



PEDECIBA
MEC-UDELAR



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



**“Caracterización de la interacción
entre *Streptomyces* sp. UYFA156 y el
holobionte *Festuca arundinacea*”**

Tesis de Maestría

PEDECIBA Biología, subárea Microbiología

Lic. Belén Fernández

Tutora: Dra. Patricia Vaz

**Co-tutores: Dr. Federico Battistoni
y Dr. Federico Rosconi**

AGRADECIMIENTOS

A Pato, por ser una excelente tutora y compañera de laboratorio, por todos los conocimientos transmitidos, y por la buena onda para afrontar diariamente las cosas. Pero por sobre todas las cosas, gracias por su calidez humana y el espíritu inquebrantable que contagia.

A Rosconi, quien me recibió en Boston y me hizo el aguante durante mi pasantía, lo cual no es tarea fácil. Una gran persona e investigador, quien me transmitió un riguroso y exhaustivo enfoque en el trabajo de laboratorio.

A Battistoni agradezco la oportunidad de haber formado parte del grupo de trabajo, formándome en un área que tanto llegue a querer como es la interacción planta microorganismo.

A todos los compañeros del Departamento de Bioquímica Y Genómica Microbiana, Microbiología Molecular y Laboratorio de Ecología Microbiana por los muchos almuerzos compartidos y charlas de pasillos que hicieron del día a día mucho más disfrutable. Por todos los consejos, recomendaciones e ideas y por siempre estar dispuestos a prestar el oído frente a los problemas del otro. A todos los integrantes del laboratorio de Tim Van Opijnen en Boston, EEUU, quienes me recibieron con gran calidez humana y siempre estuvieron a disposición ante cualquier duda. Especialmente a Juance, quien me guio, me prestó su oído y me acompañó durante mi pasantía.

A mi familia y amigos, por ser ese apoyo incondicional que todos necesitamos, compartiendo tanto las cosas buenas como las malas. Un agradecimiento muy especial a mi madre, sin quien esto habría sido una historia completamente diferente. Gracias por el aguante, desde tener un plato de comida cada vez que llegaba agotada, a escucharme y aconsejarme cada vez que tenía algún problema.

INDICE

Tabla de contenido

Contenido

Contenido.....	3
RESUMEN	6
CAPÍTULO 1	7
HOLOBIONTE	7
INTERACCIÓN PLANTA-ENDÓFITO	7
INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA	8
DIÁLOGO MOLECULAR PLANTA - ENDÓFITO	9
PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL POR BACTERIAS ENDÓFITAS	10
REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL O FITOESTIMULANTES	11
BIO-FERTILIZACIÓN	12
CONTROL BIOLÓGICO	13
INDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA EN PLANTAS.....	14
EL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	14
GENOMA DE <i>STREPTOMYCES</i> Y SU USO TAXONÓMICO	16
SECUENCIACIÓN DE ARN.....	17
ANTECEDENTES DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.....	19
HIPÓTESIS GENERAL.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
CAPÍTULO 2	22
2.1 ANTECEDENTES	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.3.1 Cuantificación de la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156 en los tejidos internos de plantas de festuca.....	22
2.3.2 Análisis de la colonización de los tejidos internos de plantas de festuca por la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156 mediante microscopía confocal	23
2.4 RESULTADOS	25
2.4.1 Colonización de la cepa UYFA156 en los tejidos internos de los cultivares de festuca SFRO. Don Tomás y Tacubé	25

2.4.2 Estudio de la colonización de los tejidos internos de ambos cultivares de festuca por la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156 mediante microscopía confocal.....	26
2.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	27
CAPÍTULO 3	30
3.1 ANTECEDENTES	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.3.1. Extracción y purificación de ADN genómico de la cepa <i>Streptomyces</i> sp. UYFA156.	31
3.3.2 Purificación del ADNg.....	31
3.3.3 Cuantificación y secuenciación del ADNg	31
3.3.4 Análisis del genoma de la cepa <i>Streptomyces</i> sp. UYFA156	32
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO 4	37
4.1 ANTECEDENTES	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.3.1. Evaluación del crecimiento de bacterias endofíticas nativas aisladas de plantas de festuca en presencia de la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156.	38
4.3.2 Análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156 sobre el crecimiento de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68 en medio líquido	39
4.3.3. Análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156, sobre la producción de auxinas por la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68.....	40
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.4.1 Efecto de la cepa UYFA156 sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de otros componentes de la microbiota endofítica asociada a festuca	40
4.4.2 Análisis del efecto del sobrenadante del medio de cultivo de la cepa UYFA156 sobre el crecimiento de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68.	42
4.4.3. Análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de la cepa UYFA156 sobre la producción de auxinas por la cepa UYFA68	44
CAPÍTULO 5	46
5.1 ANTECEDENTES	46
5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	46
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
5.3.1 Diseño experimental del ensayo de transcriptómica.....	46
5.3.1.2 Extracción de ARN total.....	47

5.3.1.3 Preparación de las librerías de ARN para su secuenciación.....	48
5.3.1.4 Remoción de enzimas y buffers de las muestras	49
5.3.1.5 Ligación de códigos de barra	50
5.3.1.6 Formación de <i>pools</i>	50
5.3.1.7 Remoción del ARNr	50
5.3.1.8 Síntesis de ADN copia (ADNc)	51
5.3.1.9 Degradación del ARN	51
5.3.1.10 Ligación de adaptador 3Tr3.....	51
5.3.1.11 Reacción de PCR para la secuenciación de las librerías	52
5.3.1.12 Verificación del producto obtenido y secuenciación	52
5.3.2 Análisis bioinformático de los transcriptomas obtenidos.....	52
5.3.3 Extracción de ADNg de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68, purificación y secuenciado..	53
5.3.4 GhostKoala	54
5.4. RESULTADOS	54
5.4.1. Análisis genómico de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68.....	54
5.4.2. Análisis genómico preliminar de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68.....	54
5.4.3. Perfil transcripcional de la cepa <i>Microbacterium</i> sp. UYFA68 crecida en presencia del sobrenadante de la cepa <i>S. albidoflavus</i> UYFA156.	56
5.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	61
CAPÍTULO 6	64
ANEXO	66
BIBLIOGRAFÍA	74

RESUMEN

Festuca arundinacea (Festuca) es una gramínea forrajera perenne invernal introducida en muchas partes del mundo por su alta productividad y persistencia. En nuestro país, esta especie se siembra en más del 70% del área de praderas artificiales, empleándose como forraje para ganado. La cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 fue aislada del interior de semillas de *F. arundinacea* cultivar SFRO Don Tomás, y demostró ser promotora del crecimiento vegetal (PCV) en su hospedero natural, pero no en la variedad comercial Tacuabé. La hipótesis de este trabajo es que la inoculación de la cepa UYFA156 provoca la PCV en su hospedero natural indirectamente, mediante la alteración estructural y fisiológica de la microbiota endofítica bacteriana asociada. El objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de las bases moleculares imperantes en la interacción *F. arundinacea* - *Streptomyces* UYFA156 - microbiota endofítica desencadenantes de la PCV del hospedero. Mediante microscopía confocal y recuento bacteriano se determinó que la cepa UYFA156 es un endófito verdadero de los cultivares SFRO Don Tomás (interacción compatible: PCV) y Tacuabé (interacción incompatible: no PCV). El genoma de la cepa UYFA156 fue secuenciado, anotado y analizado, determinándose que pertenece a la especie *S. albidoflavus*. En el genoma se identificó un alto número de genes codificantes para metabolitos secundarios, lo cual es uno de los principales rasgos de las bacterias del género *Streptomyces*. A su vez, se evaluó el efecto modulador de la cepa UYFA156 sobre otros miembros de la microbiota de festuca en ensayos en placa, y mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S. Los resultados mostraron que la inoculación con la cepa UYFA156 provoca cambios en la diversidad y riqueza de las comunidades endofíticas de manera diferencial según el cultivar, y afecta el crecimiento de otras cepas endofitas de festuca. Por último, mediante ensayos bioquímicos y transcriptómicos se evaluó el efecto de la presencia de la cepa UYFA156 sobre la fisiología y la expresión génica de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, también aislada del cultivar SFRO Don Tomás, productora de auxinas y PCV en ese cultivar la cual es utilizada como modelo para representar los efectos de la cepa UYFA156 sobre la microbiota endofítica de plantas de festuca. Los resultados mostraron que el sobrenadante del medio de cultivo de la cepa UYFA156 estimula significativamente la producción de auxinas en la cepa UYFA68. A su vez, estudios de transcriptómica en idénticas condiciones mostraron cambios en la expresión génica de la cepa UYFA68 por la presencia de UYFA156. Los estudios realizados a lo largo de esta tesis permitieron una mayor comprensión del sistema *F. arundinacea* – *Streptomyces* UYFA156-microbiota y los mecanismos subyacentes en la promoción del crecimiento vegetal en este sistema. En suma, en este trabajo se presentan evidencias de modulación del resto de la microbiota por parte de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156, lo cual abre nuevas preguntas tanto a nivel de la bioquímica como de la ecología y evolución del sistema. Estudios posteriores podrían apuntar a identificar las señales producidas por la cepa UYFA156 que llevan a los cambios fisiológicos y ecológicos observados.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

HOLOBIONTE

En los últimos años, se ha demostrado que las plantas, así como otros macroorganismos, se encuentran compuestos por varios organismos, tanto macro como micro, que coexisten entre sí y dan forma a los fenotipos que se observan macroscópicamente (Vaz Jauri et al. 2022). Por tanto, se ha definido el término holobionte para referirse a un organismo huésped junto a todos sus microorganismos asociados (Rosenberg et al. 2007), (Baedke et al. 2020). Este concepto cambia revolucionariamente la forma en que se estudian los organismos vivos, dando mayor prioridad al estudio de las plantas en conjunto con sus organismos asociados.

Los microbios beneficiosos median las respuestas del holobionte de la planta al estrés abiótico y biótico y permiten que el holobionte de la planta se adapte a las variaciones ambientales. La planta hospedera puede entonces modificar la abundancia y composición de especies microbianas beneficiosas dentro del microbioma, al menos en parte, mediante la secreción de compuestos bioquímicos (Vandenkoornhuyse et al. 2015).

