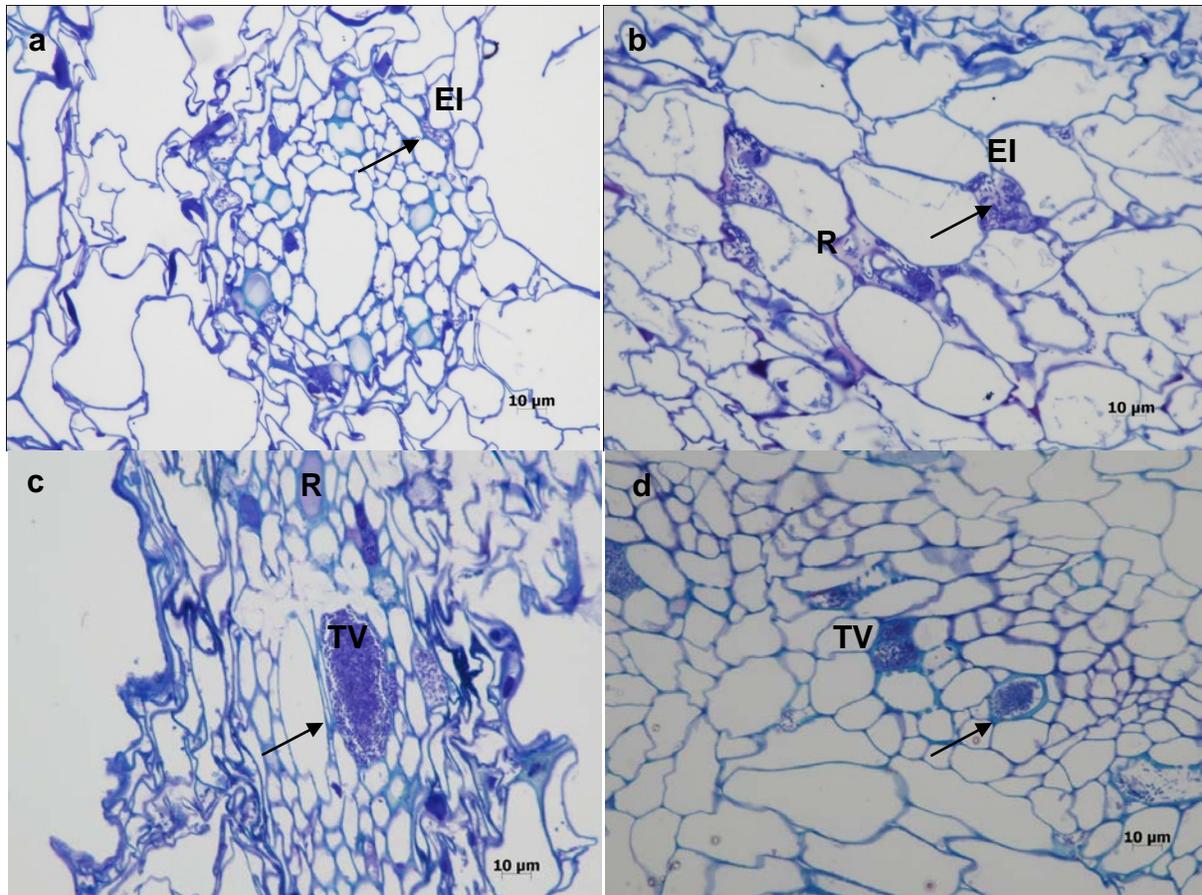


Figura 6. Micrografías ópticas mostrando la infección de plantas micropropagadas por *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662. Seis horas pi: se observan bacterias en espacios intercelulares en a-raíz y b- base de tallo. c- 12 horas pi: se observan bacterias infectando los tejidos vasculares de raíces. d- 24 horas pi: se observa infección en tejidos vasculares de la base del tallo. Las escalas se muestran en las fotografías. EI: espacios intercelulares, TV: tejido vascular, R: reacción mucosa de la planta.

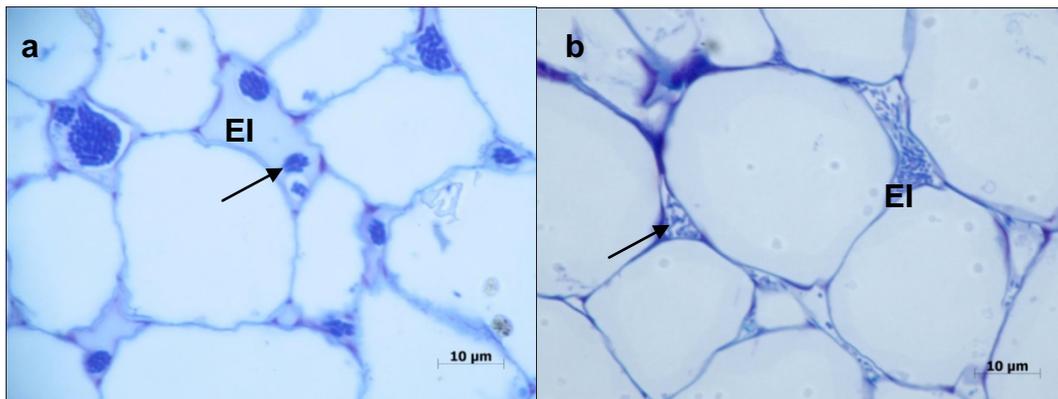


Figura 7. Comparación de la afinidad por el colorante azul de toluidina de las bacterias endófitas de la base del tallo de plantas micropropagadas e inoculadas con a-*Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 y b- plantas control.

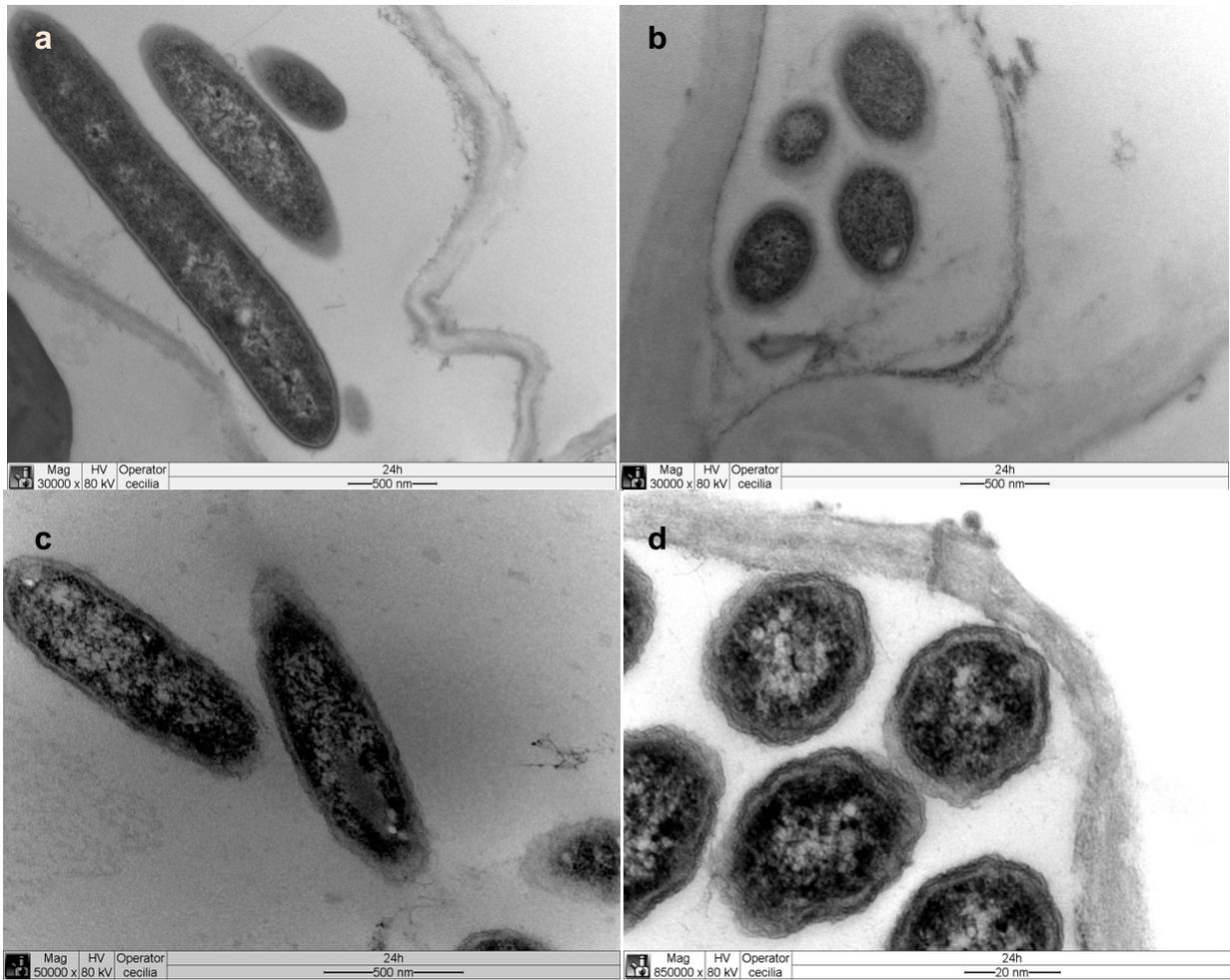


Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de cortes de la base del tallo de plantas micropropagadas e inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662. a y b- bacterias endófitas de morfotipo liso. c y d- bacterias endófitas de morfotipo rugoso. Las escalas se encuentran en cada fotografía.

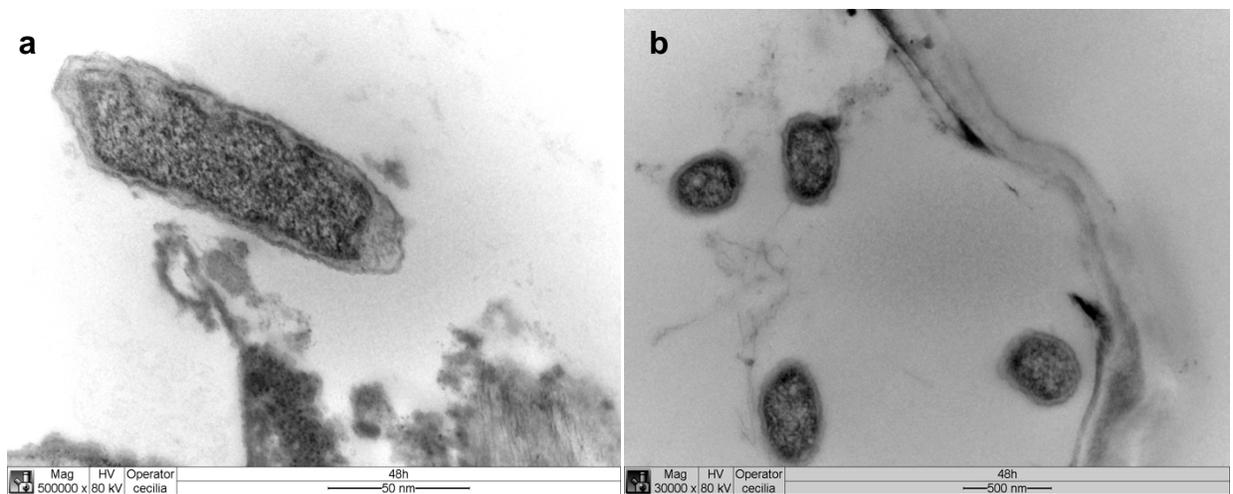


Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de cortes de la base del tallo de plantas micropropagadas sin inocular. a y b- bacterias endófitas de morfotipo rugoso.

Finalmente y con objetivo de comparar la morfología de *Enterobacter* sp. UYSO10, se visualizó en MET cultivos puros de la cepa. Las mismas mostraron una morfología lisa (Figura 10).

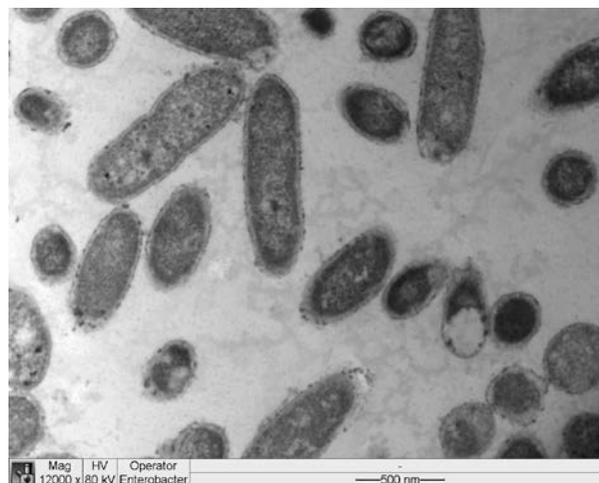


Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de cultivos puros de la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10.

3 DISCUSION

En condiciones naturales las plantas se encuentran en contacto íntimo con bacterias endófitas, siendo sus efectos sobre las mismas aún no comprensibles en su totalidad. Para aprovechar los efectos positivos de esta interacción, el desafío planteado es poder manejar las comunidades microbianas a favor de la colonización por bacterias benéficas. Sin embargo esto será posible solamente cuando se tenga un mejor conocimiento de la ecología y la interacción molecular de los endófitos y las plantas (120). Por lo tanto a la hora de pensar en una bacteria como posible inoculante es necesario contar con información ecológica sobre las características de su colonización epi- y endofítica si corresponde (143). Dado los resultados del ensayo de PCV en plantas de caña de azúcar micropropagadas presentados en el capítulo 2, se seleccionaron para profundizar en el estudio de su ecología las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24. Nos planteamos conocer si se trata de bacterias de distribución endófitas y si es así conocer aspectos de la infección y colonización en la planta.

Diversas metodologías basadas en la microscopía se han utilizado para estudiar la interacción entre bacterias y plantas tales como: i) microscopía de luz incluyendo la marcación por técnicas de inmuno histoquímica y la utilización de genes enzimáticos como *gusA* y *lacZ*, ii) microscopía electrónica de barrido y iii) microscopía de fluorescencia mediante el uso de sondas o anticuerpos marcados con fluoróforos o genes reporteros como *gfp* (20, 67).

Visualización de cepas transformadas con genes reporteros por microscopía de fluorescencia

Como primer enfoque al estudio de localización e infección de las bacterias seleccionadas se procedió a la marcación de las cepas con los reporteros GUS y AFP (proteínas auto fluorescentes). La mayor ventaja del uso de estos marcadores es que no se requieren de pasos previos de preparación de la muestra tales como etapas de fijación con agentes químicos que pueden resultar en modificaciones del material en estudio. La β -glucuronidasa (GUS) es codificada por el gen *gusA*. La técnica consiste en incubar la muestra con un sustrato adecuado cuyo producto de reacción posee coloración. Este es un ensayo simple, sensible y presenta la ventaja que las plantas generalmente no poseen señal de base. Por otro lado cuando las proteínas auto fluorescentes son excitadas con luz de determinada longitud de onda, emiten luz en una longitud de onda mayor sin precisar la adición de sustratos. La

utilización de las mismas como marcador posee varias ventajas: es estable, su aplicación es independiente de la especie, permite un análisis no invasivo y por lo tanto el monitoreo *in vivo* preservando la integridad celular (20). Dentro de las proteínas auto fluorescentes la más conocida es la proteína verde fluorescente, a partir de la cual se han desarrollado variantes que presentan pequeños cambios en el espectro de excitación y emisión, entre ellas: la *enhanced GFP* (EGFP), *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP), *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP). Posteriormente se desarrolló también la proteína roja fluorescente (DsRed) y variantes de la misma (76). Esta metodología ha sido aplicada con éxito al estudio de la colonización radicular por bacterias diazótrofes en cañas de azúcar (50, 92, 93). En el caso de diazótrofes también se ha conjugado la expresión de la proteína reportera con la del gen *nifH* de forma de visualizar su expresión *in vivo* (37, 119). A su vez, el uso de las diferentes variantes permitió realizar estudios de co-infección con diferentes poblaciones bacterianas de una misma cepa, visualizándose que la formación de agregados es realizada a partir de la colonización de una única bacteria permitiendo el agregado posterior de nuevas bacterias al agregado (19). Para el estudio de las interacciones en general y particularmente entre bacterias y plantas es recomendable utilizar vectores estables que presenten los genes reporteros y prescindir de mantener una presión de selección de las transformantes por uso de antibióticos. Con dicho objetivo se han desarrollado vectores que una vez introducidos en la células se incorporaran al genoma y otros vectores de clonado que son estables en ausencia de la presión del antibiótico (19, 136). La estrategia utilizada en este trabajo fue la transformación de las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 con genes reporteros presentes en plásmidos de amplio espectro y estables en ausencia de la presión de selección así como un plásmido que presenta tanto el marcador *gusA* como *gfp*. La utilización de este último plásmido presenta la ventaja de localizar en una primera instancia mediante la visualización de GUS los sitios preferenciales de colonización bacteriana para después realizar cortes en dichos sitios y observar con microscopía de fluorescencia la marcación por GFP que presenta mayor resolución. El uso de dichos plásmidos ya había sido reportado en ensayos de interacción planta-bacteria (19, 109, 121). La incorporación del plásmido a las células puede realizarse a través de conjugación, transformación o transducción. En el presente estudio se utilizó el método de transformación mediante electroporación, el cual consiste en el ingreso de ADN a una célula susceptible a través de la generación de un campo electromagnético. En el caso de la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10 se consiguieron transformantes con varios plásmidos, mientras que en el caso de *Shinella* sp. UYSO24 se consiguió la transformación con

un solo plásmido luego de poner a punto la técnica. El método de electroporación presenta la desventaja de que las condiciones adecuadas para cada especie deben ser ajustadas: se requiere determinar las condiciones del crecimiento bacteriano, la composición apropiada de la solución de electroporación que es determinada principalmente por la fuerza del campo eléctrico y la resistencia, contar con la cantidad, concentración y pureza apropiada del ADN a transformar y las condiciones adecuadas para seleccionar los transformantes (36).