INTERACCIÓN PLANTA-ENDÓFITO

El término endófito refiere a aquellos microorganismos capaces de ser aislados o extraídos de tejidos de plantas esterilizadas en su superficie y que no causan un daño aparente en la misma (Gouda et al. 2016). Posteriormente se definió como endófitos "verdaderos", aquellos que no solo son aislados de tejidos estériles, sino que además se evidencia su presencia dentro de los tejidos mediante técnicas de microscopía (Reinhold-Hurek and Hurek 1998). Por último, los endófitos deben cumplir también el postulado de Koch, pudiendo re-infectar al hospedero en caso de la inoculación de las plantas con los mismos (Raaijmakers et al. 2009), (Segre 2013). Estos endófitos cumplen un rol fundamental en la salud vegetal de las plantas, siendo parcialmente responsables del fenotipo observado.

La colonización de raíces por bacterias endófitas consta de varias etapas. En la etapa inicial, las bacterias se trasladan a las raíces de las plantas de forma pasiva a través de los flujos de agua del suelo o de forma activa a través de la inducción específica de la actividad flagelar por parte de los compuestos liberados por las plantas. Luego, se lleva a cabo la adsorción no específica de bacterias a las raíces, seguida por el anclaje (tercer paso), lo que da como resultado la unión firme de bacterias a la superficie de la raíz. Pueden surgir interacciones complejas entre la bacteria y la planta

hospedera, incluida la secreción de exudados de raíces, que pueden resultar en la inducción de la expresión génica bacteriana (cuarto paso). Posteriormente, las bacterias endófitas (quinto paso) pueden ingresar a su planta huésped en los sitios de daño tisular, que surgen naturalmente como resultado del crecimiento de la planta (formación de raíces laterales), o a través de los pelos radiculares y en las conjunciones epidérmicas (Sprent and de Faria 1988), (Badri et al. 2009).

Las bacterias endófitas presentan un comportamiento similar al de bacterias patógenas, en lo que refiere a sus mecanismos de infección y tejidos a colonizar. Dadas estas similitudes, varios autores han buscado características únicas que permitan diferenciar una bacteria patógena de una endofítica. A pesar de poseer características comunes, la diferencia radica en los mecanismos de expresión, regulación de su expresión génica y los mecanismos de comunicación molecular con la planta (López-Fernández et al. 2015). Esto deja al descubierto que la interacción planta-microorganismo es compleja y multifactorial.

Las bacterias endofíticas se encuentran en un nicho ecológico favorable en relación a las bacterias presentes en el suelo. Existe una menor competencia con otros microorganismos, menor estrés ambiental y facilidad para la adquisición de nutrientes. A su vez, se establece un diálogo molecular más directo con la planta, permitiendo un mayor provecho de sus efectos beneficiosos en relación a aquellas bacterias que se encuentran en las proximidades de la raíz (bacterias rizosféricas) (Carvalho et al. 2016).

INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

La gran mayoría de las plantas se encuentran en íntima asociación con los microorganismos. A este conjunto de microorganismos asociados a la planta se le denomina microbiota (Figura 1.1). Particularmente las asociaciones planta-bacteria pueden ser de tipo patogénicas, sinérgicas, neutras o simbióticas. En el caso de una interacción mutualista, ambos organismos se ven beneficiados. Esta interacción se encuentra fundamentalmente en las raíces de las plantas, donde se encuentra una mayor abundancia de microorganismos. En este contexto de interacción, se puede dar una facilitación de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y hierro por parte de la comunidad bacteriana, mientras que la planta provee un ambiente controlado de crecimiento y supervivencia para las bacterias. Por tanto, la microbiota presenta un rol fundamental en la productividad y salud vegetal (Gouda et al. 2016). Actualmente, muchos laboratorios a lo largo del mundo tienen como objetivo el análisis de dichas comunidades asociadas a las plantas, dado que su manipulación podría permitir un aumento de la producción agrícola mediante el control de enfermedades y la facilitación de nutrientes; reduciendo la incorporación de fertilizantes químicos a la tierra, con los efectos negativos a nivel ambiental que esto conlleva (Turner et al. 2013).

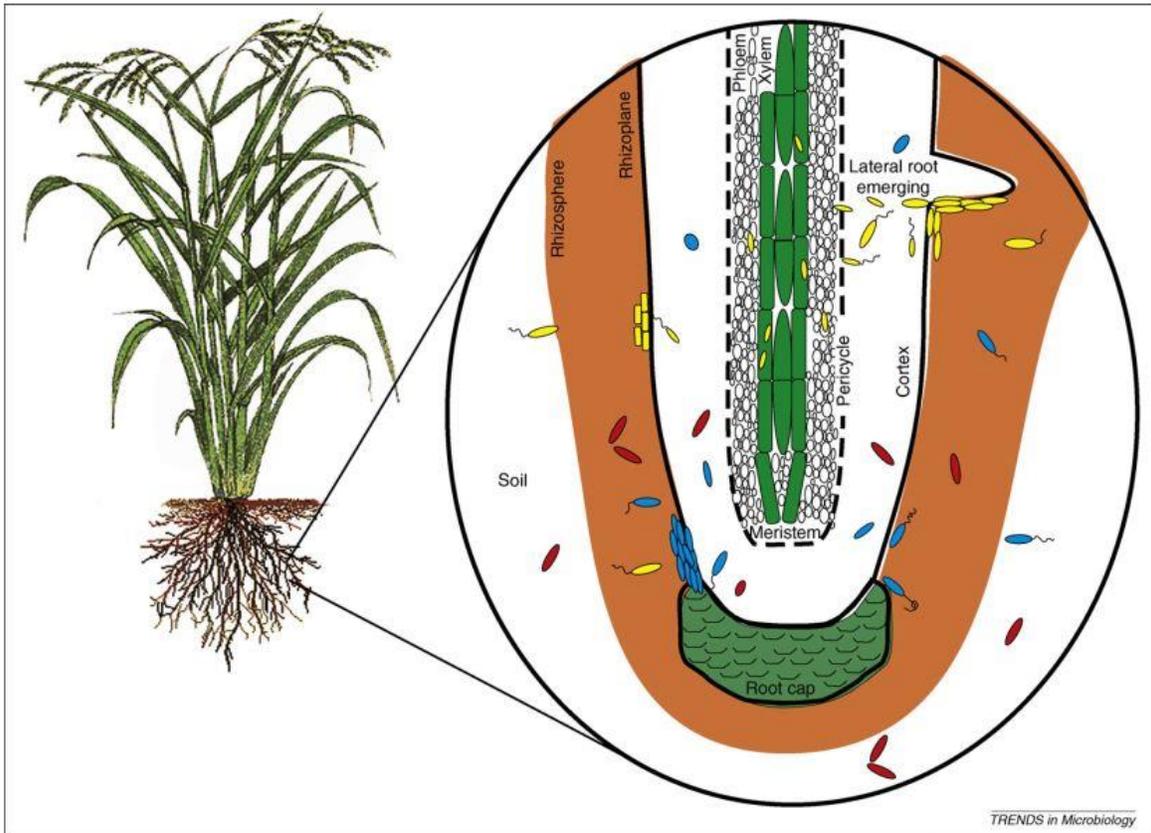


Figura. 1.1 Mecanismos de colonización de las raíces de las plantas por parte de bacterias que alcanzan la raíz en forma estocástica (en rojo), bacterias oportunistas atraídas hacia la raíz por señales quimiotácticas (en azul) y bacterias endofíticas (en amarillo) las cuales tienen la capacidad de colonizar activamente los tejidos internos de la planta. Extraído de Hardoim et al. 2008.

DIÁLOGO MOLECULAR PLANTA - ENDÓFITO

Existe una creciente demanda de métodos que permitan la fertilización del suelo minimizando los efectos negativos de los agroquímicos convencionales, como lo son la eutrofización de los cursos de agua cercanos (Adesemoye and Kloepper 2009). Es por este motivo que en la actualidad se investiga a nivel mundial a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados a cultivos de interés agronómico y los mecanismos genéticos involucrados en estas interacciones.

El término “diálogo molecular” entre plantas y microorganismos fue originalmente acuñado por Jean Denaire en 1993 para hacer referencia al intercambio de señales químicas que conduce a la infección de los pelos radiculares y a la formación de nódulos radiculares en las leguminosas por parte de rizobios (Denaire et al. 1993). Este tipo de interacción involucra dos grupos principales de moléculas: los flavonoides inductores del gen *nod* de las bacterias y el lipoquitooligosacárido

(Cooper 2007). Sin embargo, poco se sabe de las interacciones de las plantas con otros microorganismos, como las micorrizas arbusculares o las bacterias endófitas.

Se demostró que la estructura de la comunidad de bacterias endófitas se ve fuertemente afectada por la especie de la planta, incluso hasta el nivel de cultivar (Ulrich et al. 2008), lo que apunta a la existencia de asociaciones específicas entre los endófitos y su planta huésped (Taghavi et al. 2009). A pesar de esto, se han identificado algunas bacterias promiscuas en lo que respecta a la colonización de plantas hospedadas y los efectos beneficiosos de las plantas. Este es el caso de *Burkholderia cepacia* Bu72, que se aisló de *Lupinus luteus*, pero también mejoró significativamente la producción de biomasa de un cultivar de álamo (Badri et al. 2009).

Por lo tanto, aún queda mucho por dilucidar respecto a las señales moleculares que median la interacción planta – bacteria (Dong et al. 2003). El conocimiento de genes involucrados en la interacción planta – endófito y su regulación, es de vital importancia para el desarrollo de nuevas estrategias en el campo de la bio-fertilización con este grupo de microorganismos.

Comprender cómo interactúa la microbiota como comunidad también es una herramienta que ayuda a predecir cómo reacciona esa comunidad al cambio y cómo ese cambio afectará al hospedero. Sin embargo, analizar los componentes de la microbiota por separado puede ser difícil, precisamente porque sus intrincadas relaciones dificultan la modificación de un solo componente sin afectar a los demás. Para sobreponerse a estas dificultades, es posible la eliminación dirigida de un grupo de microorganismos o de una cepa en particular. También es posible abordar esta problemática mediante el crecimiento *in vitro* de cepas aisladas a partir de la microbiota. Esto permite el estudio de la interacción entre cepas que pueden resultar claves en la interacción con el hospedero (Romero et al. 2019).

PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL POR BACTERIAS ENDÓFITAS

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PCV) se pueden clasificar en directos, como la biofertilización y la producción de fitohormonas, o indirectos, como es el caso del control de organismos patógenos (biocontrol) y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas (Figura 1.2).