A continuación se realizó un primer ensayo en plantas de caña de azúcar micropropagada así como de maíz (usada como planta modelo), inoculando la cepa marcada *Enterobacter* sp. UYSO10-pMP4662 (DsRed) y cosechando a distintos tiempo post inoculación, raíces y la base del tallo de las plantas. En ninguno de los ensayos se visualizó la señal proveniente del gen reportero utilizado cuando se observaron corte de raíces y tallos de plantas de caña de azúcar y maíz. Una posible explicación podría ser que no se esté expresando la proteína fluorescente en las condiciones ensayadas. Sin embargo, el plásmido pMP4662 fue construido para presentar expresión constitutiva a partir del promotor lac y ser estable en ausencia de la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos por fusión con el vector pME6010 (19). A su vez, el vector pME6010 posee un replicón que fue mantenido en el plásmido pMP4662 que es de amplio espectro siendo demostrada su utilización en varios géneros de bacteria Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Aeromonas* y *Comamonas*(59). Estas características lo hacen indicado para estudios de colonización rizosférica a lo largo de varios días donde el uso de antibióticos no es deseado. A pesar de las características ideales que presenta dicho plásmido, no se puede descartar que su presencia en el sistema utilizado de *Enterobacter* funcione diferente. Otra posible explicación puede ser que el plásmido no sea estable a la temperatura utilizada en el ensayo. Si bien en este estudio, se observó señal fluorescente en cultivos puros de *Enterobacter* sp. UYSO10 crecidos a 30 °C, se ha reportado que cepas de *Pseudomonas* transformadas con dicho plásmido fueron inestable a temperatura de 30 y 37 °C, observándose señal en la superficie de raíces de tomates inoculados y crecidos a temperaturas de 21 °C (19).

Para continuar con este enfoque, visualizando la interacción a través del uso de genes reporteros, el siguiente paso sería estudiar la emisión de señal roja fluorescente por parte de las bacterias transformadas a distintas temperatura, evaluando a su vez la necesidad de utilizar el marcador de selección. Por lo tanto, como perspectivas queda poner a punto la visualización de la proteína reportera DsRed, así como la puesta a punto de la tinción en

planta del gen reportero *gusA*. Una alternativa podría ser el uso de plásmidos que se incorporen al cromosoma y carguen con genes reporteros.

Visualización de Enterobacter sp. UYSO10 dentro de los tejidos de la planta por microscopía de luz y electrónica

Debido a que no se pudo visualizar mediante microscopía de fluorescencia la colonización por *Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662*, plantas del mismo ensayo fueron analizadas mediante el uso de microscopía de luz y electrónica.

Dado el alto poder de resolución y la facilidad de descripción e interpretación de las imágenes en tres dimensiones obtenidas utilizando microscopía electrónica de barrido, ésta resulta la técnica más adecuada para estudios de adhesión e infección por bacterias epi- y endofíticas en plantas. La desventaja que presenta es que si bien posee un alto poder resolutivo las muestras precisan de una serie de pasos previos a su visualización, por lo que resulta recomendable complementar las observaciones obtenidas mediante el uso de otras técnicas. Por otro lado es importante destacar que bacterias de morfología y tamaño similar no podrán ser diferenciadas. En estudios de colonización superficial de plantas por bacterias, diversos autores han aplicado con éxito dicha técnica (69, 133). También es común encontrar estudios de la infección y colonización de tejidos de plantas por bacterias endófitas utilizando microscopía óptica. Sin embargo, como la técnica no permite diferenciar las bacterias, normalmente estos estudios son complementados con la visualización mediante marcación o tinción de cepas o grupos de bacterias con anticuerpos específicos (68).

A pesar de que el número de repeticiones analizados por tiempo y tratamiento, de la infección y colonización en plantas micropropagadas de caña de azúcar inoculadas con *Enterobacter sp. UYSO10-pMP4662* fue bajo, las observaciones realizadas fueron coherentes y permitieron realizar un modelo sobre la infección de esta bacteria bajo las condiciones ensayadas. En la misma se propone que en un principio las bacterias se acercan a la raíz y se adhieren a la misma en forma apolar, formando posteriormente agregados bacterianos en la zona pilífera de la raíz. A continuación comienza la infección bacteriana en la planta, postulándose como un posible sitio de ingreso las aberturas naturales ocurridas por la emergencia de raíces secundarias. Una vez dentro de la planta, el primer sitio de infección son los espacios intercelulares tanto en las raíces como en la base del tallo, colonizando a

continuación los tejidos vasculares de la raíz. Finalmente esta cepa alcanzaría el tejido vascular del tallo.

El modelo presentado para la adhesión, vía de infección y colonización de plantas de caña de azúcar micropropagadas por *Enterobacter* sp. UYSO10 presenta similitudes y diferencias con otros modelos propuestos en plantas de caña de azúcar micropropagadas y los endófitos diazotrófos: *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* y *G. diazotrophicus*. En las especies de *Herbaspirillum* la adhesión se presenta en forma de ataque apolar mientras que *G. diazotrophicus* lo realiza de forma polar. Sin embargo, a diferencia de *Enterobacter* sp. UYSO10, se encuentran formando monocapas y raramente agregados. Los sitios de infección descritos para estas tres especies son las zonas de emergencia de las raíces secundarias y principalmente heridas de la epidermis y particularmente en el caso de *G. diazotrophicus* también se observó infección en la zona meristemática. En cuanto a la colonización del interior radicular por las mismas, se observó su presencia en los espacios intercelulares y en los vasos de xilema, mostrándose además en el caso de las especies de *Herbaspirillum* la inducción de *mucus* por parte de la planta. En cuanto a la base del tallo, se observó la presencia de las cepas de *Herbaspirillum* en los vasos del xilema así como en el parénquima, mientras que *G. diazotrophicus* solamente fue observada en los espacios intercelulares del cortex (69, 70, 94, 95).

En cuanto a la infección de otras cepas del género *Enterobacter* se han realizado estudios en las siguientes interacciones planta-bacteria: i) *Enterobacter gergoviae* 57-7 - maíz. Esta cepa fue descrita como un endófito facultativo de maíz, colonizando las raíces los tejidos del parénquima y los vasos del xilema (5). ii) *Enterobacter asburiae* JM22 - algodón. Para ésta cepa se observó la colonización radicular del cortex y del tejido vascular, proponiéndose una colonización sistémica debido a su presencia en tallos, pecíolo, cotiledones, hojas y meristema apical (107, 108). iii) *Enterobacter* sp. 638 - *Populus trichocarpa*. Esta cepa fue descrita como endófito debido a su visualización en el interior de los tejidos de *Populus trichocarpa* (139).

También se realizaron observaciones acerca de la interacción entre *Enterobacter* sp. UYSO10 y plantas micropropagadas. Por un lado, en algunos cortes se observó una gran infección de los tejidos vasculares. Hasta ahora los reportes de estudios de bacterias endófitas hacen referencia a infecciones en monocapa o discretas de los haces vasculares, pero no a colonizaciones de esa densidad bacteriana por un único tipo celular. Sin embargo para evaluar

esta profusa colonización hay que tener en cuenta las características del sistema de estudio. En la técnica de micropropagación, la separación en plantas individuales se realiza por cortes con bisturí, de esta forma el tejido presenta heridas artificiales encontrándose propenso a la infección bacteriana. Hay que considerar también que se trata de plantas que por las características de la propagación *in vitro* presentan bajo o nulo contenido de microorganismos en los tejidos, por lo que la cepa inoculada no competirá con otras por la ocupación de los nichos. Finalmente la infección fue estudiada en las primeras horas post-inoculación, pudiendo existir mecanismos de la planta que regulen durante su desarrollo el número de las bacterias endófitas. Estos motivos pueden explicar al menos parcialmente la gran infección observada por esta cepa bajo las condiciones de estudio. Tampoco hay que descartar que el efecto negativo que pudiera ser causado por el bloqueo de un haz vascular no esté siendo compensado por la estimulación en el desarrollo de nuevas raíces secundarias por efecto de fitohormonas producidas por la bacteria (50). Este efecto a su vez puede ser beneficioso para los endófitos, favoreciendo la infección radicular debido a que el estímulo en el desarrollo de raíces secundarias generará nuevos sitios potenciales de infección (50). Por lo que, son necesarios más estudios con el fin de evaluar el rol de la colonización del tejido vascular en altas densidades. Por otro lado se observó reacción por parte de la planta en forma de secreción de una sustancia mucosa, sin embargo dadas las características del estudio, no podemos asociar esta respuesta a la presencia de una bacteria endófito a la observada en presencia de un patógeno. Estas observaciones también fueron realizadas en estudios de infección de *G. diazotrophicus* en plantas de caña de azúcar micropropagadas (68).

Con respecto a la presencia de bacterias “contaminantes” en las plantas de caña micropropagada, las observaciones realizadas sugieren que podemos diferenciar estas bacterias de *Enterobacter* sp. UYSO10. Por otro lado, no se observaron bacterias contaminantes en las plantas control en los estudios de microscopía electrónica de barrido, lo que sugiere que posiblemente las bacterias “contaminantes” provengan de la etapa de propagación.

Finalmente podemos postular que el aislamiento *Enterobacter* sp. UYSO10 es una bacteria endófito de plantas de caña de azúcar, constituyendo el primer reporte de un aislamiento de éste género como endófito asociado a este cultivo. El modelo planteado sobre la infección y colonización de plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 por *Enterobacter* sp. UYSO10 debe ponerse a prueba en un ensayo con más repeticiones y técnicas que permitan la

identificación específica de la cepa en los tejidos. Para ello se podría desarrollar la visualización mediante la marcación con genes reporteros o el uso de anticuerpos específicos contra esta cepa. En futuros ensayos se pueden evaluar también otras posibles vías de ingreso a la planta, como la infección por los estomas y las aberturas naturales de la parte aérea.

En el presente estudio se evaluó la interacción planta-bacteria en un modelo experimental, sirviendo los resultados generados para sentar las bases de futuros ensayos en plantas no micropropagadas. En estudios comparativos de la inoculación de *P. solanacearum* en plantas de tomate micropropagadas y en condiciones de cultivo se ha observado patrones de infección similares (148). Otro enfoque interesante y complementario es la búsqueda de genes y la evaluación *in vitro* de características asociadas a la sobrevivencia en la rizósfera (resistencia al estrés oxidativo, absorción de nutrientes), a la adhesión radicular (presencia de pili, hemaglutinina) y al establecimiento y colonización de los tejidos de la planta (sensibilidad quimiotáctica a exudados radiculares, presencia de flagelos, modulación de la respuesta de las plantas) (63).

Por otro lado, dada la novedosa asociación entre plantas no leguminosas y una cepa perteneciente al género *Shinella* con características de PCV en plantas de caña de azúcar, resulta sumamente interesante profundizar en los estudios de dicha interacción. Se propone entonces continuar con estudios de infección y colonización de plantas de caña de azúcar, así como profundizar en las relaciones filogenéticas de dicho aislamiento.

CAPITULO 4

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN PLANTAS EN ESTUDIOS DE DINÀMICA POBLACIONAL

OBJETIVOS PARTICULARES

Desarrollar las herramientas de biología molecular: FISH y PCR en tiempo real para estudios de dinámica poblacional de bacterias endófitas en plantas.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

1.1.1 Diseño y marcado de sondas específicas

Para el diseño de sondas específicas para los aislamientos de interés se siguió la estrategia esquematizada en la Figura 1. Se seleccionaron 4 cepas a partir de los resultados del ensayo de PCV en condiciones de invernáculo descrito en el Capítulo 2, las dos que mostraron mejores resultados (*Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24) y dos cepas que mostraron PCV en alguna de las variables medidas (*Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Rahnella* sp. UYSO22). El diseño se realizó utilizando el programa ARB (81) a partir de las secuencias nucleotídicas del gen *16SARNr* obtenidas en el Capítulo 1. Las características buscadas para las sondas fueron: 18-24 pb de largo, 50-60 % de porcentaje de GC y 52-66 °C de temperatura de hibridación. Para la elección final se tomó en cuenta la especificidad y la ubicación espacial de la secuencia complementaria (blanco) en la estructura tridimensional de la subunidad ribosomal, así como la probabilidad de formar estructuras secundarias no deseadas por parte del oligonucleótido (81). La especificidad de las sondas fue evaluada *in silico* utilizando las herramientas así como las bases de datos: BLAST/NCBI, Probe match/Ribosomal Data Project (RDP) (26) y ProbeCheck (80) el cual usa las bases de datos de RDP-II de SILVA (106), GreenGenes (31) y FGPR (14). La probable ubicación espacial de hibridación de la sonda fue evaluada con el programa ARB, mientras que la formación de estructuras secundarias como horquillas, homo- y heterodímeros de los cebadores así como el cálculo de la energía libre (G) de dichas reacciones se evaluaron mediante la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (SciTools) de Integrated DNA Technologies (IDT).

Los fluoróforos seleccionados fueron: TYE™ 563 en el caso de las sondas diseñadas para *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Rahnella* sp. UYSO22, TYE™ 665 para la sonda diseñada para *Acinetobacter* sp. UYSO03 y 6-FAM™ (Fluorescein) para la sonda diseñada para *Shinella* sp. UYSO24. Las sondas fueron sintetizadas con el fluoróforo en su extremo 5' y purificadas por High-performance liquid chromatography en IDT (www.idtdna.com).

Con el fin de estandarizar las condiciones de trabajo, en una primera instancia se estudiaron las sondas específicas para los aislamientos que mostraron mejores resultados de PCV en el ensayo de invernáculo: *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24. Una vez sintetizadas

las sondas y suspendidas en H₂O ultra pura a una concentración de 20 ng/μl, se calculó la eficiencia del marcado según la fórmula:

$$k = \frac{(\epsilon_{260} / \epsilon_{\text{fluoróforo}})}{(A_{260} / A_{\text{fluoróforo}})}$$

donde $A_{\text{fluoróforo}}$ es la absorbancia y $\epsilon_{\text{fluoróforo}}$ es el coeficiente de extinción de la sonda marcada medido a la longitud de onda correspondiente al máximo del espectro de emisión del fluoróforo (563 para TYE™ 665 y 520 para 6-FAM™) (103). El coeficiente de extinción se estimó a partir de los nucleótidos individuales. Valores de $k < 1$ indican un marcado incompleto del oligonucleótido por el fluoróforo, mientras que $k > 1$ indican la presencia adicional de fluoróforo, potencialmente libre. Valores aceptables se encuentran en un rango de k entre 0.7 y 1.3.