La capacidad de PCV de algunas bacterias endófitas ha llevado a la búsqueda de herramientas biotecnológicas para el cuidado del medio ambiente, buscando la minimización del impacto de la agricultura en los ecosistemas. Para esto, en los últimos años se han aislado microorganismos de suelos, agua y plantas, y se han evaluado sus características PCV asociadas a las plantas.

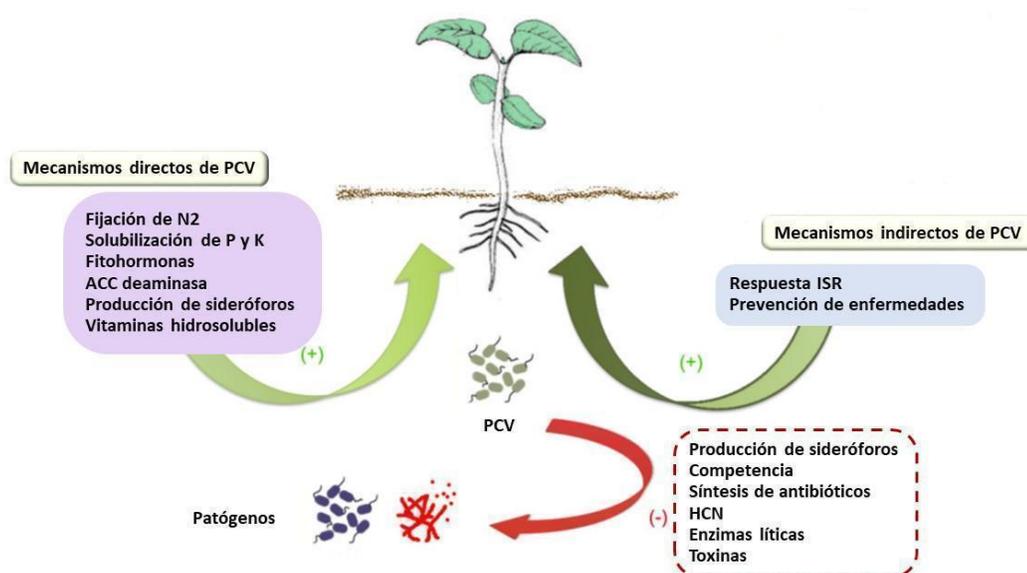


Figura 1.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por bacterias, agrupadas de acuerdo a mecanismos de acción directos y mecanismos indirectos sobre la planta. Modificado de (García-Fraile et al. 2015).

REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL O FITOESTIMULANTES

Muchas bacterias endófitas producen fitohormonas, moléculas capaces de modular el crecimiento vegetal. La capacidad de sintetizar fitohormonas se considera la principal característica promotora del crecimiento vegetal en bacterias (Egamberdieva et al. 2017). Entre las fitohormonas más frecuentemente producidas por bacterias están las auxinas, giberelinas y citoquininas. Asimismo, muchas bacterias endófitas son capaces de regular los niveles de etileno producidos por la planta mediante la secreción de enzimas (Gamalero and Glick 2011).

Una de las fitohormonas más estudiadas es la auxina ácido indol-acético (AIA). Dicha auxina, afecta la división, extensión y diferenciación celular vegetal; estimula la germinación de semillas; aumenta la tasa de desarrollo del xilema y las raíces, e inicia la formación de raíces laterales y adventicias. Asimismo, afecta la fotosíntesis, la formación de pigmentos, la biosíntesis de varios metabolitos, así como la resistencia a condiciones de estrés (Glick 2012). El AIA puede ser sintetizado mediante seis vías diferentes, cinco de ellas dependientes de triptófano, el cual es secretado por la planta (Spaepen et al. 2007). Estas vías incluyen: la vía del ácido indol pirúvico, la vía del indol-acetamida, la vía del indol-acetaldoxima, la vía del indol-acetonitrilo, la vía del indol-acetaldehído y la vía de la triptamina (Olanrewaju et al. 2017). (Figura 1.3).

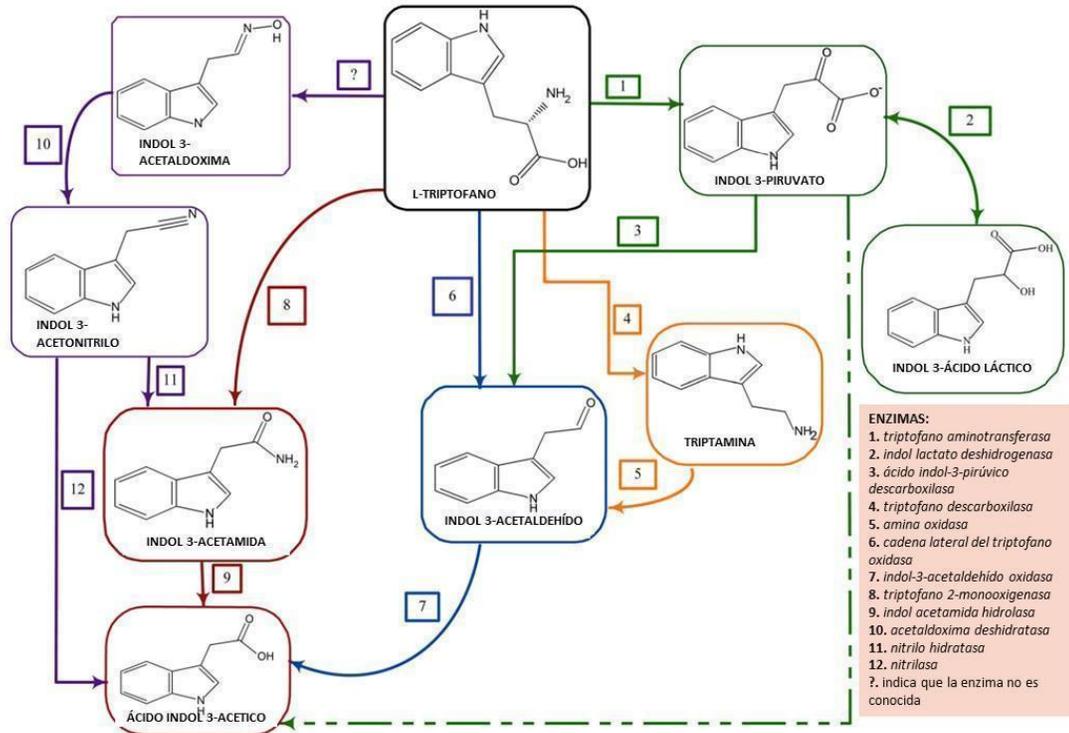


Figura 1.3. Representación esquemática de las vías conocidas de síntesis de AIA en bacterias. Los diferentes colores representan diferentes vías. Las líneas punteadas representan reacciones no enzimáticas. Modificado de (Olanrewaju et al. 2017).

Por otro lado, se considera como fito-estimulación a la regulación del desarrollo radicular mediante la producción de compuestos volátiles como pueden ser el óxido nítrico, la acetoína o el butanodiol (Sharifi and Ryu 2018). Esta regulación del desarrollo vegetal se observa a nivel de la quiescencia celular, la germinación de las semillas, la formación de las raíces, la floración, la ramificación y la maduración de los frutos, influyendo en la resistencia de las plantas a factores ambientales (Taulé 2018).

BIO-FERTILIZACIÓN

Las bacterias pueden tener también un rol como biofertilizantes al transformar nutrientes y minerales como N, P, K y Fe, a formas biodisponibles para las plantas. Esto es de suma importancia en la agricultura, donde se utilizan fertilizantes químicos para un mayor rendimiento agrícola. Estos fertilizantes químicos son agregados en exceso y solo el 50 % de la cantidad suministrada puede ser asimilada por las plantas. El resto se pierde por escorrentía y lixiviación, contaminando cursos de agua lo cual conlleva a graves problemas ambientales (Adesemoye and Kloepper 2009).

El nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de la mayoría de las biomoléculas y el principal nutriente limitante en el crecimiento de las plantas (Azziz et al. 2012). Se encuentra en su mayoría

en la atmósfera en forma de N_2 , siendo la mayor parte de los organismos vivos incapaces de asimilar el nitrógeno en esta forma. Sin embargo, en el proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN), el N_2 es reducido a amonio (NH_4^+) por parte de un grupo de procariontes denominados diazótrofos. De esta forma, el nitrógeno atmosférico se vuelve disponible para otros organismos incapaces de llevar a cabo la FBN, aportando un 60% del total de nitrógeno fijado en el ciclo del N (Valdez et al. 2016).

El fósforo es otro de los elementos esenciales que son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, constituyendo aproximadamente el 0,2% del peso seco de la planta (Alori et al. 2017). En promedio, el contenido de fósforo del suelo es de aproximadamente 0,05 % (p/p), sin embargo, solo el 0,1% del mismo está disponible para uso vegetal (Zhu et al. 2011). Existen bacterias capaces de aumentar la biodisponibilidad del fósforo en el suelo mediante dos posibles mecanismos (Zeng et al. 2016). El primero de ellos es la solubilización de fosfato inorgánico a partir de fosfato de calcio, hierro o aluminio. Este proceso es posible gracias a la liberación de ácidos orgánicos con capacidad de quelar el calcio, hierro o el aluminio. El otro mecanismo posible para la solubilización de fosfatos es la mineralización del fosfato orgánico, proceso en el cual se liberan iones ortofosfatos. Este proceso requiere de la hidrólisis por fosfatasas, las cuales son producidas como parte del metabolismo de algunas bacterias del suelo (Khavkin 2021).

Finalmente, el hierro es un elemento que a pH neutro o alcalino se encuentra poco biodisponible, dado que se encuentra mayormente en forma de hidróxidos insolubles. Algunas de las bacterias presentes en la rizósfera son capaces de producir y excretar compuestos quelantes del hierro, conocidos como sideróforos, en respuesta a la baja concentración de hierro disponible (Colombo et al. 2014). Esto permite la internalización del hierro mediante receptores de membrana externa capaces de reconocer específicamente el complejo sideróforo- Fe^{3+} (Taulé 2018). Esto actúa como un mecanismo directo de promoción del crecimiento vegetal biodisponibilizando el hierro presente en suelo, o como mecanismo indirecto mediante el control biológico de otros microorganismos patógenos para la planta, mecanismo que se detalla a continuación.

CONTROL BIOLÓGICO

El término control biológico refiere a la protección de una planta frente a un patógeno por medio de un organismo vivo o sus derivados, evitando así el establecimiento de un estado de enfermedad en la planta (Thomashow 1996). En este sentido puede establecerse una competencia tanto por nutrientes, como ser C, N, P, Fe, espacio, H_2O , O_2 , luz, entre muchos otros (Lugtenberg et al. 2013). Otro mecanismo que puede establecer el organismo bio-controlador es la producción de metabolitos secundarios tóxicos, como es el caso de las bacteriocinas y los antibióticos, inhibiendo

así el crecimiento de patógenos de la planta, estrategia frecuentemente utilizada para el control biológico de nematodos u hongos fitopatógenos de planta (Tian et al. 2007).

INDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA EN PLANTAS

El término resistencia sistémica inducida en plantas refiere al estado de resistencia desencadenado por inductores biológicos o químicos, el cual protege frente a futuros ataques de microbios patógenos e insectos herbívoros (Induced systemic resistance by beneficial microbes). Como indica su nombre, la resistencia sistémica inducida se caracteriza por una expresión no solo local en el sitio de inducción, sino también sistémicamente en partes de la planta que están espacialmente separadas del inductor (Pieterse et al. 1998b).

El sistema inmunológico de las plantas posee receptores de reconocimiento de patrones (PRR: *pattern recognition receptors*) los cuales han evolucionado para reconocer compuestos microbianos comunes, como la flagelina bacteriana o quitina fúngica, denominados patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMP o MAMP: *pathogen associated molecular patterns* y *microbial associated molecular patterns*, respectivamente) (Boller and Felix 2009), (Raaijmakers et al. 2009). A su vez, las plantas también responden a señales endógenas consecuencia del daño causado por la invasión enemiga, llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMP: *damage associated molecular patterns*) (Boller and Felix 2009). El reconocimiento de patrones se traduce en una primera línea de defensa llamada inmunidad activada por PAMP (PTI), que mantiene a la mayoría de los posibles invasores bajo control (Boller and Felix 2009). La resistencia inducida está regulada por una red de vías de señalización interconectadas en las que las hormonas vegetales como el ácido jasmónico y el etileno desempeñan un papel regulador importante (Pieterse et al. 2012), (Pieterse et al. 1998).

EL GÉNERO *STREPTOMYCES*

Streptomyces es un género del orden Actinomycetales ampliamente estudiado por su capacidad de producción de metabolitos secundarios, pero menos estudiado como parte de la microbiota del suelo, donde las bacterias de este género representan una alta proporción del total. Son bacterias Gram-positivas aerobias y sumamente versátiles en el número de compuestos orgánicos capaces de utilizar como fuente de carbono y energía. Son microorganismos sumamente diversos en morfología y tamaño. Una particularidad que tienen estas bacterias es que tienen una forma de crecimiento

filamentoso y forman esporas. El ciclo de vida de *Streptomyces* comienza como esporas hidrofóbicas, uninucleadas y resistentes a la desecación. Estas características permiten su fácil diseminación en agua, viento y por eucariotas móviles como nematodos y artrópodos del suelo (Lapaz 2019). Dichas esporas germinan y crecen, dando lugar a un micelio vegetativo ramificado (Chater 1972). El crecimiento del micelio se da tanto a nivel apical como a nivel de ramificaciones, hasta que señales ambientales tales como la privación de nutrientes detiene el crecimiento micelar y se activa el desarrollo de estructuras esporogénicas denominadas micelio aéreo (Loria et al. 2006). Dichos micelios aéreos desarrollan septos y los núcleos se dividen en esporas uni-genómicas, cerrando así el ciclo de vida de *Streptomyces* (Loria et al. 2006) (Figura 1.4).

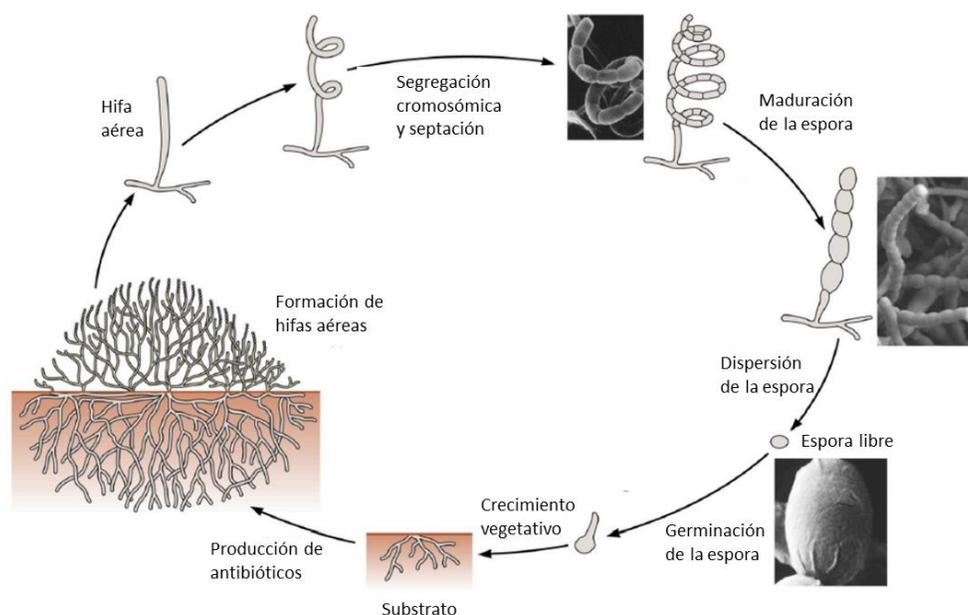


Figura 1.4 Representación esquemática del ciclo de vida de *Streptomyces*. El ciclo de vida de *Streptomyces* comienza por la germinación de la espora. Esto es seguido de su crecimiento a partir de la punta de la hifa, formando una densa red de hifas ramificadas asociadas al sustrato, las cuales posteriormente se elevan en el aire. Por último, las hifas aéreas se diferencian en cadenas de exoesporas, las cuales continúan el ciclo de crecimiento. Modificado de (Ait Barka et al. 2016).

A la fecha existen alrededor de 800 especies descritas de *Streptomyces*. Son ubicuas en el suelo, han sido aisladas de sedimentos marinos y, en menor frecuencia, de plantas y animales. Los suelos agrícolas contienen aproximadamente 10^6 - 10^7 ufc/gramo de suelo (Janssen 2006), representando una significativa proporción (1/100 – 1/1000) de la población microbiana del suelo agrícola, la cual se estima en 10^9 ufc por gramo. El suelo es un ambiente hostil y competitivo para los microorganismos. Para la supervivencia en este medio es necesario ser capaz de tolerar condiciones de temperatura y humedad extremas, resistir una amplia gama de productos antimicrobianos producidos por otros organismos, y tener estrategias que permitan la competencia por nutrientes. El éxito de *Streptomyces* en este entorno se atribuye a la amplia gama de enzimas catabólicas

producidas, capaces de degradar polímeros biológicos complejos (Loria et al. 2006), siendo actores claves en el ciclo de varios nutrientes. Además, los *Streptomyces* también producen una amplia variedad de enzimas con aplicaciones en la industria entre los cuales encontramos proteinasas, glucosil-hidrolasas y reguladores del crecimiento de las plantas (Chater 1972). A nivel de la medicina, el género *Streptomyces* ha sido fuente de una gran variedad de compuestos antimicrobianos, anti-fúngicos, agentes inmunosupresores y compuestos anticancerígenos (Hwang et al. 2014).

GENOMA DE *STREPTOMYCES* Y SU USO TAXONÓMICO

El genoma de los organismos del género *Streptomyces* es sumamente particular. No solo destacan por poseer un cromosoma lineal de gran tamaño, aproximadamente 8,5 – 12 MB, sino también por poseer un elevado contenido G+C, de entre 67-78% (Law et al. 2018), (Bao and Cohen 2003). La región central del cromosoma se encuentra enriquecida en genes involucrados en funciones metabólicas esenciales, encontrándose a cada extremo del cromosoma genes asociados a la producción de metabolitos secundarios (Lee et al. 2010), (Loria et al. 2006). Estas características parecen facilitar la flexibilidad del genoma. En la región central del cromosoma, se encuentra un origen de replicación central (OriC) y los extremos contienen secuencias repetidas e invertidas presumiblemente involucradas en la finalización de la replicación (Huang et al. 1998).

Estudios genómicos de *Streptomyces* revelan, en promedio, la presencia de más de 20 *clusters* de genes de metabolitos secundarios que codifican para la biosíntesis de poliquetidos por parte de las poliquetido sintetasas (PKS), péptidos por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS, por su sigla en inglés), bacteriocinas, terpenoides, aminoglucósidos y otros productos naturales (Lapaz 2019). En muchas ocasiones, estas secuencias se encuentran flanqueadas por repetidos inversos, secuencias de inserción o sitios de integración de fagos, lo cual sugiere su transferencia horizontal entre organismos del género (Ohnishi et al. 2005).

A su vez, es frecuente la presencia de plásmidos de gran tamaño, tanto circulares como lineales, contribuyendo a la adaptabilidad de este género a condiciones diversas, al facilitar la transferencia horizontal de genes (Loria et al. 2006).

El género *Streptomyces* es sumamente estudiado, sobre todo como consecuencia de su alta producción de metabolitos secundarios. Los mismos presentan diversos efectos, siendo en la actualidad más de 10.000 los compuestos bioactivos derivados de bacterias de este género (Law et al. 2018). Los principales metabolitos secundarios producidos por bacterias del género *Streptomyces* con aplicaciones en la industria son aquellos utilizados como antibióticos. La producción de

antibióticos por parte de cepas de *Streptomyces* fue descubierta en la década de los cuarenta, volviendo este género bacteriano uno de los más estudiados.