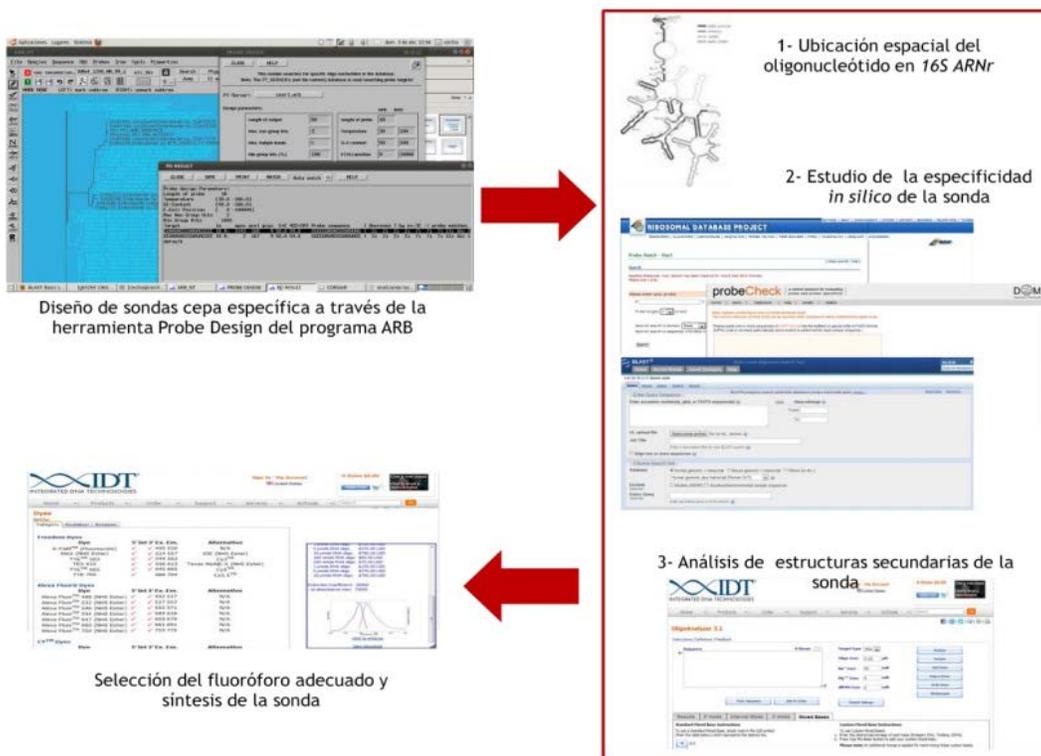


Figura 1. Esquema de la estrategia utilizada para el diseño y síntesis de sondas específicas para estudios de hibridación *in situ* fluorescente.

1.1.2 Hibridación de bacterias con sondas generales y específicas

Con el fin último de estandarizar las condiciones para el ensayo de FISH en cortes de plantas de caña de azúcar se siguió la estrategia planteada en la Figura 2. En una primera instancia fue evaluada la hibridación de cultivos bacterianos puros y fijados con las sondas generales específicas para el dominio eubacterias: Eub338 I, II y III y para el dominio de las Gamma-proteobacterias: Gam 42^a, ambas marcadas con el fluoróforo Cy3 (Tabla 1). A continuación y una vez familiarizados con la técnica, se ensayaron las sondas específicas diseñadas para hibridar las cepas *Enterobacter* UYSO10 y *Shinella* UYSO24.

Para esto, cultivos de *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 fueron crecidos toda la noche en medio Dygs. A partir de los mismos se tomó 3 ml de cada cultivo los cuales fueron centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos. El pellet se suspendió en PBS y se fijó con paraformaldehído 1 % final a 4 °C durante toda la noche. A continuación el material se lavó dos veces con PBS suspendiéndose finalmente en 500 µl de PBS 50 mM y 500 µl de EtOH 100 %. Las células fijadas se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis (1).

La hibridación de los cultivos se realizó como fue descrito por Manz (84) adaptándose el protocolo al uso de eppendorf. Quince microlitros de las bacterias fijadas fueron centrifugados a 10.000 g por 5 minutos y sometidos a una serie creciente de deshidratación etanólica (50, 80 y 100 %) incubándose en cada solución por 3 minutos. A continuación, las células fueron incubadas con 50-65 ng de la sonda (sonda efectivamente marcada) en 9 µl de buffer de hibridación (NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9, SDS 0.01 % y formamida desionizada en una concentración final de 20 o 50 %), a 46 °C durante 3 horas. Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas en buffer de lavado (NaCl 0.9 M Tris-HCl 20 mM pH 7.9, EDTA 5 mM, SDS 0.01 %), a 48 °C durante 15 minutos. Finalmente fueron lavadas y suspendidas con agua destilada estéril para su visualización en el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81. Para mejorar la visualización del fluoróforo se utilizó el medio de montaje que reduce la pérdida de fluorescencia Citifluor™ Ltda.

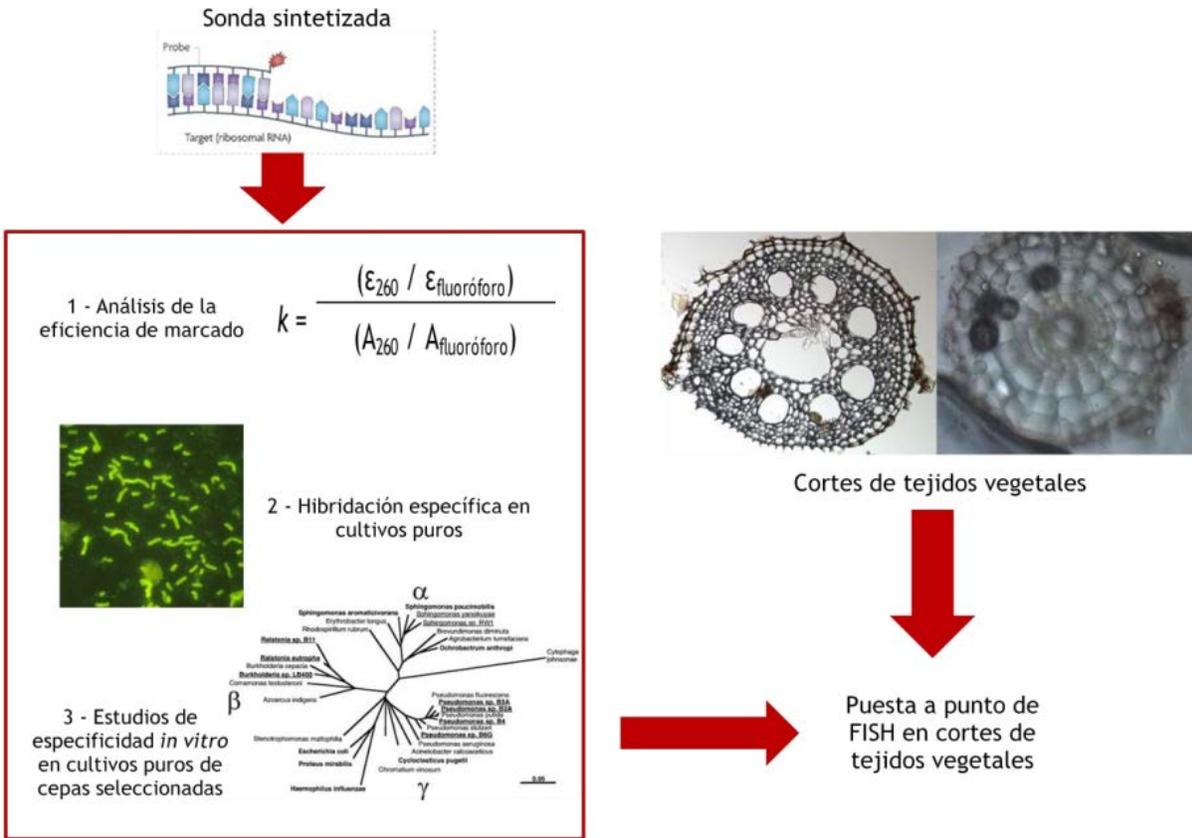


Figura 2. Esquema de la estrategia utilizada para la validación y puesta a punto de la hibridación *in situ* fluorescente con sondas específicas diseñadas en este estudio.

Una vez obtenida la hibridación de los cultivos bacterianos con las sondas específicas, la especificidad de las mismas fue evaluada *in vitro* ensayando su hibridación con cepas pertenecientes a las Alfa- (*Agrobacterium* sp. UYSO04, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Rhizobium tropici* CIAT 899^T), Beta- (*Cupriavidus taiwanensis* LMG 14924^T y *Burkholderia phyumatum* STM 875^T) y Gammaproteobacterias (*Rahnella* sp. UYSO22). Para ello, células fijadas a partir de cultivos puros de dichas cepas fueron sometidos al mismo protocolo de hibridación descrito anteriormente, evaluándose dos condiciones de astringencia: formamida 40 y 50 %.

Tabla 1. Características de las sondas y cebadores generales utilizadas en este estudio.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Fluoróforo	% GC	Tm	Referencia
SONDAS					
EUB 338 I, II, III	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Cy3	66,7	55	(4)
Gam 42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT, competidor: GCC TTC CCA CTT CGT TT	Cy3	52,9	47	(84)
CEBADORES					
TEF for	ACTGTGCAGTAGTACTTGGTG		47,6	54,4	
TEF rev	AAGCTAGGAGGTATTGACAAG		42,9	51,6	
RecA for	GGTGAGCTGGTTGATCTGGG		60	58	(141)
RecA rev	GCATTCGCTTTACCCTGACC		55	56,4	
ffh for	ATGGGCGATGTGCTTTCACT		50	57,4	
ffh rev	TCAAACCCATCGCCTTTCTT		45	54,7	

1.1.3 Puesta a punto de la metodología para realizar cortes transversales de raíces de caña de azúcar para ensayos de FISH

Con el objetivo de estandarizar las condiciones de procesamiento de muestras de raíces para ser usadas en ensayos de FISH, se realizaron pruebas de corte utilizando un Micrótopo de cuchilla vibrante Leica VT 1000S (vibrátomo) y un Crióstato MEV (SLEE MAINZ). Para ello se partió de raíces de plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10 y de raíces de plantas de la misma variedad pero germinadas en el laboratorio a partir de yemas traídas de campo.

Para ambos procedimientos se lavaron las raíces con PBS y se continuó con la fijación del material en paraformaldehído 4 % a 4°C durante toda la noche. Al otro día se lavó el tejido dos veces con PBS durante 5 minutos. Con la finalidad de obtener cortes transversales las muestras a ser procesadas en el vibrátomo se colocaron con la orientación adecuada para obtener cortes transversales en un molde de silicona, rellenándose con agar 25 g/l en H₂O. Una vez solidificado el bloque, se guardó la muestra en PBS a 4 °C hasta su procesamiento. Los bloques obtenidos fueron cortados en secciones de 60 µm de espesor.

Por otro lado, las raíces a ser procesadas en el crióstato fueron previamente crioprotegidas incubándose en sacarosa 20 % a 4 °C toda la noche. A continuación las muestras se embebieron en medio de montaje Tissue freezing medium, de forma de generar bloques que permitieran obtener cortes transversales. Una vez obtenidos los bloques se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Los bloques fueron cortados en secciones de 15 µm de espesor que se colocaron en portaobjetos previamente desengrasados y embebidos en agarosa 0.5 %, $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.05 %.

1.2 PCR en tiempo real

1.2.1 Diseño de cebadores específicos

Para el diseño de cebadores específicos del gen *16S ARNr* de cepas de interés se utilizó la estrategia planteada en la Figura 3. A partir de las secuencias nucleotídicas del gen *16S ARNr* (obtenidas en el Capítulo 1), se diseñaron cebadores específicos para los aislamientos *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24. Se buscó que la secuencia utilizada para uno de los cebadores específicos fuera la misma o se solapara con el oligonucleótido diseñado anteriormente como sonda en el estudio de FISH. El segundo cebador se diseñó usando el programa Clustalx 2.0.10 (75), en conjunto con el alineamiento múltiple de las secuencias del gen *16S ARNr* utilizadas en la construcción de las filogenias (Capítulo 1). Para ello se buscaron regiones con secuencias únicas evaluándose oligonucleótidos que cumplieran con las características: 40-60 % de porcentaje GC, 52-66 °C de temperatura de hibridación y 50-150 pb de tamaño del amplicón. Para la selección final de los mismos se consideró la especificidad y la probabilidad de que los oligonucleótidos formaran estructuras secundarias no deseadas como fue descrito en el punto 1.1.1.

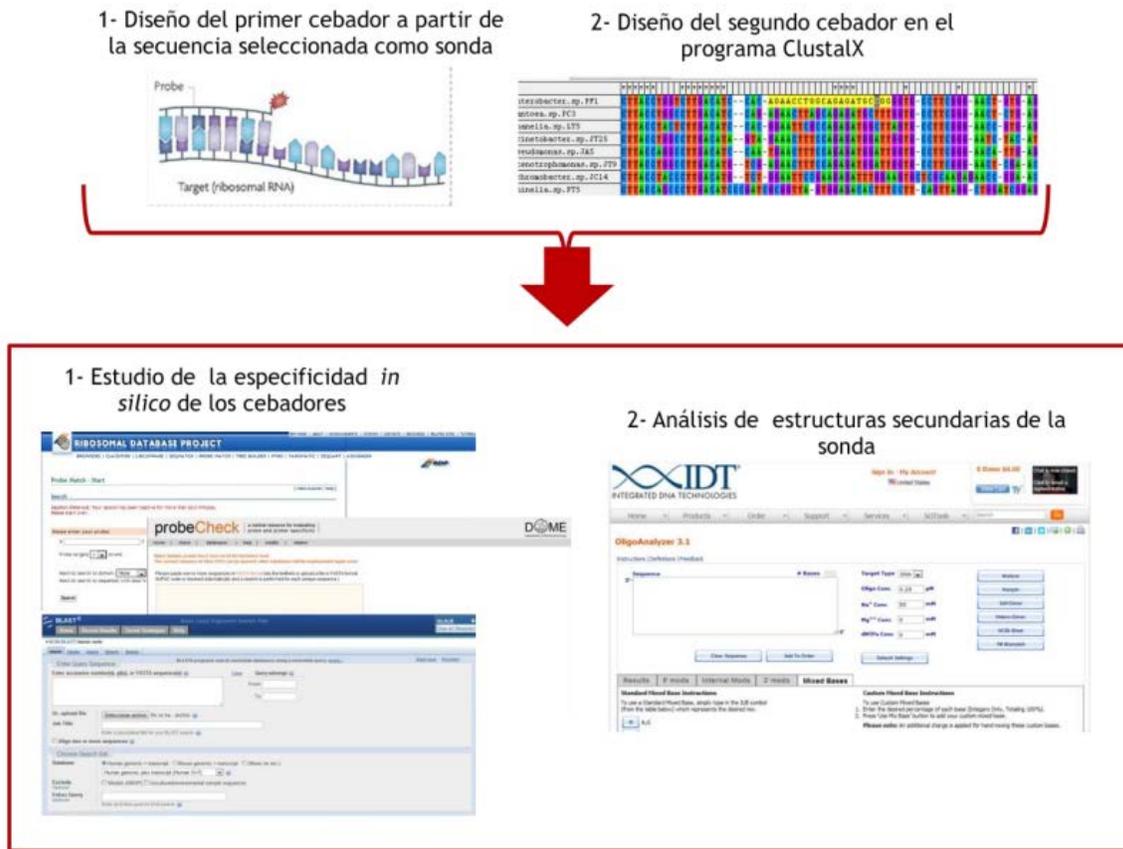


Figura 3. Estrategia utilizada en el diseño de cebadores específicos para los aislamientos de interés.