Streptomyces es un género que comprende una gran diversidad y número de especies, conteniendo 980 especies y 55 subespecies en la actualidad según www.bacterio.net (Lapaz, 2019). Clásicamente, el ISP (International *Streptomyces* Project) recomienda la clasificación y caracterización de *Streptomyces* en base principalmente a criterios fenotípicos (Lee et al. 2014, Rong et al. 2009). En la actualidad, la clasificación a nivel de género en *Streptomyces* se basa en la secuenciación del fragmento V3-V4 del gen codificante para el ARN 16S (Ait Barka et al. 2016), (Urem et al. 2016), (Labeda 2011). Sin embargo, este gen posee poco poder resolutivo a nivel de especie para organismos de este género. La información obtenida a partir de la secuencia del gen ARN 16S puede ser complementada con secuencias de genes codificantes para proteínas *housekeeping*, los cuales han demostrado mejorar la resolución filogenética entre especies estrechamente relacionadas (Kim et al. 2004). El método de hibridación ADN-ADN (DDH, por su sigla en inglés) continúa siendo el método *gold standard* para la clasificación taxonómica a nivel de especie (Hatano et al. 2003). Sin embargo, es un método tedioso y difícil de estandarizar. Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y la creciente disponibilidad de genomas, es posible la clasificación de microorganismos en base al Average Nucleotide Identity (ANI, por su sigla en inglés) o mediante la simulación del ensayo DDH. El ANI es un algoritmo que implica la fragmentación de las secuencias del genoma de interés, seguida de la búsqueda de la secuencia de nucleótidos homólogos, el alineamiento y el cálculo de la identidad (Ha et al. 2017), (Brover et al. 2018). Se considera que dos genomas pertenecen a la misma especie si el valor de ANI es superior al 96% (Brover et al. 2018).

SECUENCIACIÓN DE ARN

La secuenciación del ARN (RNAseq) es una estrategia para la obtención de perfiles transcriptómicos mediante tecnologías de secuenciación profunda (Wang et al. 2009). Se basa en el principio de que, mediante la secuenciación de las moléculas de ADNc, es posible relacionar el nivel de expresión de un transcrito con el número de lecturas asignadas al mismo. De esta manera, el RNAseq proporciona una medida absoluta de la presencia y abundancia de transcritos génicos nuevos y conocidos, con un alto poder de resolución, permitiendo el análisis de los niveles de expresión génica entre múltiples muestras. Por todo esto, el RNAseq se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para el análisis transcriptómico.

El auge de RNA-seq ha sido posible gracias a la introducción de diferentes tecnologías denominadas como de Siguiete Generación de Secuenciación (NGS, por su sigla en inglés), lo cual permitió el análisis masivo de diferentes secuencias de ADN (Wang et al. 2009). Estas plataformas han permitido la generación de enormes volúmenes de datos de forma relativamente sencilla.

La obtención de transcriptomas completos ha permitido una mayor y más completa comprensión de aspectos cualitativos y cuantitativos de la expresión génica en procariotas y eucariotas permitiendo, por tanto, una mayor comprensión de los procesos biológicos, como es el caso de la interacción planta-microorganismo o las interacciones entre diferentes componentes de la microbiota.

La RNAseq se realiza mediante la secuenciación del ADN copia (ADNc) obtenido del ARN de interés presente en una muestra. Primeramente, se realiza una extracción del ARN celular de la muestra biológica de interés. Luego, este ARN se procesa hasta su transcripción inversa a ADNc, se amplifica y se añaden adaptadores y códigos de barra en los extremos, los cuales serán identificados por la plataforma de secuenciación utilizada. El resultado de la secuenciación del ADNc son lecturas (*reads*): tramos de secuencia correspondientes al ADNc de entrada. Posteriormente se analizan las secuencias obtenidas, siendo asignadas a secuencias conocidas por homología y pudiendo así corresponderse con un gen previamente reportado (Figura 1.5). Por último, el uso más común de esta información obtenida es el análisis de la expresión diferencial de genes al comparar una condición experimental de interés con una condición control o comparar la abundancia de transcripción de perfiles entre muestras (Croucher and Thomson 2010).

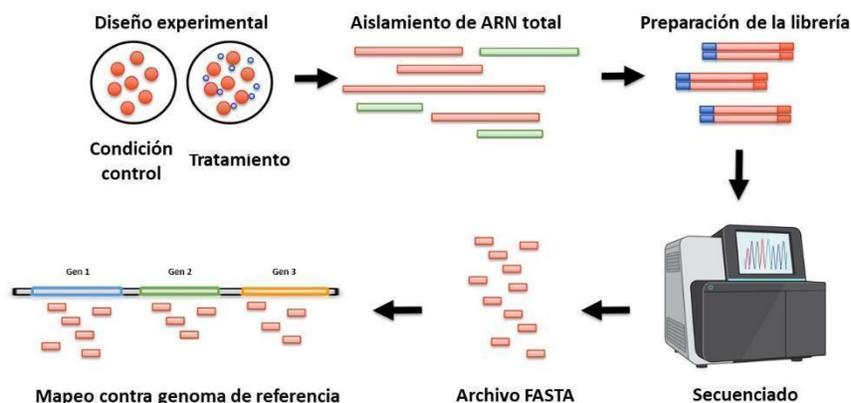


Figura 1.5. Esquema general de la metodología de RNAseq.

La alta resolución del RNAseq permite un análisis en paralelo de diferentes organismos que interactúan entre sí, como es el caso de la relación planta-endorfito. Anteriormente, las técnicas transcriptómicas se habían aplicado al análisis de uno de los involucrados en esta interacción en forma aislada, permitiendo la obtención de información de los mecanismos de infección endofítica o los mecanismos de defensa del huésped en forma separada. Sin embargo, las interacciones entre dos organismos son consecuencia de un diálogo molecular en donde la heterogeneidad transcripcional de ambos organismos puede conducir a diversos resultados. Actualmente, es posible

el análisis en un solo paso del perfil transcriptómico de ambos organismos involucrados en la interacción, mediante la técnica denominada RNA-seq dual o RNA-seq comparativa (Westermann et al. 2017). De esta forma, se evita interrumpir el diálogo molecular entre ambos actores y se disminuye la aparición de artefactos, consecuencia de perturbaciones en la interacción (Keeffe et al. 2019). Relacionar directamente los cambios en la expresión génica en un organismo con las respuestas de su contraparte puede revelar nuevos mecanismos de cómo interactúan estos organismos (Westermann et al. 2017). También, la obtención de perfiles globales de la expresión génica en las interacciones permite caracterizar la expresión de genes que tienen supuestos roles clave en la interacción, ya que los perfiles diferirán respecto a los obtenidos durante su cultivo axénico (Lanver et al. 2018). Todo esto proporciona valiosos recursos para comprender la dinámica de las interacciones entre dos o más organismos.

ANTECEDENTES DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se encuentra enmarcado en una de las principales líneas de investigación del Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismos del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). La misma se focaliza en el estudio de la interacción planta-microorganismos, particularmente en aquellas bacterias endófitas con capacidad promotora del crecimiento vegetal. El objetivo de esta línea es un mejor entendimiento de la dinámica de interacción entre ambas partes, con el fin de generar insumos para su posible aplicación en biotecnología, en el marco de la promoción de una agricultura más sustentable. Entre los cultivos en estudio se encuentran la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), la canola (*Brassica napus*), el cáñamo (*Cannabis sativa*) y la festuca (*Festuca arundinacea*).

Particularmente en la línea de investigación focalizada al estudio de la microbiota asociada a plantas de festuca, previamente se realizó una colección de endófitos bacterianos asociados al cultivar SFRO Don Tomás (de los Santos et al 2015). Primeramente, se aisló, caracterizó e identificó parte de la microbiota endofítica cultivable asociada a plantas de festuca (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás, cultivado en Uruguay como forraje. Se construyó una colección de 342 aislamientos a partir de raíces, tallos y semillas esterilizados en la superficie de plantas del cv. SFRO Don Tomás. Se determinó la capacidad funcional de los aislamientos para producir AIA, solubilizar minerales (P, Fe, K), fijar biológicamente nitrógeno molecular (N₂), identificándose también varios rasgos de infección, como la capacidad de producir proteasas, peroxidasas, celulasas y hemicelulasas. Algunos aislamientos bacterianos fueron seleccionados e identificados mediante secuenciación del gen *ARNr 16S*. Se encontraron cepas pertenecientes a un amplio espectro de géneros, incluidos *Bacillus*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Streptomyces*, *Acidovorax*, *Variovorax*, *Acinetobacter*,

Pseudomonas, *Pantoea*, *Rhanella* y *Xanthomonas*. La cepa *Streptomyces* UYFA156 fue originalmente aislada de semillas del cultivar SFRO Don Tomás, y en el screening de características asociadas a la PCV la única característica que presentó positiva fue en su capacidad de crecer en medios sin agregado de nitrógeno, así como en la amplificación (inespecífica) de una banda al utilizar los cebadores dirigidos al gen *nifH*, codificante de la enzima nitrogenasa. Finalmente, se estudió la promoción del crecimiento vegetal por parte de un grupo de cepas, obteniendo diez cepas capaces de promover el crecimiento de cv. SFRO Don Tomás en condiciones *gnotobióticas*, entre los cuales se incluye la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 (de los Santos et al. 2015).

En este trabajo se estudia la interacción de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 endófito del cultivar SFRO. Don Tomás de festuca con su hospedero. Los resultados muestran que la promoción es mediante un mecanismo indirecto novedoso: la manipulación de la comunidad microbiana del holobionte. En el capítulo 2 se verifica la verdadera naturaleza endofítica de la cepa en estudio y se describe como la cepa coloniza igualmente dos variedades. En el capítulo 3 se analiza su genoma, particularmente se identifican secuencias codificantes para metabolitos secundarios. En el capítulo 4, mediante ensayos modelo *in vitro* usando diferentes aislamientos, se muestra efectivamente que *Streptomyces* sp. UYFA156 posee un efecto importante en la fisiología de otras bacterias del holobionte y sus capacidades de promover directamente el crecimiento de festuca. Por último, en el capítulo 5, se realiza un análisis transcriptómico de una de las cepas sensibles a la presencia de *Streptomyces* sp. UYFA156 en las condiciones analizadas durante en el capítulo 4 (Figura 1.6).

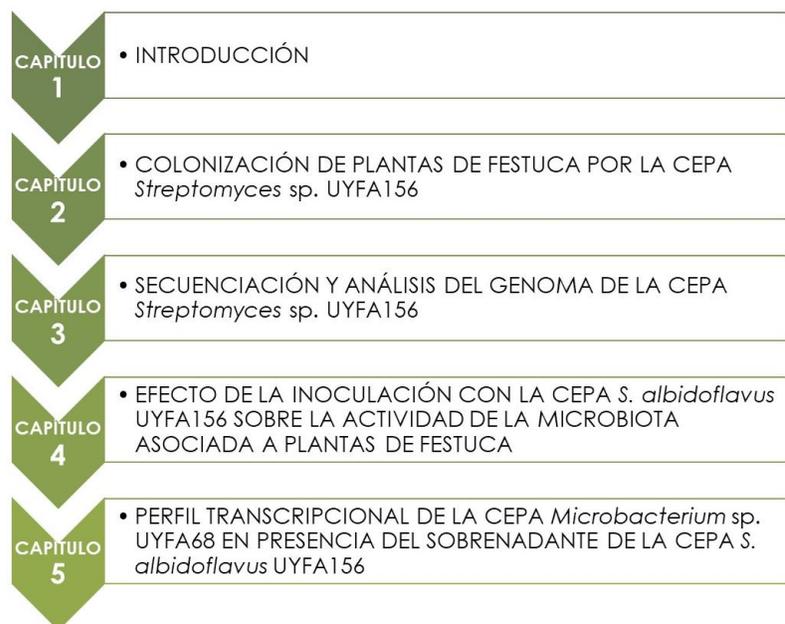


Figura 1.6. Diagrama de flujo del trabajo presente en la siguiente tesis.