1.2.2 Extracción de ADN

Aislamiento de ADN de plantas de caña de azúcar. La extracción del ADN (ADN de planta y bacteriano) se realizó a partir de nodos de tallos traídos de campo los cuales fueron esterilizados superficialmente y procesados en una licuadora como se describió en el Capítulo 1 (Punto 1.1.3). Un volumen correspondiente a 2 g de nodo fue centrifugado a 11.000 g durante 5 minutos. El pellet obtenido fue lavado 2 veces en NaCl 1 M preparado en T₁₀E₁₀, suspendido en 337.5 µl de solución SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris-base 20 mM, pH 7.5) conteniendo lisozima 10 mg/ml e incubado a temperatura ambiente por 2 horas. A continuación a la suspensión se le agregó 1/10 volúmenes de SDS 10 % conteniendo proteinasa K 5 mg/ml incubándose a 55 °C durante 2 horas. Posteriormente a la suspensión se le agregó 1/3 volúmenes de NaCl 5 M y 1 volumen de cloroformo dejándose reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 4.600 g por 15 minutos y el

sobrenadante obtenido se traspasó a un nuevo eppendorf. El ADN se precipitó con el agregado de un volumen de isopropanol a -20 °C durante toda la noche. Al otro día, la suspensión se centrifugó a 9.200 g por 20 minutos secándose el pellet al vacío durante 10 minutos. El pellet obtenido se limpió con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Para esto inicialmente se agregaron 100 µl de NaCl 5 M mezclándose por inversión. Luego se complementó con 80 µl de CTAB 10 % preparado en NaCl 1 M (calentado previamente a 65 °C) mezclándose por inversión y calentándose la suspensión a 65 °C por 10 minutos. A continuación se adicionaron 600 µl de cloroformo centrifugándose a 11.000 g durante 5 minutos. El ADN del sobrenadante fue precipitado con 1 volumen de isopropanol a -20 °C durante toda la noche. Al otro día la suspensión fue nuevamente centrifugada a 11.000 g por 10 minutos, el pellet fue lavado dos veces con EtOH y secado al vacío durante 10 minutos. Finalmente el pellet fue suspendido en 40 µl de agua miliQ estéril conteniendo 20 µg/ml de ARNasa ((7) con modificaciones).

Para obtener una buena suspensión del ADN genómico, la extracción se dejó incubar a 37 °C por una hora y a temperatura ambiente por varios días. Su presencia se visualizó mediante una electroforesis. Los geles fueron preparados con agarosa 0,9 % (p/v) en buffer TAE con Good View™ Nucleic Acid Stain, sometidos a 90 V y posteriormente expuestos a U.V. para su visualización.

Aislamiento de ADN genómico bacteriano. Se realizaron extracciones de ADN genómico de los aislamientos *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 mediante el método con CTAB ((7) con modificaciones). Para esto 2 ml de cultivos crecidos en medio TY toda la noche se centrifugaron a 10.000 g por 10 minutos. El pellet obtenido se suspendió en 740 µl de T₁₀E₁ y a la suspensión se le agregó 20 µl de lizozima 100 mg/ml, mezclándose por inmersión e incubándose a 60°C por 10 minutos. A continuación se le agregaron 40 µl de SDS 10 % mezclándose bien y 8 µl de proteinasa K 10 mg/ml incubándose a 37°C por una hora. Posteriormente se agregaron 100 µl de NaCl 5 M mezclándose y 100 µl de CTAB (calentado previamente a 65 °C) mezclándose nuevamente y dejándose incubar a 65 °C por una hora. Quinientos microlitros de cloroformo fueron adicionados y mezclado posteriormente se centrifugó a 10.000 g por 20 minutos. La fase acuosa se transfirió a nuevo eppendorf donde se adicionó 0.5 ml de fenol:cloroformo (1:1), mezclándose bien para centrifugarse a 10.000 g durante 10 minutos. A la fase acuosa, la cual fue extraída, se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y 1/10 volúmenes de NaAc 0.33 M dejándose precipitar el ADN a -20 °C toda la

noche. Al otro día la muestra se centrifugó a 10.000 g por 30 minutos y el pellet obtenido fue lavado con EtOH 70 % y posteriormente secado en bomba de vacío. Finalmente el pellet se suspendió en 50 µl de T₁₀E₁ conteniendo ARNasa 20 µg/ml incubándose a 37°C por una hora y visualizándose mediante una electroforesis. Los geles fueron preparados gel de agarosa 0,9 % (p/v) en buffer TAE con Good View™ Nucleic Acid Stain, sometidos a 90 V y expuestos a U.V. para su visualización.

1.2.3 Reacción de PCR en tiempo real

Con el objetivo futuro de cuantificar aislamientos específicos en los tejidos de la planta, se seleccionaron genes constitutivos de planta y de bacterias para ser usados como genes referencia y así estandarizar las extracciones de ADN de las muestras a comparar. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los genes que son frecuentemente utilizados como referencia en estudios de cuantificación de bacterias endófitas y/o patógenas en plantas, mediante PCR en tiempo real. Es así que se seleccionaron para su validación el gen *TEF* que codifica para un factor de estimulación transcripcional en las plantas (122) y los genes bacterianos *recA* y *ffH* que codifican para la recombinasa RecA (involucrada en la reparación del ADN) y la proteína Ffh (componente proteico que participa en la señal de reconocimiento particulada) respectivamente (Tabla 1).

En una primera instancia se buscó poner a punto las condiciones de reacción de PCR en tiempo real para los genes referencia así como los cebadores específicos diseñados en este estudio para los aislamientos de interés. La plataforma utilizada para la amplificación por PCR en tiempo real fue la Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science) analizándose los resultados mediante el software Rotor Gene 6000 Series v.1.7 (Corbett Life Science). El kit de reacción seleccionado fue Rotor-Gene SYBR Green (QIAGEN). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 12,5 µl de 2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mix, 3,5 µl de H₂O libre de ARNasa, 2,0 µl de cada cebador 12 µM y 5 µl de ADN. En el caso del ADN genómico de bacteria se uso una dilución al décimo de la extracción obtenida. El programa inicial utilizado para la reacción de amplificación fue el recomendado por el fabricante: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos y 60 °C por 10 segundos. Posteriormente se ensayaron variantes en la temperatura de hibridación/extensión (entre 50-60 °C) buscando optimizar las condiciones de reacción. Para cada reacción se realizaron controles negativos sin el agregado de ADN.

La especificidad de los amplicones fue confirmada por el análisis de la curva de disociación realizada desde 60 a 95 °C y por la visualización del producto obtenido en una electroforesis. Los geles fueron preparados en gel de agarosa 2,0 % (p/v) en buffer TAE con Good View™ Nucleic Acid Stain, sometidos a 90 V y expuestos a U.V. para su visualización. Los amplicones del tamaño esperado fueron enviados para su purificación y secuenciación a MACROGEN Inc. y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias esperadas.

2 RESULTADOS

2.1 Hibridación *in situ* fluorescente

2.1.1 Diseño de sondas y puesta a punto de la técnica FISH en cultivos puros

Como se mencionó en materiales y métodos, mediante el uso del programa ARB (81) se diseñaron sondas específicas para los aislamientos: *Shinella* sp. UYSO24, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Rahnella* sp. UYSO22 y *Enterobacter* sp. UYSO10 (Tabla 2). Para ello se trabajó con la base de datos de la unidad ribosomal pequeña del proyecto Silva que se encuentra actualizada y alineada (106). En un principio se incorporaron y alinearon las secuencias correspondientes a las cepas de interés construyéndose un árbol filogenético. A continuación se depuró la base de datos, de forma de trabajar con las 4 secuencias más cercanas a los aislamientos de interés, así como con las secuencias correspondientes a las cepas tipo de otras especies de los géneros identificados y algunas secuencias usadas como grupo externo de otros géneros. Mediante el uso de la herramienta Probe_design para el diseño de sondas, se probaron varias opciones variando el largo de los nucleótidos (entre 18 y 24 pb) así como el porcentaje GC de los mismos (entre 50 y 60 %). Posteriormente la especificidad de las sondas fue evaluada *in silico* utilizando varias bases de datos y buscando la presencia de al menos una diferencia en la secuencia nucleotídica priorizando aquellas diferencias que se encuentren en posición central (60).

Tabla 2. Sondas específicas diseñadas en este estudio para aislamientos de interés.

Aislamiento Diana	Secuencia (5´ - 3´)	Posición del sitio diana*	Marcación con fluoróforo	% GC	Tm
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	CTT CTC CGA CTA CAG TCA	480-497	5´ 6-FAM (Exc máxima del fluoróforo a 495, Em a 520)	50	50,4
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	CCC CAA CTA GTT AAT CCG	240-257	5´ TYE TM 665 (Exc 645, Em 665)	50	49,5
<i>Rahnella</i> sp. UYSO22	TCG AGG TCA TGC GGT ATT	469-487	5´ TYE TM 563 (Exc 549, Em 563)	50	53,4
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	TAA CGT CAA TCA GCA CGG	171-188	5´ TYE TM 563 (Exc 549, Em 563)	50	52,5

*Posición con respecto al gen *16S ARNr* de *E. coli*.

Una vez diseñadas las sondas y seleccionados los fluoróforos, las mismas fueron sintetizadas en IDT. A continuación y con el fin de poner a punto la metodología se trabajó con dos de las sondas diseñadas: la sonda específica para *Enterobacter* sp. UYSO10 y la sonda específica para *Shinella* sp. UYSO24. Para determinar la concentración necesaria para realizar los ensayos de hibridación, se calculó la eficiencia de marcado para cada una. En el caso de la sonda diseñada contra *Shinella* sp. UYSO24 la eficiencia de marcado fue de 0.35 y para *Enterobacter* sp. UYSO10 de 0.2. Estos valores se encuentran muy por debajo de los valores considerados como normales optándose como estrategia de hibridación el aumento de la cantidad de sonda de forma de contar con cantidades de 50 ng de sonda efectivamente marcada.

Los protocolos de hibridación ensayados fueron los descritos en la bibliografía (45, 84, 96) validándose el procedimiento de hibridación mediante el uso de las sondas generales. En la Figura 4 se muestra la hibridación de los aislamientos ensayados con las sondas para eubacterias y en el caso de *Enterobacter* sp. UYSO10 se muestra también la hibridación con la sonda para Gammaproteobacterias.

Conocidas la eficiencia de marcado de las sondas específicas, se evaluó empíricamente la capacidad de las mismas de hibridar con las bacterias blanco. Los resultados mostraron que la sonda específica para *Shinella* sp. UYSO24 hibridó con las células fijadas de cultivos de *Shinella* sp. UYSO24 utilizando concentraciones de formamida de 20 y 40 % (Figura 5). Sin embargo, no se obtuvo señal de hibridación al utilizar la sonda para *Enterobacter* sp. UYSO10 con células fijadas de cultivos de *Enterobacter* sp. UYSO10.

A continuación se realizaron estudios de especificidad *in vitro* de la sonda diseñada para *Shinella* sp. UYSO24, utilizando cepas pertenecientes a las Alfa-, Beta- y Gammaproteobacterias. La cantidad de formamida utilizada en el buffer de hibridación es la resultante de un compromiso entre la señal de hibridación obtenida y la especificidad de la reacción. En las pruebas anteriores se observó que la sonda para *Shinella* sp. UYSO24 hibrida en condiciones de formamida de 20 y 40 %, decidiéndose ensayar para los estudios de especificidad *in vitro* dos condiciones de estringencia: formamida 40 y 50 %. Bajo ambas condiciones ensayadas, la sonda para *Shinella* sp. UYSO24 hibridó específicamente con la cepa blanco y no hibridó con el resto de las cepas analizadas (Tabla 3). A partir de estos resultados y debido a que la señal de hibridación disminuye a medida que se aumenta la estringencia de

la reacción (104), se propone para futuros ensayos de hibridación de cultivos puros bacterianos la condición de formamida 40 %.

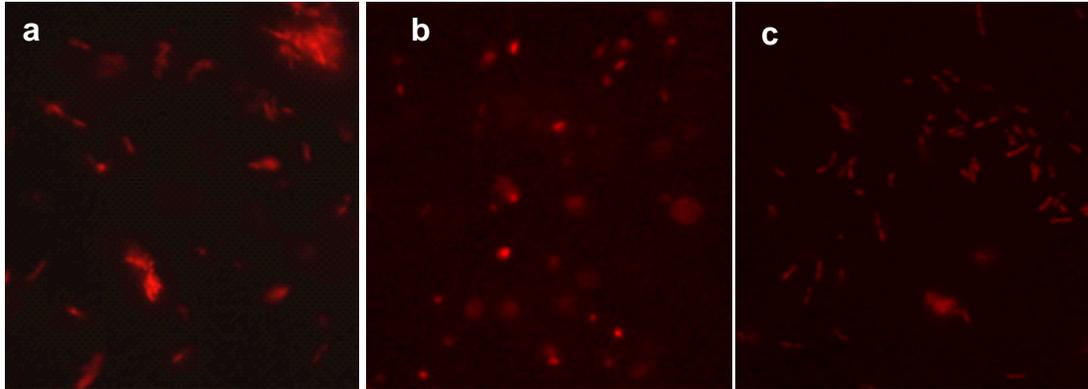


Figura 4. Hibridación *in situ* de cultivos puros con sondas generales. a- *Enterobacter* sp. UYSO10 y b- *Shinella* sp. UYSO24 con sonda contra eubacterias, y c- *Enterobacter* sp. UYSO10 con sonda para Gammaproteobacterias.

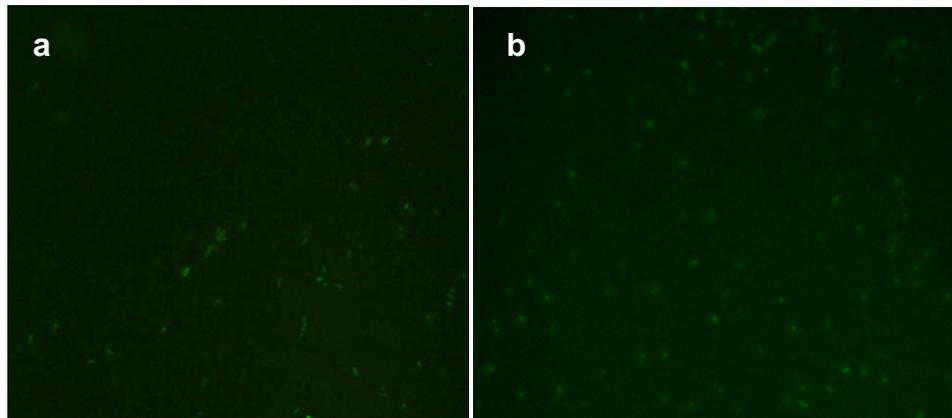


Figura 5. Hibridación *in situ* de cultivos puros de *Shinella* sp. UYSO24 con sondas específica para dicho aislamiento. Se ensayaron dos condiciones de estringencia: a- formamida 20 % y b- formamida 50 %.

Tabla 3. Especificidad de hibridación de la sonda diseñada para *Shinella* sp. UYSO24.

Subclase	Cepa	Hibridación con sonda para <i>Shinella</i> sp. UYSO24*	
		Formamida 40 %	Formamida 50 %
	<i>Shinella</i> sp. UYSO24	+	+
Alfaproteobacterias	<i>Agrobacterium</i> sp. UYSO04	-	-
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	-	-
	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	-	-
Betaproteobacterias	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 14924 ^T	-	-
	<i>Burkholderia phymatum</i> STM 875 ^T	-	-
Gammaproteobacterias	<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	-	-
	<i>Rahnella</i> sp. UYSO22	-	-

* (+) hibridación con la sonda bajo las condiciones ensayadas, (-) no hubo hibridación

2.1.2 Cortes de raíces de caña de azúcar

Se ensayaron dos metodologías de cortes de raíces de caña de azúcar utilizando el vibrátomo y el crióstato así como dos materiales de partida: raíces de cañas micropropagadas y raíces de cañas germinadas en el laboratorio a partir de yemas. En el caso del uso del vibrátomo sólo fue posible obtener cortes de raíces cuando se utilizaron plantas micropropagadas (Figura 6a). Las raíces de plantas germinadas presentaron un mayor desarrollo (engrosamiento) del tejido y ofrecieron demasiada resistencia para la metodología ensayada. Por su parte las raíces de cañas germinadas en el laboratorio fueron exitosamente seccionadas utilizando el crióstato en las condiciones ensayadas (Figura 6b).

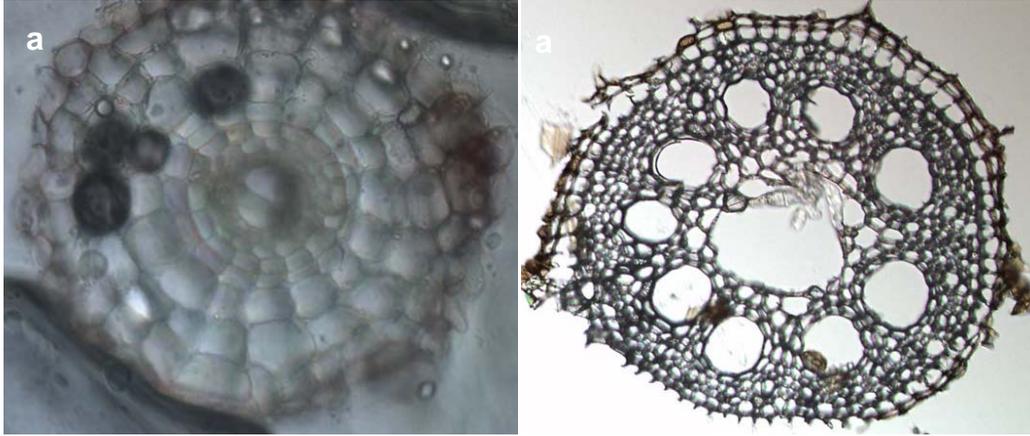


Figura 6. Cortes transversales de raíces de caña de azúcar. **a-** raíz de planta micropropagada cortada en el vibrátomo y **b-** raíz de caña germinada a partir de una yema cortada en el crióstato.

2.2 PCR en tiempo real

2.2.1 Diseño de cebadores y puesta a punto de la técnica PCR en tiempo real

A partir de la secuencia de *16S ARNr* y de las características recomendadas para la realización de la reacción de PCR en tiempo real, se diseñaron cebadores para los aislamientos de *Enterobacter* sp. UYSO10 y de *Shinella* sp. UYSO24 (Tabla 4). Para ello se seleccionó como uno de los cebadores, la secuencia entera o parcial de la sonda diseñada en los estudios de FISH y el segundo cebador se diseñó en base al alineamiento de varias secuencias en el programa Clustalx. En el diseño se contemplaron las características recomendadas para los cebadores: porcentaje GC (40 - 60 %), temperatura de hibridación (52 - 66 °C) y tamaño del amplicón (50 y 150 pb). Los cebadores diseñados fueron evaluados por su especificidad *in silico* y la probabilidad de formar estructuras secundarias no deseadas.

En paralelo, se puso a punto el protocolo de extracción de ADN a partir de plantas de caña de azúcar traídas de campo (Figura 7a). Para ello se realizaron modificaciones al protocolo de extracción de ADN a partir de hojas de caña para adaptarlo a la extracción de ADN a partir de nodos de tallos. Utilizando el ADN extraído de planta y ADN genómico de los aislamientos seleccionados (Figura 7b), se buscó optimizar la temperatura de amplificación por PCR en

Tabla 4. Cebadores específicos diseñados en este estudio para aislamientos de interés.

Aislamiento Diana	Secuencia (5´ - 3´)*	Posición del sitio diana**	% GC	Tm	Tamaño esperado del amplicón
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	For: TGACTGTAGTCGGAGAAGAAGC	480-501	50	56,1	171
	Rev: CAGTATCAAAGGCAGTTCCG	625-645	50	53,5	
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	For: CCGTGCTGATTGACGTTA	469-487	50	52,5	143
	Rev: TCACATCCGACTTGACAGAC	588-607	50	54,3	

* Secuencia de los cebadores líder (For) y retrasado (Rev)

** Posición con respecto al gen *16S ARNr* de *E. coli*.

tiempo real de los genes constitutivos y específicosevaluando la especificidad de los amplicones en curvas de hibridación (Tabla 5). De acuerdo a los resultados obtenidos, para la amplificación de los genes *TEF* y *recA* se eligió la temperatura de hibridación de 55 °C (Figura 8). Por otro lado, no se consiguió obtener amplificación con los cebadores usados para el gen *ffh*. Con respecto a los cebadores específicos diseñados en este estudio, se realizaron pruebas utilizando como molde los ADN genómicos de *Enterobacter* sp. UYSO10 y de *Shinella* sp. UYSO24 ensayando diferentes temperaturas de hibridación y buscando obtener solamente la amplificación específica esperada para el juego de cebadores usados. Los resultados mostraron que la mejor temperatura de hibridación ensayada para ambos casos fue la de 60 °C (Figura 9).

Para todas las reacciones el amplicón obtenido fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa observándose el tamaño del amplicón esperado (Figura 10). A continuación se envió a secuenciar a MACROGEN Inc. un amplicón correspondiente a cada juego de cebadores. De esta forma se corroboró la identidad de la secuencia amplificada por comparación con la esperada (gen diana), excepto para el amplicón del gen *TEF*, en que no se obtuvo buena calidad de la secuencia. Aunque para todos los casos, si bien se obtuvo el producto de amplificación esperado, en las curvas de disociación a bajas temperaturas se visualiza inespecificidad de reacción (Figuras 8 y 9).

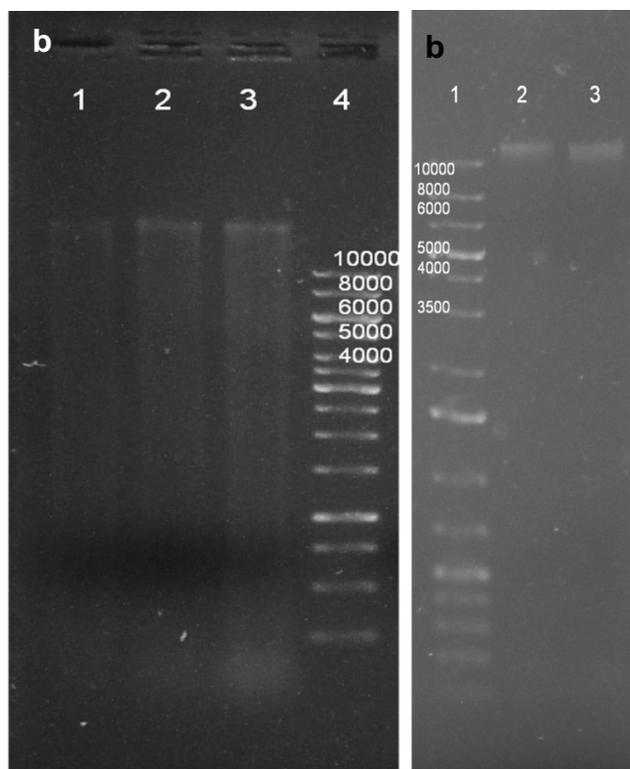


Figura 7. Extracción de ADN genómico. **a-** Extracción de ADN de planta. Carriles: 1, 2 y 3: extracciones de ADN de yemas de tallos traídos de campo y 4: Marcador de peso molecular Generuler 1 kb de Fermentas. **b-** Extracción de ADN genómico de bacteria. Carriles: 1: Marcador de peso molecular Generuler 1 kb de Fermentas, 2: *Enterobacter* sp. UYSO10 y 3: *Shinella* sp. UYSO24.

Tabla 5. Temperaturas de hibridación/extensión ensayadas para la amplificación con diferentes juegos de cebadores en PCR en tiempo real.

Gen/cepa diana	Temperatura de hibridación de cebadores y extensión			
	52 °C	55 °C	57 °C	60 °C
<i>TEF</i>	N.D.	+	-	N.D.
<i>recA</i>	N.D.	+	-	N.D.
<i>ffH</i>	i	-	N.D.	N.D.
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	i	i	N.D.	+
<i>Shinella</i> sp. UYSP24	i	i	N.D.	+

(N.D.): no determinado, (+) amplificación positiva, (-) sin amplificación, (i): amplificación inespecífica.

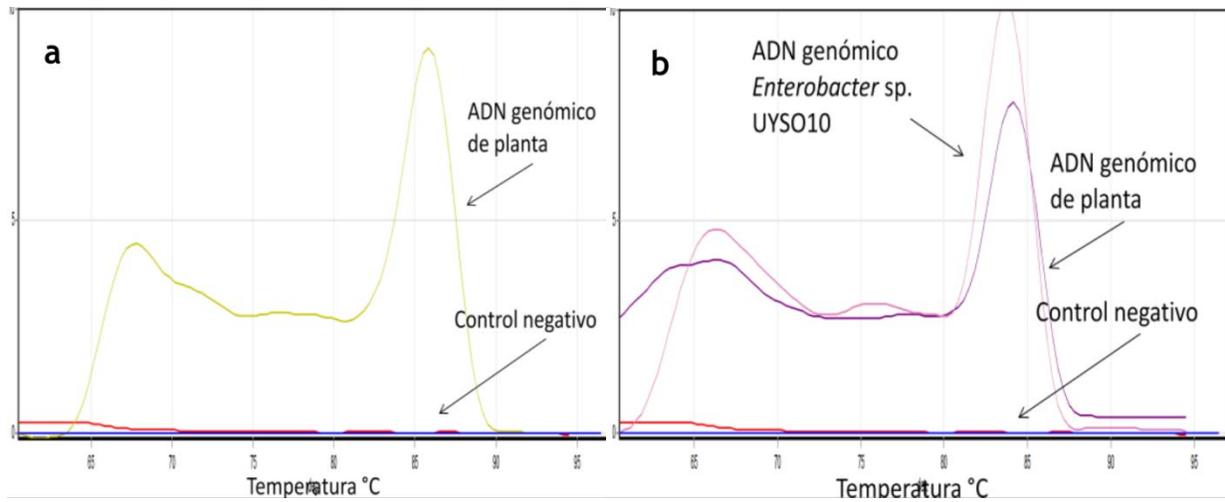


Figura 8. Curvas de disociación para los genes conservados. Reacción a 55 °C con cebadores para los genes *a-TEF* y *b-recA*.

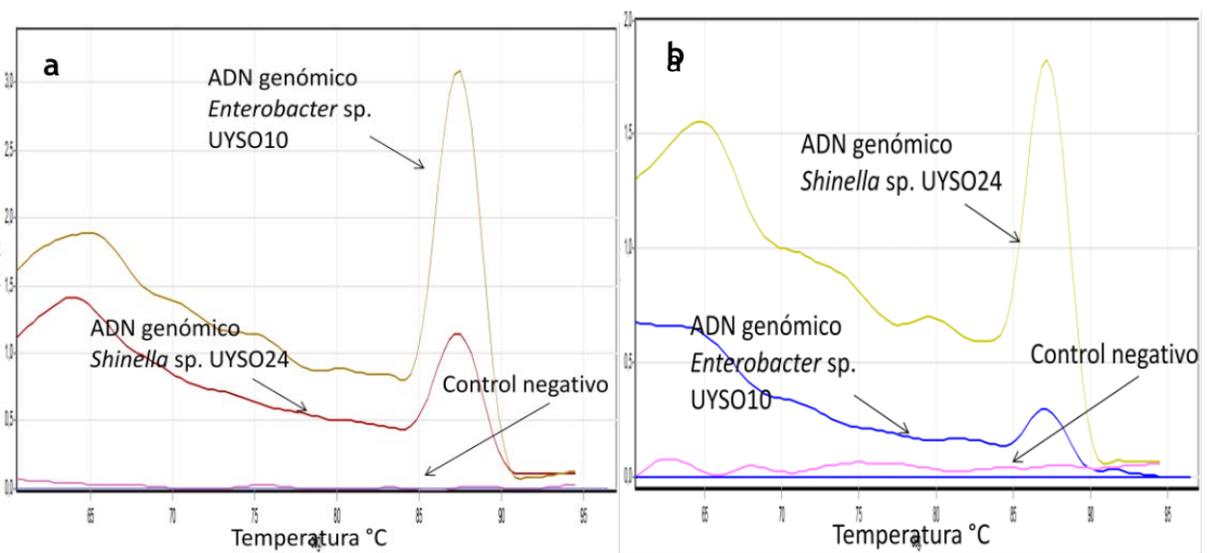


Figura 9. Curvas de disociación utilizando cebadores específicos. Reacción a 60 °C con cebadores específicos para *a-Enterobacter* sp. UYSO10 y *b-Shinella* sp. UYSO24.

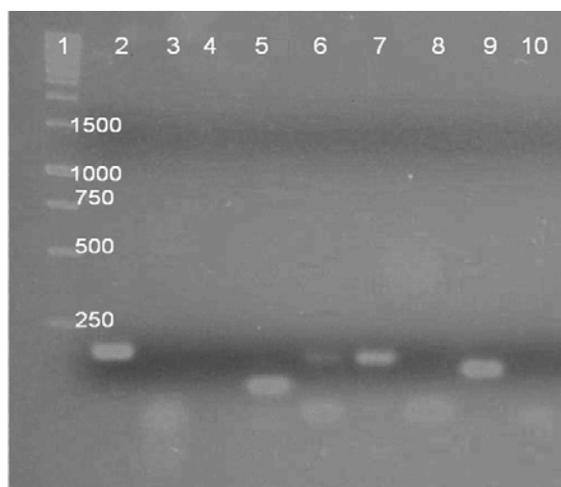


Figura 10. Producto de amplificación de la PCR en tiempo real con cebadores para genes constitutivos y cebadores específicos de aislamientos para interés. Carriles: 1- Marcador de peso molecular Generuler 1 Kb; reacción de amplificación del gen *TEF* con: 2- ADN genómico de planta y 3- control negativo; reacción de amplificación del gen *recA* con: - control negativo, 5- ADN genómico de *Shinella* sp. UYSO24; reacción de amplificación con cebadores para *Shinella* sp. UYSO24 con: 6- ADN genómico de *Enterobacter* sp. UYSO10, 7- ADN genómico de *Shinella* sp. UYSO24, 8- control negativo; reacción de amplificación con cebadores para *Enterobacter* sp. UYSO10 con: 9- ADN genómico de *Enterobacter* sp. UYSO10 y 10- ADN genómico de *Shinella* sp. UYSO24. En el caso de los genes conservados se utilizó una temperatura de hibridación/extensión de 55 °C y para los cebadores específicos de 60 °C.

2.2.2 Presencia de bacterias endófitas en tallos de caña de azúcar

Una vez definido el protocolo de reacción de la PCR en tiempo real, se realizó una prueba de amplificación del gen constitutivo de bacterias *recA* a partir de ADN de planta, con el fin de evaluar la presencia de bacterias endófitas. Se obtuvo amplificación de los genes *TEF* y *recA*, observándose una mayor concentración del gen *TEF* como es de esperar ya que el mismo amplifica el ADN de planta (Figura 8b).

3 DISCUSION

Conocido el efecto promotor del crecimiento vegetal de algunos cultivos a partir de la inoculación con endófitos y particularmente endófitos diazotrofos, resulta en la consideración de dichas bacterias como posibles candidatos para la formulación de inoculantes. Los inoculantes son desarrollados bajo el postulado de que el aumento de la población bacteriana de interés conllevará a aumentar el efecto promotor del crecimiento vegetal deseado. Por lo tanto, la estrategia de un inoculante será incrementar la población bacteriana asociada al cultivo, adicionando una formulación determinada en un momento adecuado. Por este motivo resulta de gran importancia el conocimiento de la interacción planta-bacteria, que será utilizada para mejorar el éxito de la aplicación del inoculante en los sistemas de producción agrícola.

Dada la complejidad intrínseca de los estudios de interacción, muchas veces las primeras aproximaciones son realizadas en sistemas simples en el laboratorio como ser el estudio de una cepa en plantas libres de microorganismos (micropropagadas o germinadas a partir de semillas esterilizadas superficialmente). Una vez conocidas ciertas características de la interacción, se realizan estudios en sistemas más complejos en sustratos no estériles o en material colectado de campo. En dichos sistemas el desempeño de las bacterias inoculadas se ve afectado por la comunidad de microorganismos ya presentes en el material vegetal. Teniendo como objetivo la aplicación de las bacterias en sistemas agrícolas, el último desafío consiste en estudiar la interacción a nivel de plantas cultivadas en el campo, sin embargo son pocos los estudios realizados en esta área.

Particularmente, cuando se trabaja con bacterias endófitas, es de gran interés conocer los mecanismos de interacción que permiten a este grupo de bacterias dejar la colonización epifítica (superficial) e ingresar a la planta. El proceso de interacción ha sido dividido en diferentes etapas que incluyen la adhesión superficial de las bacterias, la infección, invasión y colonización bacteriana de los tejidos y la proliferación bacteriana en los mismos. Varias técnicas de estudio han sido aplicadas a la búsqueda del entendimiento de las relaciones espacio temporales de los endófitos en su estado epi- y endofítico. Con el objetivo de estudiar la actividad bacteriana *in vivo*, se precisa contar con herramientas que permitan visualizar las bacterias, estudiar la expresión de genes de interés así como cuantificar los cambios en la población bacteriana, bajo diferentes condiciones determinadas por la planta.