HIPÓTESIS GENERAL

La inoculación de plantas de *F. arundinacea* SFRO Don Tomás con la cepa endofítica *Streptomyces* sp. UYFA156 modula la microbiota endofítica, generando cambios estructurales y fisiológicos en la misma que desencadenan la promoción del crecimiento vegetal.

OBJETIVO GENERAL

Profundizar en el conocimiento de las bases moleculares imperantes en la interacción *F. arundinacea-Streptomyces* sp. UYFA156- microbiota endofítica, desencadenantes de la promoción del crecimiento vegetal del hospedero.

CAPÍTULO 2

COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE FESTUCA POR LA CEPA *Streptomyces* sp. UYFA156

2.1 ANTECEDENTES

Trabajos previos del grupo de investigación demostraron que la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156, aislada del interior de semillas de *F. arundinacea* cultivar SFRO Don Tomás, es PCV de dicha variedad, pero no de la variedad comercial Tacuabé (de los Santos et al. 2015).

Dado que, como se describe en la introducción, la colonización de los tejidos internos es un complejo proceso que involucra muchos pasos, se plantea la hipótesis de que este efecto PCV observado exclusivamente en el cv. SFRO Don Tomás es debido a una colonización diferencial de los tejidos internos de ambos cultivares. Los resultados obtenidos fueron publicados en el artículo “Interactions between putatively endophytic bacteria and tall fescue (*Festuca arundinacea*): plant growth promotion and colonization in host and non-host cultivars” (Vaz Jauri et al. 2019).

En este capítulo se describen aquellos aportes realizados al trabajo mencionado dentro del marco de esta tesis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar si la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 es endófito verdadera de ambos cultivares de festuca (SFRO. Don Tomás y Tacuabé).

2.2.2. Comparar la dinámica de la colonización en ambos cultivares por parte de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Cuantificación de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 en los tejidos internos de plantas de festuca.

La capacidad de la cepa UYFA156 de colonizar los tejidos de los cultivares de festuca SFRO. Don Tomás y Tacuabé se evaluó mediante recuento en placa a distintos tiempos post inoculación: 1, 7, 20 y 30 días (dpi).

Se esterilizaron superficialmente semillas de festuca de ambos cultivares según De Los Santos *et al.* 2016. Brevemente, las semillas fueron incubadas en primera instancia en alcohol etílico al 70% durante 10 minutos, y posteriormente en hipoclorito de sodio al 4% durante 30 minutos. Por último, se realizaron seis enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas se colocaron en placas de agar-agua 1,6% separadas entre sí, y se incubaron por 7 días a 22°C, permitiendo su germinación. Posteriormente se colocaron dos plántulas por tubo de crecimiento conteniendo 20 mL de medio Jensen (ANEXO 1.4), con bolitas de polipropileno como soporte. Las mismas se inocularon con 10^6 de esporas de la cepa UYFA156 en una suspensión de glicerol 25% agregadas con pipeta sobre la base del tallo. Se realizaron tres réplicas biológicas de cada condición y tres réplicas técnicas de cada dilución. A los 1, 7, 20 y 30 dpi, las plantas se esterilizaron superficialmente, se determinó el peso húmedo y se separaron en parte aérea y raíz. A continuación, las mismas se maceraron asépticamente en morteros estériles con 2 mL de NaCl 0,9 %. A partir del macerado obtenido (considerado la dilución cero), se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon 100 μ L con rastrillo en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TSA. A esta placa, se le agregó una sobrecapa de 5 mL de TSA para favorecer el crecimiento de bacterias del género *Streptomyces* sobre el resto de la microbiota endofítica.

El recuento en placa se realizó tras 72 horas de incubación a 28°C. Todos los tratamientos se compararon con plantas control sin inocular. Las diferencias en la colonización entre los tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de tres factores (tiempo de crecimiento, cultivar, inoculación) sobre los valores transformados por logaritmo y la comparación entre pares se realizó utilizando pruebas-t entre los tratamientos. En el caso del día 20 pi, el experimento se repitió conteniendo cinco réplicas biológicas para la obtención de datos con mayor valor estadístico. Los resultados se graficaron expresando el número ufc por gramo de planta a los diferentes días evaluados.

2.3.2 Análisis de la colonización de los tejidos internos de plantas de festuca por la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 mediante microscopía confocal.

Semillas de los cultivares SFRO Don Tomás y Tacuabé fueron esterilizadas superficialmente y germinadas como se describió en el punto 2.3.1. Posteriormente se inoculó 100 μ L de una suspensión de 10^7 ufc de la cepa UYFA156 sobre la base de las dos plántulas presentes en los tubos conteniendo medio Jensen. Se cosecharon las plantas a los 1, 7 y 20 dpi, y cada muestra fue definida como el contenido de tres tubos (6 plantas). Los tratamientos evaluados fueron plantas de cada cultivar inoculadas y sin inocular.

Las plantas se fijaron durante 2 horas en paraformaldehído al 4 % en buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS, y se incubó en una solución de sacarosa 15 % en

una primera instancia y posteriormente en sacarosa 30 %, por 24 horas cada vez, para su crioprotección. Luego, la parte aérea y radicular se separaron e inmovilizaron en Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Europe) y se realizaron cortes de 40 µm de espesor en criostato MEV (Mainz-Germany).

La tinción de los cortes se efectuó con un anticuerpo policlonal anti-UYFA156 de ratón y un anticuerpo secundario anti-Fc.ratón conjugado al fluoróforo Alexa-546 (Invitrogen™). Los anticuerpos policlonales anti-UYFA156 se produjeron por encargo en el Laboratorio de Biotecnología del Polo Tecnológico de Pando (Facultad de Química, UdelaR. Uruguay). Con respecto a los anticuerpos, análisis anteriores determinaron la especificidad de los mismos al desafiarse con otras bacterias endófitas de festuca mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, por su sigla en inglés). Los resultados mostraron que solo uno de los aislamientos de la colección del género *Streptomyces* reaccionó débilmente con respecto a la reacción fuerte presentada por la cepa UYFA156, permitiendo el uso de los anticuerpos como marcador de la cepa UYFA156 en los tejidos.

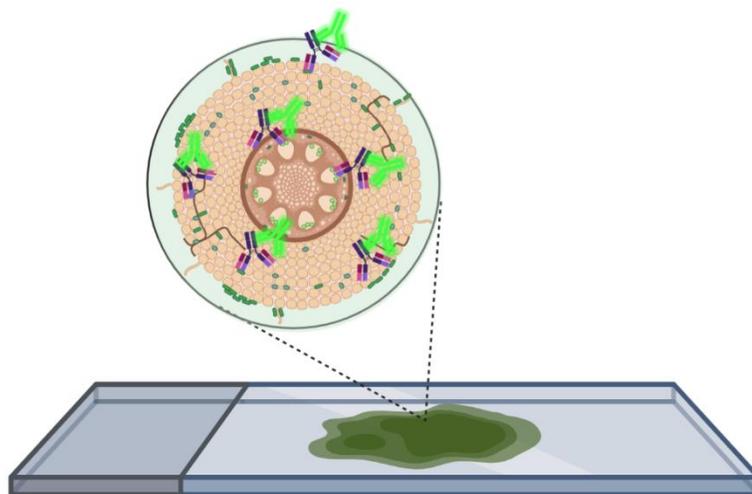


Figura 2.1. Reconstrucción de la metodología realizada para la tinción de los cortes a observar por microscopía confocal. El anticuerpo representado en violeta es el anti-UYFA156, el cual se asocia a la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 que se encuentra asociado a los tejidos vegetales. Representado en verde se observa el anticuerpo secundario anti-FC de ratón conjugado al fluoróforo Alexa-546.

Para su tinción, las muestras se incubaron en primera instancia sobre los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-UYFA156 (1:100 en PBS). A continuación los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS, y luego se incubaron con el anticuerpo anti-Fc.ratón Alexa-546 (1:1000 en PBS) durante una hora. Posteriormente, el anticuerpo secundario fue

removido mediante tres lavados con PBS, y luego se cubrieron las muestras con glicerol 80 % sobre el cual se agregó un cubreobjetos. Las muestras así tratadas se guardaron a 4°C hasta su visualización en el microscopio láser confocal Zeiss, LSM 800 - Airy Scan (Jena-Germany) de la Plataforma de Microscopía Confocal del IIBCE. Las imágenes se tomaron con un aumento 40X, utilizando 3 canales independientes: 1- un canal de detección de la luz transmitida, permitiendo observarse la morfología de la planta; 2- un canal de detección de la emisión en el rojo lejano, al excitarse la muestra a 480 nm, para detectar la auto-fluorescencia de la planta; 3- un canal capaz de detectar la emisión generada por el fluoróforo Alexa 546, unido a los *Streptomyces* sp. presentes en los tejidos. Las imágenes fueron solapadas y se mejoró el balance de luz y el contraste. El procesamiento de imágenes fue realizado con el software ImageJ.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Colonización de la cepa UYFA156 en los tejidos internos de los cultivares de festuca SFRO. Don Tomás y Tacuabé

Los resultados de los recuentos en placa de las unidades formadoras de colonias de *Streptomyces* por gramo de planta (ufc/g planta), mostraron que en ambos cultivares, la colonización a 1 y 7 dpi fue similar, mientras que a 20 y 30 dpi la colonización aumentó más de 200 veces. Los análisis estadísticos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre cultivares (Figura 2.2).