En la presente tesis se planteó como objetivo el desarrollo de herramientas de biología molecular que permitan la visualización de la interacción y la cuantificación de las poblaciones bacterianas. Para ello se utilizó como modelo de estudio plantas de caña de azúcar en sistemas de laboratorio y bacterias PCV aisladas de variedades de cañas de azúcar cultivadas en el país. Los resultados mostrados no son definitivos, sino que muestran el avance que se ha obtenido en la utilización de las técnicas tendiente al desarrollo de protocolos. La puesta a punto de estas técnicas en el presente modelo permitirá su posterior adaptación a otros modelos de interacción planta-bacteria.

3.1 Visualización de la interacción: aplicación de la técnica de FISH al modelo caña de azúcar-bacteria PCV

La metodología ideal para la visualización de la interacción, debe permitir diferenciar la cepa bacteriana inoculada del resto de la población nativa. Para alcanzar dicho objetivo varios estudios han utilizado combinaciones de técnicas de identificación cepa específica y de grupos (8). Idealmente los protocolos desarrollados deben poder ajustarse a los diferentes niveles de complejidad de los sistemas ensayados.

La hibridación *in situ* fluorescente es una técnica que permite la identificación filogenética de organismos a través de la hibridación específica de una sonda marcada con un fluoróforo. La técnica se basa en que cada ribosoma de una célula contiene una copia del 5S, 16S y del 23S el cual es hibridado con una sonda. De esta forma los altos números de ribosomas por célula proveen de un sistema amplificación natural de la señal, permitiendo por ende, la identificación de bacterias activas en su hábitat natural (2). Asimismo el método se sostiene en la gran cantidad de estudios filogenéticos que se realizan utilizando como marcadores moleculares genes ribosomales. Estos genes son marcadores moleculares ideales debido a que su función se encuentra conservada, son de distribución ubicua y presentan secuencias nucleotídicas altamente conservadas y otras altamente variables. Por estos motivos, la técnica permite la identificación filogenética a distintos niveles taxonómicos. Debido a la gran base de datos existente, la mayoría de las sondas han sido diseñadas para el gen 16S *ARNr*, sin embargo existen en menor cantidad sondas diseñadas para el gen 23S *ARNr*(104). En comparación con otras técnicas, FISH presenta la ventaja que no requiere del cultivo de los microorganismos y particularmente en comparación con el uso de genes reporteros presenta la ventaja de no precisar un sistema de selección para mantener el marcador. Al respecto el

uso de antibióticos no siempre es viable en estudios *in situ* dado que su adición afecta la comunidad bacteriana nativa (8), sin olvidar que la presencia del plásmido puede disminuir la eficacia de colonización y no es aplicable a ensayos de campo por motivos de seguridad. El mayor desafío de la técnica es su aplicación a muestras ambientales. Al respecto se ha avanzado desarrollando protocolos cuantitativos, fluoróforos con mayor intensidad de emisión de luz, programas específicos para el diseño de sondas así como mejoras en los equipos de instrumentación (104). Actualmente el reto se encuentra en la aplicación de nuevas sondas en contextos de arreglos microbianos desconocidos. El problema más común que se presenta en muestras ambientales es detectar bajas densidades poblacionales o poblaciones que presenten baja actividad. Para sobrellevar los mismos se han desarrollado alternativas, entre ellas el uso de CARD-FISH. En este caso las sondas se encuentran marcadas con una peroxidasa y la señal es amplificada por la presencia de tiramidas (104). Otra alternativa que ha sido publicada, implica un paso previo a la hibridación con la sonda, en donde se amplifica mediante PCRel gen *16S ARNr* (122).

Diversos estudios muestran la aplicación exitosa del método en el estudio de comunidades acuáticas, así como en sedimentos, suelos y aguas de tratamiento (3). Ésta técnica también ha sido aplicada al estudio de la interacción planta-bacteria, particularmente en la colonización superficial e infección radicular por bacterias PCV (8, 30, 105). En caña de azúcar se han reportado dos estudios, uno sobre la asociación de la bacteria *Gluconacetobacter sacchari* a cochinillas asociadas a hojas de caña de azúcar (45) y el segundo aplicado al estudio de la competencia entre distintas mezclas bacterias inoculadas en plantas de caña de azúcar micropropagadas (96).

Con el objetivo de desarrollar esta herramienta para el estudio de la interacción bacterias PCV-planta hospedera, se diseñaron sondas específicas para cuatro aislamientos de la colección realizada en este estudio. Las mismas fueron diseñadas en el programa ARB en base a la secuencia del *16S ARNr*. Mediante el marcado en un árbol filogenético del grupo de interés y de las características deseadas en el diseño de la sonda, la herramienta Probe_Design brinda una lista de posibles sondas. Idealmente la sonda de interés posee al menos una base desapareada con cualquier otro organismo no blanco. Sin embargo, no es frecuente encontrar sondas perfectas, entonces la elección se basa en un compromiso entre la especificidad en la cobertura del grupo de interés y los grupos externos no deseados (104). Para evitar o reducir el problema se pueden usar competidores, que son sondas sin marcar

complementarias a los organismos no blanco. En el presente estudio no se obtuvieron sondas "ideales", pero para la elección se tomo en cuenta la información ecológica de los organismos no blancos detectados en estudios de especificidad *in silico*. Otro problema a considerar es el sitio de hibridación y por ende la accesibilidad de la sonda. Al respecto se han realizado estudios de la accesibilidad del 16S ARNr para dos miembros del dominio bacteria: *Escherichia coli* y *Rhodopirellula báltica* (12, 48). Si bien los estudios de accesibilidad fueron realizados en dos especies bacterianas, la estructura espacial de la subunidad ribosomal se encuentra conservada conociéndose sitios con secuencias nucleotídicas variables y conservadas(12). Por lo tanto las sondas diseñadas para cualquier bacteria son evaluadas en la estructura espacial de *E. coli*, pero la prueba real de hibridación la constituye el ensayo *in vitro*. En este estudio se comenzó evaluando la capacidad de hibridar *in vitro* con las bacterias blanco solamente con dos de las sondas específicas diseñadas. A partir de estos primeros ensayos de hibridación se obtuvo señal solamente con la sonda diseñada para la cepa *Shinella* sp. UYSO24. Un posible motivo de porque la sonda contra *Enterobacter* sp. UYSO10 no hibridó con la cepa blanco, pudo deberse a la baja eficiencia de marcado con el fluoróforo que mostró la sonda sintetizada. Al respecto, el siguiente paso sería sintetizar nuevamente la sonda esperando obtener una mejor eficiencia de marcado con el fluoróforo. Otra opción a considerar es que la secuencia blanco no se encuentre accesible. Para solucionar este problema la estrategia sería el diseño de sondas "helper" que mejoren el acceso de la sonda al sitio blanco. Las sondas "helper" actúan hibridándose a sitios adyacentes al sitio blanco generando un efecto de apertura de la región de unión (47). Por otro lado, se ha reportado que mayores tiempos de hibridación pueden compensar la baja eficiencia de unión debido a la existencia de un efecto cinético en la afinidad de sondas con baja accesibilidad (157).

A continuación y como la sonda para *Shinella* sp. UYSO24 hibridó específicamente, se realizaron estudios de la especificidad de la unión de la sonda *in vitro*. Para ello se comparó la hibridación con cepas pertenecientes a otras subclases de las proteobacterias bajo dos condiciones de estringencia. La estringencia se encuentra determinada en las etapas de hibridación y lavado, donde la hibridación depende de la secuencia nucleotídica, el largo de la sonda así como de la temperatura y el porcentaje de formamida utilizados. Es así que la estringencia puede ser modificada cambiando la temperatura o la cantidad de formamida en el buffer de hibridación. Por lo tanto, la estringencia deseada ocurre en el punto antes que la fluorescencia de células blanco comience a decrecer y la de los organismos no blanco sea baja o nula. Conociendo la regla en que, una sonda de 18 pb y con un contenido GC entre 50 y 60

comenzará a disociarse en un buffer a 46 °C en concentraciones de formamida de 30 y 40 %, se ensayó la especificidad de unión *in vitro* de la sonda contra *Shinella* sp. UYSO24 bajo las condiciones de estringencia de 40 y 50 % de formamida. Bajo ambas condiciones se observó la hibridación específica de la cepa blanco. A futuro y con el objetivo optimizar los resultados encontrados, se propone continuar con dos actividades: 1- realizar una curva de disociación de la sonda con su cepa blanco midiendo los cambios de intensidad de hibridación con programas computacionales o citometría de flujo y 2- realizar un estudio de especificidad disminuyendo el porcentaje de formamida así como ensayar un rango más amplio de cepas bacterianas incluyendo representantes del género *Shinella* y otros géneros cercanos.

En paralelo y con el objetivo final de aplicar la técnica de FISH en cortes de tejidos de plantas de caña de azúcar, se realizaron pruebas de fijación de los tejidos utilizando como agentes de fijación moléculas y medios de inclusión que no fluorescan. Como agente de fijación se evaluó el paraformaldehído y como medios de inclusión agar y Tissue freezing medium. Partiendo de estas dos metodologías se realizaron cortes de raíces de cañas de azúcar micropropagadas y germinadas en el laboratorio a partir de yemas. Una alternativa es el uso de resinas para la inclusión y el cortado del material, eliminándose la misma antes de realizar la hibridación.

Utilizando como material de hibridación los cortes realizados así como la superficie de raíces, el siguiente paso es poner a punto la técnica de hibridación *in situ* en los tejidos. En una primera instancia la idea es hibridar con las sonda generales plantas micropropagadas e inoculadas y plantas germinadas en el laboratorio. Posteriormente se aplicarán las sondas específicas de forma de poder evaluar la presencia de las cepas en los tejidos, así como contar con una herramienta que permita observar los cambios causados sobre la población nativa.

3.2 Cuantificación de poblaciones de interés: aplicación de la técnica de PCR en tiempo real al modelo caña de azúcar-bacteria PCV

Normalmente la presencia de bacterias ha sido estudiada mediante metodologías que involucran el aislamiento bacteriano dependientes de cultivo o por metodologías derivadas de la aplicación de la PCR en tiempo final y por lo tanto independientes de cultivo. Por otro lado, a la hora de cuantificar endófitos tradicionalmente se han utilizado técnicas dependientes de cultivo como el recuento en placa o el número más probable (NMP) como lo

es el caso de los diazótrofos (97, 152). Éstas presentan la desventaja que precisamos conocer un medio semiselectivo para el organismo/s de interés y que es posible recuperar en dichos medios otros aislamientos que no son de interés. Otra técnica independiente de cultivo que ha sido aplicada en el estudio de diazótrofos de caña de azúcar es la cuantificación mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales (131). Sin embargo dicha técnica es trabajosa, su desarrollo demanda mucho tiempo y no es tan sensible. Para salvar dichos problemas, la aplicación de la PCR en tiempo real ha mostrado ser muy útil en la detección y cuantificación de organismos o grupos de interés. La detección en tiempo real es alcanzada por la medida del producto formado después de cada ciclo de amplificación. La medida se realiza espectrofotométricamente por el uso de sondas específicas que al unirse con el producto emiten señal fluorescente o el uso de agentes que al intercalarse con el ADN florecen. Partiendo de una curva patrón del producto de amplificación, la cuantificación del molde de partida en una muestra es fácilmente alcanzada. Esta técnica se diferencia con la PCR en tiempo final por la sensibilidad con que es detectada la secuencia blanco y la posibilidad de cuantificar el molde inicial presente en la muestra. A su vez presenta la ventaja que la obtención de resultados es muy rápida. Por estos motivos la PCR en tiempo real ha sido extensamente aplicada a la detección de patógenos de origen bacteriano y viral. En el caso de microorganismos asociados a plantas se ha usado para detectar y cuantificar hongos endófitos así como bacterias endófitas (82, 122). También se ha utilizado para comparar la abundancia de una cepa según tejido de la planta y en el total de la comunidad de endófitos (122).

En este estudio se pretendió desarrollar la técnica de PCR en tiempo real para su aplicación en la cuantificación de aislamientos de interés presentes en los tejidos de la planta de caña de azúcar. Para ello, se seleccionaron genes que serán usados como referencia, permitiendo cuantificar el aislamiento de interés por gramo de tejido utilizando el gen constitutivo de plantas *TEF* y en relación al número total de endófitos utilizando el gen constitutivo bacteriano *recA*. Con dicho objetivo se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia del gen *16S ARNr* para los aislamientos: *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24. En la PCR en tiempo real la optimización de la amplificación se realiza por modificación de la temperatura de hibridación que depende principalmente de la secuencia de los cebadores y de la composición y de la fuerza iónica del buffer de reacción. En el caso del kit utilizado en este estudio, los pasos de hibridación y extensión se encuentran unificados en una única etapa de 10 segundos. En este estudio se consiguió amplificar específicamente

las secuencias blanco utilizando los cebadores constitutivos *TEF* y *recA*, así como los cebadores específicos para *Shinella* sp. UYSO24 y *Enterobacter* sp. UYSO10. La amplificación del producto esperado fue corroborado por la presencia de un único pico en las curvas de disociación, la visualización del tamaño esperado del amplicón así como su secuenciación y comparación de identidad con el producto esperado. A pesar de haber obtenido la amplificación específica esperada, en las curvas de disociación se observó a temperaturas bajas, inespecificidad en la reacción. Es común encontrarse con amplificaciones inespecíficas o señal debida a la presencia de dímeros de los cebadores, sin embargo la inespecificidad observada en las curvas de disociación no se presenta en forma de picos discretos como sería de esperar en estos casos. Por otro lado se presenta en todas las reacciones con los cuatro juegos de cebadores, por lo que resulta mas difícil que se trate de dímeros de cebadores. A su vez, se observó que la aparición y altura en el gráfico de la inespecificidad mencionada en las curvas de disociación, está relacionada en forma proporcionalmente directa a la amplificación del producto. Uno de los mayores problemas en PCR en tiempo real cuantitativa utilizando SYBR Green, es que la emisión de fluorescencia inespecífica contribuye a la señal total medida y por ende en la cuantificación. Por lo tanto, este efecto reduce el rango de la relación lineal entre el número de ciclos necesarios para detectar el producto y la cantidad inicial de templado, resultando en una cuantificación menos confiable de muestras sobre todo cuando están presentes en bajo número de copia. Por los motivos expresados, es de suma importancia a futuro, el lograr reducir la inespecificidad obtenida en las reacciones. Como posibles puntos a evaluar se proponen: 1-ajustar la concentración de magnesio en el buffer y 2- realizar más pasos de purificación del ADN (eliminar impurezas que pueden provenir del método de extracción). Como el problema se detecta en todas las reacciones, probablemente el mismo este asociado a la calidad del ADN utilizado de molde, requiriendo algún paso extra de purificación.

Si bien se obtuvieron los productos esperados en la reacción, en el caso particular de los cebadores específicos se obtuvo una pequeña amplificación a partir de ADN no blanco, aun a temperaturas de hibridación de 60 °C. Los siguientes pasos propuestos a seguir son: ensayar un aumento de la temperatura de hibridación, para lograr una amplificación específica de la cepa blanco así como evaluar posteriormente dicha especificidad de amplificación en un mayor rango de cepas incluyendo cepas del mismo género y de géneros cercanos.

Una vez mejorada la especificidad de reacción y obtenidos los resultados de la especificidad con respecto a otras cepas, el siguiente paso sería realizar curvas de calibración para cuantificar el molde presente en las muestra. Para ello se pueden realizar dos tipos de cuantificaciones, relativa y absoluta. La cuantificación relativa que es la que se quiere aplicar, implica la medida y observación de la relación entre las copias del gen a cuantificar y la de los genes usados como referencia. Para ello es importante conocer y comparar la eficiencia de amplificación de los genes en estudio. Por otro lado, la cuantificación absoluta utiliza estándares externos que brindan valores de copia absolutos (moléculas de concentración o número de copia conocidas) como plásmidos con el producto esperado, productos de PCR o ADN genómico si se conoce el número de copias en que está presente el gen.

ANEXO

1 Medios de cultivo para bacterias

Las cepas de la colección fueron crecidas en los medios ricos: Dygs (155) y TY(16) así como en los medios semiselectivos: JNFb (10), LGI (25), LGI-P(25), BMGM (39) y NFB malato +N+K (128). El medio LGI-P Caldo fue preparado de la misma forma que el medio LGI-P al que se le adicionó 5,0 ml de jugo de caña (115).

Medio TY

Componente	Cantidad por litro
Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

Medio Dygs

Componente	Cantidad por litro
Glucosa	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extracto de levadura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutámico	1,5 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

El pH se ajustó a 6,5. Cuando el medio de cultivo es preparado para crecer *Gluconacteobacter diazotrophicus* no se agrega el ácido málico y el pH se ajustó a 6,0.

Medios JNFb, LGI y LGI-P

Componente	Cantidad por litro		
	JNFb	LGI	LGI-P
Azúcar cristal	-	5,0 g	100 g
Ácido málico	5,0 g	-	-
K ₂ HPO ₄	0,6 g	0,2 g	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g	0,6 g	0,6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	0,2 g	0,2 g
NaCl	0,1 g	-	-
CaCl ₂	0,015 g	0,015 g	0,015 g
Solución FeEDTA 1,64 %	4,0 ml	4,0 ml	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	0,01 g	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0,002 g	0,002 g
Solución de micronutrientes	2,0 ml	-	-
Vitaminas	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Extracto de levadura*	0,05 g	0,05 g	0,05 g
KOH	4,5 g	-	-
H ₂ O c.s.p. 1 litro			

* Solo para medio sólido

Se ajustó el pH a 5,8 con solución de KOH 1 % para JNFb, 6,0 - 6,2 con solución de H₂SO₄ 5 % para LGI y 5,5 con solución de ácido acético 1 % para LGI-P. Se agregó el colorante azul de bromotimol 0,5 % en cantidades de 2,0 ml/l para JNFb y 5,0 ml/l para los medios de cultivo LGI y LGI-P. Para la preparación de los medios semisólido se agregó 1.6 g/l de agar y para los medios sólidos 18 g/l por litro.

Medio BMGM

Componente	Cantidad por litro
Ácido málico	2,0 g
Glucosa	2,0 g
Manitol	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
FeCl ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g
Extracto de levadura	0,05 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

El pH se ajustó a 6,0. Para la preparación de los medios semisólidos se utilizó agar a una concentración 2,3 g/l.

Medio NFb malato +N+K

Componente	grs / ml por litro
ácido málico	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O 10%	0,2 g
NaCl 10%	0,1 g
CaCl ₂ ·H ₂ O 1%	2,0 g
K ₂ HPO ₄ 10 %	0,1 g
KH ₂ PO ₄ 10 %	0,4 g
solución de vitaminas	1 ml
solución de micronutrientes	2 ml
NH ₄ Cl	1,0 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

El pH se ajustó a 6,5.

Solución de micronutrientes

Componente	Cantidad por litro
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
MoO ₃ ·H ₂ O	0,09 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

Solución de vitaminas

Componente	Cantidad por litro
Biotina	0,01 g
Pyridoxal-HCl	0,02 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

Medio para evaluar cepas solubilizadoras de fosfatos

A 1 litro de medio GL a una temperatura de 50 °C se le agrega 50 ml de una solución estéril de K₂HPO₄ 10 % y de una solución estéril de 100 ml CaCl₂ 10 % (138).

Medio GL

Componente	Cantidad por litro
Glucosa	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Agar	15,0 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro.	

El pH se ajustó a 5,8.

2 Medios de cultivo para plantas

Para las plantas de caña de azúcar crecidas en el laboratorio se utilizó el medio de cultivo Fahraeus (40). En el caso de plantas de caña de azúcar micropropagadas se utilizó el medio de cultivo Murashinge-Skoog (90) sin vitaminas. A éste medio base se le agregaron 1 ml/l de la solución de vitaminas Staba (78), 200 mg/l de Mioinositol y 20 g/l sacarosa. Modificaciones en el medio de cultivo MS, que implican la reducción al decimo de las sales y el N fueron definidas para incrementar la colonización bacteriana de los tejidos de la planta (117).

Medio Fahraeus

Componente	Cantidad por litro
Na ₂ HPO ₄	150 mg
KH ₂ PO ₄	100 mg
CaCl ₂	100 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	120 mg
Fe citrato	5 mg
H ₂ O c.s.p.	1 litro

El pH se ajustó a 6,5.

Medio Murashinge-Skoog (MS)

Componente	Cantidad por litro
NH ₄ NO ₃	1650 mg
KNO ₃	1900 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
IK	0,83 mg
H ₃ BO ₃	6,2 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg
EDTA	37,3 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8 mg
H ₂ O c.s.p.	1 litro

El pH se ajustó a 5,8. Para la preparación de los medios sólidos se utilizó agar a una concentración 7,0 g/l.

Vitaminas Staba

Componente	Cantidad por litro
Ácido fólico	50 mg
Biotina	100 mg
Cloro colina	100 mg
ácido pantoténico	100 mg
Tiamina	100 mg
Nicotinamida	200 mg
Piridoxina	200 mg
Ácido aminobenzoico	200 mg
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

3 Otras soluciones

Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE)

Componente	Concentración
Tris-acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

PBS

Componentes	Cantidad por litro
NaCl	8,0 g
NaH ₂ PO ₄	0,36 g
Na ₂ HPO ₄	0,99 g
H ₂ O csp 1 litro.	

El pH se ajustó a 7,2.

En el marco de esta tesis se realizó una publicación en una revista arbitrada:

Plant Soil
DOI 10.1007/s11104-011-1023-4

REGULAR ARTICLE

The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community

Cecilia Taulé · Cintia Mareque · Claudia Barlocco · Fernando Hackembruch ·
Veronica M. Reis · Margarita Sicardi · Federico Battistoni

Received: 11 February 2011 / Accepted: 6 October 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract

Background and aims Rhizospheric, epiphytic and endophytic bacteria are associated with several non-legumes, colonizing their surface and inner tissues. Many of these bacteria are beneficial to their hosts,

Responsible Editor: Euan K. James.

Cecilia Taulé and Cintia Mareque made equal contributions

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-011-1023-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Taulé · C. Mareque · F. Battistoni (✉)
Microbial Biochemistry and Genomics Department,
“Clemente Estable” Biological Research Institute,
Avenida Italia 3318,
Montevideo 11600, Uruguay
e-mail: batti@iibce.edu.uy

C. Barlocco · M. Sicardi
Soil Microbiology Laboratory, Science Faculty, UdelaR,
Mataojo 2055,
Montevideo 11400, Uruguay

F. Hackembruch
Agriculture Department,
Alcoholes del Uruguay S.A. (ALUR),
Camino Calnu S/N,
Artigas 55100, Uruguay

V. M. Reis
EMBRAPA-Agrobiologia BR465,
Km 07,
23851-970 Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil

and are collectively termed plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Recent interest has focused particularly upon PGPR that are endophytic (i.e. PGPE), and which have been reported to be associated with important crops such as rice, wheat and sugarcane. Different mechanisms are involved in bacteria-induced plant growth promotion (PGP), including biological nitrogen fixation (BNF), mineral solubilization, production of phytohormones and pathogen biocontrol. In Uruguay, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is considered a strategic multipurpose crop, used for bioenergy, feed, sugar and bioethanol production. The aim of this work was to estimate the BNF contribution to Uruguayan sugarcane cultivars, as well as to identify and characterize the (culturable) putatively endophytic diazotrophic bacteria associated with these varieties.

Methods and results Results using the ^{15}N -dilution technique have shown that these sugarcane varieties obtain significant inputs of N from BNF (34.8–58.8% Ndfa). In parallel, a collection of 598 isolates of potentially endophytic diazotrophs was obtained from surface-sterilized stems using standard isolation techniques, and *nifH*⁺ isolates from these were the subject of further studies. The bacteria were shown to belong to several genera, including *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Rhanelia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Shinella*, *Agrobacterium* and *Achromobacter*. Additionally, some PGP features were studied in 35 selected isolates. The data obtained in this study represent the initial steps in a program

Published online: 26 October 2011

 Springer

BIBLIOGRAFÍA

1. Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of *16S rRNA*-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:1919-1925.
2. Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* **59**:143-169.
3. Amann, R., B. M. Fuchs, and S. Behrens. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:231-236.
4. Amann, R., and W. Ludwig. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:555-5665.
5. An, Q., Y. Dong, W. Wang, Y. Li, and J. Li. 2007. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph. *Journal of Applied Microbiology* **103**:613-620.
6. Araújo, W. L., W. Maccheroni, C. Aguilar-Vildoso, P. A. V. Barroso, H. O. Saridakis, and J. L. Azevedo. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* **47**:229-236.
7. Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1992. *Short protocols in molecular biology*. Second. Harvard Medical School.
8. Aßmus, B., M. Schloter, G. Kirchhof, P. Hutzler, and A. Hartmann. 1997. Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA targeted oligonucleotides. *Microbial Ecology* **33**:32-40.
9. Baldani, J. I., and V. L. Baldani. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **77**:549-79.
10. Baldani, V. L. D., J. I. Baldani, F. L. Olivares, and J. Dobereiner. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* **13**:65-73.
11. Bastián, F., A. Cohen, P. Piccoli, V. Luna, R. Baraldi, and R. Bottini. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* **24**:7-11.
12. Behrens, S., C. Ruhland, J. Inácio, H. Huber, Á. Fonseca, I. Spencer-Martins, B. M. Fuchs, and R. Amann. 2003. *In Situ* Accessibility of Small-Subunit rRNA of Members of the Domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1748-1758.
13. Bellone, S. C., and C. H. Bellone. 2006. Presence of endophytic diazotrophs in sugarcane juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**:1065-1068.

14. Benson, D. a, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and D. L. Wheeler. 2004. GenBank: update. *Nucleic Acids Research* 32:D23-D26.
15. Berge, O., T. Heulin, and W. Achouak. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Canadian Journal of Microbiology* 37:195-203.
16. Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84:188-198.
17. Bertalan, M., R. Albano, V. de Pádua, L. Rouws, C. Rojas, A. Hemerly, K. Teixeira, S. Schwab, J. Araujo, A. Oliveira, L. França, V. Magalhães, S. Alquéres, A. Cardoso, W. Almeida, M. M. Loureiro, E. Nogueira, D. Cidade, D. Oliveira, T. Simão, J. Macedo, A. Valadão, M. Dreschsel, F. Freitas, M. Vidal, H. Guedes, E. Rodrigues, C. Meneses, P. Brioso, L. Pozzer, D. Figueiredo, H. Montano, J. Junior, G. de Souza Filho, V. Martin Quintana Flores, B. Ferreira, A. Branco, P. Gonzalez, H. Guillobel, M. Lemos, L. Seibel, J. Macedo, M. Alves-Ferreira, G. Sachetto-Martins, A. Coelho, E. Santos, G. Amaral, A. Neves, A. B. Pacheco, D. Carvalho, L. Lery, P. Bisch, S. C. Rössle, T. Urményi, A. Rael Pereira, R. Silva, E. Rondinelli, W. von Krüger, O. Martins, J. I. Baldani, and P. C. G. Ferreira. 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15. *BMC Genomics* 10:450.
18. Bhattacharjee, R. B., A. Singh, and S. N. Mukhopadhyay. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80:199-209.
19. Bloemberg, G. V., a H. Wijnjes, G. E. Lamers, N. Stuurman, and B. J. Lugtenberg. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1170-1176.
20. Bloemberg, G. V., and M. M. C. Carvajal. 2006. Microbial interactions with plants: a hidden world?, p. 321-336. *In* B. Schulz, C. Boyle, and T.N. Sieber (eds.), *Microbial root endophytes*, 9th ed. Springer-Verlag, Berlin.
21. Boddey, R. M., J. C. Polidoro, A. S. Resende, B. J. R. Alves, and S. Urquiaga. 2001. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:889-895.
22. Boddey, R. M., O. C. Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. Olivares, V. L. D. Baldani, and J. Dobereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil* 174:195-209.
23. Burbano, C. S., Y. Liu, K. L. Rösner, V. M. Reis, J. Caballero-Mellado, B. Reinhold-Hurek, and T. Hurek. 2011. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. *Environmental Microbiology Reports* 3:383-389.
24. Capone, D. G. 1993. Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure., p. 621-631. *In* P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, and J.J. Cole (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis, Florida.

25. Cavalcante, V. a, and J. Dobereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* **108**:23-31.
26. Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, a S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **37**:D141-D145.
27. Compant, S., B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, and E. Barka. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth- promoting bacterium *Burkholderia* sp . Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1685-1693.
28. Coutinho, T., and S. Venter. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology* **10**:325-335.
29. Cruz, A. T., A. C. Cazacu, and C. H. Allen. 2007. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:1989-1992.
30. De-Bashan, L. E., J. P. Hernandez, Y. Bashan, and R. M. Maier. 2010. *Bacillus pumilus* ES4□: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* **69**:343-352.
31. DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, K. Keller, E. L. Brodie, N. Larsen, Y. M. Piceno, R. Phan, and G. L. Andersen. 2006. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* **72**:5069-5072.
32. Dobereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry* **29**:771-774.
33. Dong, Z., M. Heydrich, K. Bernard, and M. E. McCully. 1995. Further Evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:1843-1846.
34. Dong, Z., M. J. Canny, M. E. McCully, M. R. Roboredo, C. F. Cabadilla, E. Ortega, and R. Rodes. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (A new role for the apoplast). *Plant Physiology* **105**:1139-1147.
35. Doty, S., B. Oakley, G. Xin, J. W. Kang, G. Singleton, Z. Khan, A. Vajzovic, and T. S. James. 2009. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* **47**:23-33.
36. Dunny, G. M., L. N. Lee, and D. J. LeBlanc. 1991. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:1194-1201.
37. Egener, T., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. 1998. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**:71-75.
38. Elliot, G. N., W.-M. Chen, J.-H. Chou, H.-C. Wang, S.-Y. Sheu, L. Perin, V. M. Reis, L. Moulin, M. F. Simon, C. Bontemps, J. M. Sutherland, R. Bessi, S. M. de Faria, M. J. Trinick, A. R. Prescott, J. I. Sprent, and E. K. James. 2007. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytologist* **173**:168-180.

39. 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. Applied and Environmental Microbiology **67**:2790-2798.
40. Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. Journal of General Microbiology **16**:374-381.
41. Feng, Y., D. Shen, and W. Song. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. Journal of Applied Microbiology **100**:938-945.
42. Ferrando, V., M. Lagos, and G. Llarena. 2008. Impacto Socio-Económico de Alur en Bella Unión. Tesis de la Licenciatura en Administración/Contador Público. UdelaR.
43. Fogliata, F. A. 1995. Agronomía de la caña de azúcar. El graduado, Tucumán.
44. Fouts, D. E., H. L. Tyler, R. T. DeBoy, S. Daugherty, Q. Ren, J. H. Badger, A. S. Durkin, H. Huot, S. Shrivastava, S. Kothari, R. J. Dodson, Y. Mohamoud, H. Khouri, L. F. W. Roesch, K. a Krogfelt, C. Struve, E. W. Triplett, and B. A. Methé. 2008. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. PLoS Genetics **4**:e1000141.
45. Franke, I. H., M. Fegan, C. Hayward, G. Leonard, and L. I. Sly. 2000. Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. FEMS Microbiology Ecology **31**:61-71.
46. Frioni, L. 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Primera. Orientación Grafica Editorial, Buenos Aires.
47. Fuchs, B. M., F. O. Glockner, J. Wulf, and R. Amann. 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology **66**:3603-3607.
48. Fuchs, B. M., W. Gunter, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig, and R. Amann. 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology **64**:4973-4982.
49. Fuentes-Ramirez, L. E., T. Jimenez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, and J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. Plant and Soil **154**:145-150.
50. Fuentes-Ramírez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, and E. Martínez-Romero. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiology Ecology **29**:117-128.
51. Garabet, S., J. Ryan, and M. Wood. 1998. Nitrogen and water effects on wheat yield in a Mediterranean-type climate. II. Fertilizer-use efficiency with labeled nitrogen. Crop Research **58**:213-221.