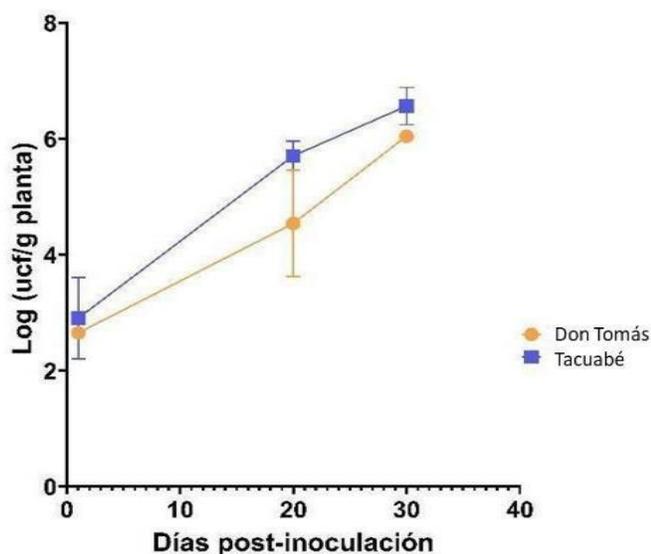


Figura 2.2. Cinética de colonización de la cepa de las raíces de los cultivares de festuca SFRO Don Tomás (círculos anaranjados) y Tacuabé (cuadrado azul). No se observan diferencias significativas entre la colonización de ambos cultivares en ninguno de los tiempos evaluados.

Por otra parte, el análisis del ANOVA de dos vías (zona y dpi), reveló diferencias significativas entre la colonización de las raíces y las partes aéreas de ambos cultivares (p -valor $< 0,0001$), siendo la colonización de la raíz 400 veces mayor. También se observaron diferencias significativas cuando se compararon los 20 y 30 dpi ($p < 0,0081$, Figura 2.3).

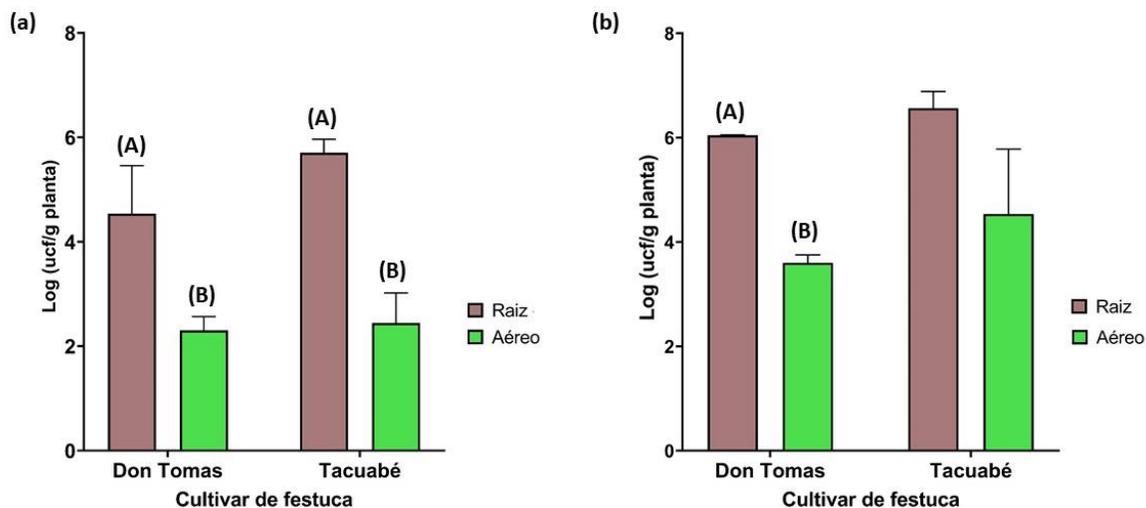


Figura 2.3. Colonización de las zonas radicular y aérea de los cultivares de festuca SFRO Don Tomás y Tacuabé inoculadas con la cepa UYFA156, a los días 20 (a) y 30 (b) post-inoculación. Existen diferencias significativas entre la colonización de la raíz (A) y de la parte aérea (B) (ANOVA, p -value $<0,0001$).

2.4.2 Estudio de la colonización de los tejidos internos de ambos cultivares de festuca por la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 mediante microscopía confocal.

Los resultados de los análisis de microscopía confocal mostraron una colonización discreta por la cepa UYFA156 en ambos cultivares a 1dpi (Figura 2.4). En ambos casos, la bacteria se encuentra principalmente adherida a la raíz y pelos radiculares, específicamente, en los espacios intercelulares de los tejidos internos de la planta. Sin embargo, las raíces de las plantas control (no inoculadas) también presentaron un bajo número de puntos fluorescentes, evidenciando la presencia de la cepa UYFA156 como parte de la microbiota nativa de las semillas. No se observó colonización de la cepa UYFA156 en las zonas aéreas en el día 1 en ninguno de los dos cultivares.

A los 7 dpi la densidad de colonización de la cepa UYFA156 aumentó en ambos cultivares respecto a las muestras de 1 dpi, particularmente en raíces, donde se visualizó principalmente en los espacios intercelulares (Figura 2.4). Las plantas de ambos cultivares inoculadas presentaron mayor cantidad de células de UYFA156 que las plantas control.

A los 20 dpi la colonización fue abundante y ubicua, tanto en raíces como en tejidos aéreos, alcanzando los vasos vasculares. Los cortes longitudinales de raíz permitieron observar la topología del crecimiento en los tejidos internos, mostrándose como un hilo que avanza a través de los espacios intercelulares (Figura 2.4). Las imágenes obtenidas fueron contrastadas con las de plantas sin inocular, en donde la presencia de *Streptomyces* sp. fue muy baja o nula.

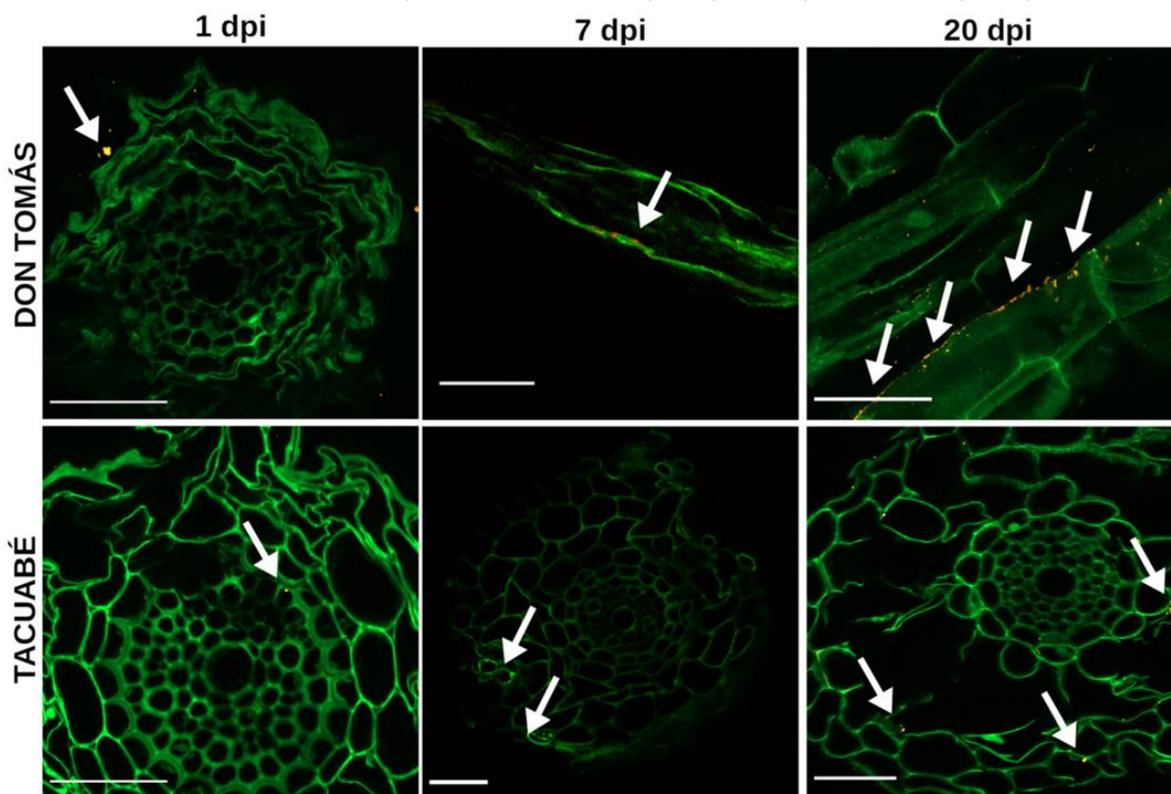


Figura 2.4. Colonización de la cepa UYFA156 en festuca analizada mediante microscopía confocal a 1, 7 y 20 dpi. Con flechas se señala las zonas de colonización de la cepa UYFA156. Las barras blancas al pie de cada figura representan la escala de 50 μ m.

2.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se definen como endófitos verdaderos a aquellos microorganismos que no sólo son aislados de los tejidos esterilizados en su superficie, sino que además existe evidencia de su presencia dentro de los tejidos vegetales mediante técnicas de microscopía (Hardoim et al. 2008). La presunta evidencia de un estilo de vida endofítico dado por los ensayos de recuento en placa, fueron confirmados mediante los análisis de microscopía láser confocal. Los mismos permitieron identificar la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 dentro de los tejidos internos de raíces y tallos de ambos cultivares de festuca evaluados, proporcionando así evidencia de su verdadera naturaleza endofítica. La localización de la cepa UYFA156 se da en los espacios intercelulares, mayoritariamente en células parenquimatosas. Posteriormente, tras varios dpi se visualizó a la cepa en estudio colonizando los vasos vasculares, indicando una dispersión sistémica a los demás tejidos de la planta.

Este tipo de colonización endofítica ha sido reportado para bacterias de diferentes géneros en plantas de caña de azúcar, sorgo y arroz (Taulé et al. 2016; Heijo et al. 2021; Hurek et al. 1994). Particularmente, se ha reportado para bacterias del género *Streptomyces* endófitas de *Triticum aestivum* (trigo harinero) (Conn and Franco 2004). Al igual que en este trabajo, se observaron microcolonias en los espacios intercelulares luego de 24 horas de inoculación, generalmente cerca de las paredes celulares del tejido vegetal (Coombs et al. 2003). Por otra parte, la confirmación de que la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 es también endófita verdadera del cv. Tacubé es de gran relevancia. Esto demostraría que la actividad PCV diferencial en ambos cultivares no está dada por diferencias en las etapas tempranas de la colonización durante la interacción planta-bacteria. Sin embargo, si bien la cepa UYFA156 los coloniza de manera similar, los efectos de la interacción planta-bacteria sobre el fenotipo de la planta es diferente en ambos cultivares.