52. Govindarajan, M., J. Balandreau, R. Muthukumarasamy, G. Revathi, and C. Lakshminarasimhan. 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil* 280:239-252.
53. Grout, B. W. W. 1990. Meristem-Tip Culture, p. 81-91. *In* J.W. Polard, and J. Waker (eds.), *Methods in Molecular Biology*. vol 8, *Plant cell and tissue culture*. The Humana Press.
54. Hallmann, J., G. Berg, and B. Schulz. 2006. Isolation procedures for endophytic microorganisms. *In* B. Schulz, C. Boyle, and T.N. Sieber (eds.), *Microbial Root Endophytes*, 9th ed. Springer, Berlin.
55. Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895-914.
56. Halvorson, A. D., R. F. Follett, M. E. Bartolo, and F. C. Schweissing. 2002. Nitrogen fertilizer use efficiency of furrow-irrigated onion and corn. *Agronomy Journal* 94:442-449.
57. Hardoim, P. R., L. S. van Overbeek, and J. D. V. Elsas. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16:463-471.
58. Hardy, R. W., R. D. Holsten, E. K. Jackson, and R. C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43:1185-1207.
59. Heeb, S., Y. Itoh, T. Nishijyo, U. Schnider, C. Keel, J. Wade, U. Walsh, F. O'Gara, and D. Haas. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:232-237.
60. Hugenholtz, P., G. W. Tyson, and L. L. Blackall. 2002. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Methods in Molecular Biology* 179:29-42.
61. Hulton, C. J. S., C. F. Higgins, and P. M. Sharp. 1991. Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5:825-834.
62. Hurek, T. 2006. Constraints for endophytic bacteria, p. 409-418. *In* B. Sattelmacher, and W.J. Horst (eds.), *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions*. First edition. Kluwer Academic.
63. Hurek, T., and B. Reinhold-Hurek. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology* 106:169-178.
64. Hurek, T., and B. Reinhold-Hurek. 2005. Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plant: hidden activities of unknown bacteria., p. 173-198. *In* D. Werner, and W.E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and Environment*. Springer.
65. Idris, A., N. Labuschagne, and L. Korsten. 2009. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *The Journal of Agricultural Science* 147:17-30.

66. Iniguez, a L., Y. Dong, and E. W. Triplett. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:1078-1085.
67. James, E. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65:197-209.
68. James, E. K., F. L. Olivares, a L. de Oliveira, F. B. dos Reis, L. G. da Silva, and V. M. Reis. 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany* 52:747-760.
69. James, E. K., V. M. Reis, F. L. Olivares, J. I. Baldani, and J. Dobereiner. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45:757-766.
70. James, E. K., and F. L. Olivares. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17:77-119.
71. Keyeo, F., O. Noor, Ai ´shah, and H. G. Amir. 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice. *Seedling. Biotechnology* 10:267-273.
72. Krause, A., A. Ramakumar, D. Bartels, F. Battistoni, T. Bekel, J. Boch, M. Böhm, F. Friedrich, T. Hurek, L. Krause, B. Linke, A. C. McHardy, A. Sarkar, S. Schneiker, A. S. Arshad, R. Thauer, F.-J. Vorhölter, S. Weidner, A. Pühler, B. Reinhold-Hurek, O. Kaiser, and A. Goesmann. 2006. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nature Biotechnology* 24:1385-1391.
73. Kuklinsky-Sobral, J., L. A. Welington, R. Mendez, I. O. Gerladi, A. A. Pizzirani-Kleiner, and J. L. Azevedo. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6:1244-1251.
74. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing., p. 115-175. *In* E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York.
75. Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
76. Larrainzar, E., F. O ´Gara, and J. P. Morrissey. 2005. Application of autofluorescent proteins for *in situ* studies in microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 59:257-277.
77. Lima, E., R. Boddey, and J. Dobereiner. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a 15N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry* 19:165-170.
78. Lin, A., and E. J. Staba. 1961. Peppermint and spearmint tissue cultures I. Callus formation and submerged culture. *Lloydia* 24:139-145.
79. Lin, D. X., E. T. Wang, H. Tang, T. X. Han, Y. R. He, S. H. Guan, and W. X. Chen. 2008. *Shinella kummerowiae* sp . nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal

- legume *Kummerowia stipulacea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:1409-1413.
80. Loy, A., R. Arnold, P. Tischler, T. Rattei, M. Wagner, and M. Horn. 2008. probeCheck—a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. Environmental Microbiology 10:2894-2898.
 81. Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüssmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K.-H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Research 32:1363-1371.
 82. Maciá-Vicente, J. G., H.-B. Jansson, N. J. Albor, and L. V. Lopez-Llorca. 2009. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. New Phytologist 182:213-228.
 83. Magnani, G. S., C. M. Didonet, L. M. Cruz, C. F. Picheth, F. O. Pedrosa, and E. M. Souza. 2010. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. Genetics and Molecular Research 9:250-258.
 84. Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. Systematic and Applied Microbiology 15:593-600.
 85. Mendez, R., A. A. Pizzirani-Kleiner, W. L. Araujo, and J. M. Raaijmakers. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex Isolates. Applied and Environmental Microbiology 73:7259-7267.
 86. Mineo, L. 1990. Plant Tissue Culture Techniques, p. 151-174. In C.A. Goldman (ed.), Tested Studies for Laboratory Teaching.
 87. Mirza, M. S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, and K. A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. Plant and Soil 237:47-54.
 88. Montañez, A., C. Abreu, P. R. Gill, G. Hardarson, and S. M. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biology and Fertility of Soils 45:253-263.
 89. Morel, M. A., M. C. Ubalde, V. Braña, and S. Castro-Sowinski. 2011. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr (VI) -reducing agent with plant growth-promoting activity. Archives of Microbiology 193:63-68.
 90. Murashige, T., and F. Skooge. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15:473-497.
 91. Muthukumarasamy, R., M. Govindarajan, M. Vadivelu, and G. Revathi. 2006. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. Microbiological Research 161:238-245.

92. Njoloma, J. P., M. Oota, Y. Saeki, and S. Akao. 2005. Detection of *gfp* expression from *gfp*-labelled bacteria spot inoculated onto sugarcane tissues. *African Journal of Biotechnology* 4:1372-1377.
93. Njoloma, J., K. Tanaka, T. Shimizu, T. Nishiguchi, M. Zakria, R. Akashi, M. Oota, and S. Akao. 2006. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. *Biology and Fertility of Soils* 43:137-143.
94. Olivares, F. L. 1997. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infeccao e colonizacao de plantas de cana-de-acucar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do genero *Herbaspirillum*. *Ecologia. Tese de Doctor em Agronomia. UFRRJ*.
95. Olivares, F. L., V. L. D. Baldani, V. M. Reis, J. I. Baldani, and J. Dobereiner. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves , predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils* 21:197-200.
96. Oliveira, A. L. M., M. Stoffels, M. Schmid, V. M. Reis, J. I. Baldani, and A. Hartmann. 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology. Elsevier Masson SAS* 45:106-113.
97. Oliveira, A. L. M., S. Urquiaga, J. Döbereiner, and J. I. Baldani. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil* 242:205-215.
98. Oliveira, A. L. M., E. L. Canuto, S. Urquiaga, V. M. Reis, and J. I. Baldani. 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil* 284:23-32.
99. Olson, J. B., T. F. Steppe, R. W. Litaker, and H. W. Paerl. 1998. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology* 36:231-238.
100. Ozawa, T., A. Ohwaki, and K. Okumura. 2003. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from the surface-sterilized roots of some legumes. *Scientific Report of the Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University* 55:29-36.
101. Palaniappan, P., P. S. Chauhan, V. S. Saravanan, R. Anandham, and T. Sa. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp . *Biology and Fertility of Soils* 46:807-816.
102. Park, M.-J., M. K. Kim, H.-B. Kim, W.-T. Im, T.-H. Yi, S.-Y. Kim, N.-K. Soung, and D.-C. Yang. 2008. *Microbacterium ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:429-433.
103. Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann. 2004. Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms, p. 711-726. *In* G. Kowalchuk, F.J. de Bruijn, I.M. Head, A.D.L. Akkermans, and J.D. van Elsa (eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual* Second. Kluwer Academic, London.

104. Pernthaler, J., F. O. Glöckner, W. Schönhuber, and R. Amann. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes, p. 1-31. In J.H. Paul (ed.), *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*. Academic press, London.
105. Podolich, O. V., L. P. Ovcharenko, N. O. Kozyrovska, and A. M. Pirttila. 2009. Detection of *Methylobacterium radiotolerans* IMBG290 in potato plants by *in situ* hybridization. *Biopolymers and cell* 25:115-119.
106. Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, W. Ludwig, P. Jorg, and F. O. Glockner. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35:7188-7196.
107. Quadt-Hallmann, A., J. Hallmann, and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 43:254-259.
108. Quadt-Hallmann, A., and J. W. Kloepper. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology* 42:1144-1154.
109. Ramos, H. J. O., L. D. B. Roncato-Maccari, E. M. Souza, J. R. L. Soares-Ramos, M. Hungria, and F. O. Pedrosa. 2002. Monitoring Azospirillum-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology* 97:243-252.
110. Ramos, P. L., S. Van Trappen, F. Thompson, R. C. S. Rocha, H. R. Barbosa, P. De Vos, and C. A. Moreira-Hilfo. 2010. Screening for endophytic nitrogen-fixating bacteria in Brazilian sugarcane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:926-931.
111. Reinhold-Hurek, B., and T. Hurek. 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17:29-54.
112. Reinhold-Hurek, B., A. Krause, B. Leyser, L. Miché, and T. Hurek. 2007. The rice apoplast as a habitat for endophytic N₂-fixing bacteria., p. 427-443. In B. Sattelmacher, and W.J. Horst (eds.), *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*. Springer.
113. Reis Junior, F., V. M. Reis, L. Da Silva, and J. Dobereiner. 2000. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:985-994.
114. Reis, V. M., and F. L. Olivares. 2006. Vias de Penetração e Infecção de Plant as por Bactérias. EMBRAPA. Documentos 216.
115. Reis, V. M., F. L. Olivares, and J. Dobereiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10:401-405.

116. Reis, V., S. Lee, and C. Kennedy. 2007. Biological nitrogen fixation in sugarcane, p. 213 - 232. *In* C. Elmerich, and W.E. Newton (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Association*. Springer.
117. Reis, V. M., F. L. Olivares, A. L. M. de Oliveira, F. B. dos Reis Junior, J. I. Baldani, and J. Dobereiner. 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil* 206:205-211.
118. Rivas, R., E. Velázquez, A. Valverde, and E. Mateos, P F, Martínez-Molina. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22:1086-1089.
119. Roncato-Maccari, L. D. B., H. J. O. Ramos, F. O. Pedrosa, Y. Alquini, L. S. Chubatsu, M. G. Yates, L. U. Rigo, M. B. R. Steffens, and E. M. Souza. 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology* 45:39-47.
120. Rosenblueth, M., and E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837.
121. Rouws, L. F. M., C. Meneses, H. V. Guedes, M. S. Vidal, J. I. Baldani, and 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. *Letters in Applied Microbiology* 51:325-330.
122. Ruppel, S., J. Rühlmann, and W. Merbach. 2006. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative Real-Time PCR and online emission fingerprinting. *Plant and Soil* 286:21-35.
123. Ryan, R. P., K. Germaine, A. Franks, D. J. Ryan, and D. N. Dowling. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278:1-9.
124. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
125. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
126. Sarwar, M., and R. J. Kremer. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology* 20:282-285.
127. Schulz, B., and C. Boyle. 2006. What are Endophytes?, p. . *In* B. Schulz, C. Boyle, and T.N. Sieber (eds.), *Microbial Root Endophytes*. Springer, Berlin.
128. Schwab, S. 2006. Identificacao e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amonio. Tese de Doutor en Bioquímica. Universidade Federal de Paraná.
129. Sevilla, M., R. H. Burris, N. Gunapala, and C. Kennedy. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*- mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:358-366.

130. Shokri, D., and G. Emtiazi. 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogenfixing bacteria and its optimization by Taguchi design. *Current Microbiology* 61:217-225.
131. Silva-Froufe, L. G., R. M. Boddey, and V. M. Reis. 2009. Quantification of natural populations of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. in sugar cane (*Saccharum* spp.) using different polyclonal antibodies. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:866-878.
132. Soltis, P. S., and D. E. Soltis. 2003. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science* 18:256-267.
133. Souza, A. O., J. A. Pamphile, C. L. Rocha, and J. L. Azevedo. 2004. Plant-microbe interactions between maize (*Zea mays* L.) and endophytic microorganisms observed by Scanning Electron Microscopy. *Acta Scientiarum* 26:357-359.
134. Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, and J. Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67:257-268.
135. Sturz, A. V., B. R. Christie, and J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19:1-30.
136. Stuurman, N., C. Pacios Bras, H. R. Schlaman, a H. Wijfjes, G. Bloemberg, and H. P. Spaijk. 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1163-1169.
137. Suman, A., A. K. Shasany, M. Singh, H. N. Shahi, A. Gaur, and S. P. S. Khanuja. 2001. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17:39-45.
138. Sylvester-Bradley, R., N. Asakawa, S. L. A. Torraca, F. M. M. Magalhaes, L. A. Oliveira, and R. M. Pereira. 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica* 12:15-22.
139. Taghavi, S., C. Garafola, S. Monchy, L. Newman, A. Hoffman, N. Weyens, T. Barac, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology* 75:748-757.
140. Taghavi, S., D. van der Lelie, A. Hoffman, Y.-B. Zhang, M. D. Walla, J. Vangronsveld, L. Newman, and S. Monchy. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genetics* 6:e1000943.
141. Takle, G. W., I. K. Toth, and M. B. Brurberg. 2007. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Plant Biology* 9:1-9.
142. Tamura, K., J. Dudley, and S. Nei, MKumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
143. Tanaka, K., T. Shimizu, M. Zakria, J. Njoloma, Y. Saeki, M. Sakai, T. Yamakawa, K. Minamisawa, and S. Akao. 2006. Incorporation of a DNA sequence encoding Green Fluorescent

- Protein (GFP) into endophytic diazotroph from sugarcane and sweet potato and the colonizing ability of these bacteria in *Brassica oleracea*. *Microbes and Environments* 21:122-128.
144. **Texo, J. P., C. I. Bentancur, and J. P. Duque.** 2009. Perspectivas generales de desarrollo de la industria de los biocombustibles en el Uruguay. UdelaR.
 145. **Thaweenut, N., Y. Hachisuka, S. Ando, S. Yanagisawa, and T. Yoneyama.** 2010. Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. *Plant and Soil* 338:435-449.
 146. **Ulrich, K., A. Ulrich, and D. Ewald.** 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 63:169-180.
 147. **Urquiaga, S., K. Cruz, and R. Boddey.** 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal* 56:105-114.
 148. **Vasse, J., P. Frey, and A. Trigalet.** 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:241-251.
 149. **Vassilev, N., M. Vassileva, and I. Nikolaeva.** 2006. Simultaneous Psolubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:137-144.
 150. **Velázquez, E., M. Rojas, M. J. Lorite, R. Rivas, J. L. Zurdo-Piñeiro, M. Heydrich, and E. J. Bedmar.** 2008. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stems of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology* 48:118-124.
 151. **Verma, S. C., A. Singh, S. P. Chowdhury, and A. K. Tripathi.** 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters* 23:425-429.
 152. **Videira, S. S.** 2007. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA, Documentos 234.
 153. **Videira, S. S.** 2008. Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do género *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculacao em plantas de arroz. Tese de Mestre en Ciencias. UFRRJ.
 154. **Wakelin, S. A., R. A. Warren, P. R. Harvey, and M. H. Ryder.** 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* 40:36-43.
 155. **Weber, O. B., V. L. D. Baldani, K. R. S. Texeira, G. Kirchof, J. I. Baldani, and J. Dobereiner.** 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210:103-113.
 156. **Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, a D. Akkermans, and R. a Jefferson.** 1995. beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 141:1691-1705.

157. **Yilmaz, L. S., and D. R. Noguera.** 2004. Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in Fluorescent *In Situ* Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:7126-7139.
158. **van Loon, L. C., P. A. Bakker, and C. M. Pieterse.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**:453-483.