Futuros experimentos de microscopía podrían dirigirse hacia la visualización de la actividad genética bacteriana dentro de los tejidos vegetales. El uso de cepas modificadas con promotores de genes de interés (ej nitrogenasa, ACC-desaminasa), unidos a proteína verde fluorescente (GFP), podría eventualmente conducir a la visualización en tiempo real de actividades microbianas diferenciales por la cepa UYFA156 según el cultivar, que explique la actividad PCV cultivo-específica. Este procedimiento requiere comparar la intensidad de la señal de plantas control (no infectadas) con las de plantas inoculadas con la cepa, para poder distinguir las señales específicas de las bacterias endófitas en estudio. Desde el punto de vista técnico, una dificultad de este procedimiento es que el nivel de autofluorescencia en el tejido vegetal puede interferir con la visualización, lo cual representa uno de los mayores desafíos para el uso de proteínas fluorescentes. Este problema puede superarse mediante el uso de proteínas fluorescentes con longitudes de onda de emisión específicas que coincidan con niveles bajos de autofluorescencia en el tejido vegetal. Sin embargo, teniendo en cuenta lo complejo del sistema en estudio, cabe considerar otros mecanismos responsables de la PCV observada. Específicamente, es posible que los efectos diferenciales en los diferentes cultivares estén dados por las respuestas de otros elementos del holobionte, como por

ejemplo el genotipo de cada cultivar o la presencia de microbiotas específicas asociadas a cada cultivar (Heijo et al 2021).

En este capítulo se observó que las diferencias en la actividad PCV tras la inoculación con la cepa UYFA156 en los dos cultivares estudiados no están dadas por una colonización diferencial de los tejidos internos. Una nueva hipótesis a partir de estos resultados podría ser que al inocular la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156, ésta interactúe diferencialmente con las microbiotas endofíticas asociadas a cada uno de los cultivares de festuca, lo cual será abordado en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO 3

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GENOMA DE LA CEPA *Streptomyces* sp. UYFA156

3.1 ANTECEDENTES

Las bacterias del género *Streptomyces* son mayormente estudiadas por su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo, la cepa UYFA156, estudiada en este trabajo, destaca por su capacidad PCV y por no haber mostrado las características fisiológicas bacterianas típicamente asociadas a este proceso (de los Santos et al 2015).

Para poder profundizar en los posibles mecanismos que desencadenan la PCV por la cepa UYFA156, se planteó como objetivo general de este capítulo la secuenciación y análisis de su genoma.

Los resultados obtenidos fueron publicados en el artículo “Whole-Genome Sequencing of *Streptomyces* sp. Strain UYFA156, a Cultivar-Specific Plant Growth-Promoting Endophyte of *Festuca arundinacea*” (Vaz Jauri et al. 2019).

A continuación, se presentan los aportes realizados en el marco de esta tesis como objetivos específicos de este capítulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Extracción y purificación de ADN genómico de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 para su secuenciación.

3.2.2 Analizar el genoma en busca de características potencialmente involucradas en la promoción del crecimiento vegetal de plantas de festuca.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Extracción y purificación de ADN genómico de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156.

Se extrajo ADN genómico (ADNg) de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 mediante el método del bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) descrito por el Joint Genome Institute (JGI) (Nordberg et al., 2014), con algunas modificaciones. Para esto, 100 μL de una suspensión de esporas de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 10^8 ufc/mL se inocularon en 10 mL de medio de cultivo TSB por 72 horas a 30°C y 180 rpm. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto y el *pellet* resultante se resuspendió en 500 μL de TE25S (Anexo 2.3). A la suspensión obtenida se le agregó lisozima a una concentración final de 2 mg/mL y se incubó a 37°C por 60 minutos, invirtiendo suavemente los tubos cada 15 minutos. A continuación, se agregaron Proteinasa K y dodecil sulfato sódico (SDS) a una concentración final de 0,1 mg/mL y 0,6 %, respectivamente, y luego se incubó a 55°C por 3 horas. Luego de la incubación se agregaron 100 μL de NaCl 5M y 80 μL de la solución CTAB/NaCl (ver Anexo 2.4), se agitó la mezcla utilizando un vórtex y se incubó 10 minutos a 55°C. Un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) se agregó e incubó por 30 minutos con frecuente inversión. La mezcla se homogeneizó con un vórtex y se centrifugó por 15 minutos a 12000 g y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. La precipitación del ADNg presente en la fase acuosa se realizó agregando 0,6 volúmenes de isopropanol. Los tubos fueron invertidos suavemente hasta lograr la homogeneización y se centrifugó la mezcla a 4°C y 12000 g por 15 minutos. El sobrenadante se removió y el *pellet* obtenido se lavó con 500 μL de etanol 70%. A continuación, se extrajo el etanol y el *pellet* fue secado en una centrifuga de vacío (Speed Vac 7810000 – LABCONCO). Por último, el ADNg se resuspendió en 300 μL de buffer TE y se almacenó a -20°C para posteriores análisis.

3.3.2 Purificación del ADNg

Con el fin de depletar ADN fragmentado, el ADNg extraído fue purificado utilizando el kit Monarch PCR and DNA Cleanup Kit (New England BioLabs® Inc.). Para esto inicialmente se diluyó al tercio la muestra conteniendo el ADNg de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 con el buffer de unión provisto por el kit. Dicho volumen se cargó en la columna de unión al ADN suministrado por el kit y se centrifugó 1 minuto a 12000 g . Una vez unido el ADNg a la columna, se realizaron dos lavados con 200 μL de buffer de lavado, se centrifugó 1 minuto a 12000 g y se descartó el eluido cada vez. La columna se transfirió a un tubo de 1,5 mL de microcentrífuga nuevo y se agregó 10 μL de buffer de elución. Se incubó por 2 minutos, y se centrifugó 1 minuto a 12000 g , permitiendo la elución del ADNg.

3.3.3 Cuantificación y secuenciación del ADNg

El ADNg extraído se cuantificó mediante NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™) y su integridad se verificó en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sybr™ Safe (Invitrogen™). El genoma de la cepa se secuenció en Macrogen, Inc. (Corea del Sur) mediante la tecnología PacBio

RS II (Pacific Biosciences) con una cobertura de 185X. Las lecturas de PacBio sin procesar se corrigieron, recortaron y ensamblaron *de novo* con Canu v.1.8.

3.3.4 Análisis del genoma de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156

Para esto se utilizó en primera instancia la herramienta FastANI v.1.1 para identificar el genoma más similar al de la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156. Posteriormente, el software RGI 5.2.0 (Resistance Gene Identifier), CARD 3.1.3 se empleó para la predicción de marcos de lectura abiertos (ORF) mediante el uso del software de predicción de genes Prodigal y la detección de homólogos usando el algoritmo DIAMOND. Por último, se analizó la presencia de genes potencialmente involucrados con la promoción del crecimiento vegetal (PCV) mediante las plataformas [RAST](#) (Meyer et al. 2008), [antiSMASH](#) (Medema et al. 2011a) y [CARD](#) (Alcock et al. 2020).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hecho de que las bacterias del género *Streptomyces* son bacterias gram positivas implica que presentan una mayor resistencia a la lisis celular, lo cual dificulta la extracción del ADN (Tripathi y Rawal 1998). La mayoría de los protocolos de lisis utilizan lisozima, a menudo en conjunto con SDS. Una estrategia para mejorar la lisis es el uso de glicina en el medio de cultivo, para minimizar el entrecruzamiento de peptidoglicano (Nikodinovic et al. 2003). Asimismo Heath et al. 1986, demostraron que un tratamiento previo con acetona era útil para aquellas cepas que se lisan de manera ineficaz mediante procedimientos que utilizan solo lisozima y un detergente. Además, el genoma de estas bacterias es de gran tamaño y generalmente lineal, dificultando las etapas de renaturalización del ADN. Por todo esto, la extracción de ADN de *Streptomyces* es un proceso laborioso y que conlleva a menores rendimientos del producto final (Kutchma et al. 1998). Afortunadamente, el protocolo utilizado en este trabajo, resultó en la obtención de una gran cantidad de ADN genómico de buena calidad.

Siguiendo la metodología descrita se lograron extraer 704 µg de ADN genómico no degradado. Tras el secuenciado y ensamblado se obtuvieron dos contigs de 6,823,997 pb y 307,384 pb de largo, correspondientes al cromosoma y a un mega-plásmido respectivamente. Los datos de la secuencia del genoma de la cepa UYFA156 se depositaron en DDBJ / ENA / GenBank con el número de BioSample SAMN11663544, Número de bioproyecto PRJNA543336 y números de acceso al genoma CP040466 y CP040467 para el cromosoma y el mega-plásmido, respectivamente. Se puede acceder a los datos de secuencia sin procesar a través del Sequence Read Archive del NCBI (SRA) mediante el identificador SRX5891284. El genoma presenta un alto contenido GC (73,4%), característica compartida con otras especies del género. Se hallaron siete secuencias correspondientes a operones

de ARNr, coincidente con la alta adaptabilidad de la cepa para crecer en nichos complejos, como es el caso del interior de la planta (Jones et al. 2014).

Por otra parte, se determinó que la cepa en estudio presenta un valor de identidad nucleotídica promedio del 96,27% con la cepa *Streptomyces albidoflavus* SM254. La cepa *S. albidoflavus* SM254 ha sido reportada como una fuerte antagonista de patógenos, con características genómicas similares (Badalamenti et al. 2016). Por otra parte, mediante el uso de la plataforma RAST, se lograron identificar genes clasificados como de resistencia antibiótica (β -lactamasas y genes codificantes para la resistencia a fluoroquinolonas), hidrolasas y genes codificantes para metabolitos secundarios como microcinas y lantioninas.

El software antiSMASH (Medema et al. 2011) se encuentra dirigido a la búsqueda de clusters de genes biosintéticos de metabolitos secundarios. A través de su uso, se identificó la presencia de 21 clusters potencialmente asociados a la síntesis de metabolitos secundarios en el genoma, 19 presentes en el cromosoma y dos en el mega-plásmido (Figura 3.1). Las predicciones indican que los clusters se encuentran asociados a la biosíntesis de péptidos no ribosómicos (NRPs, por su sigla en inglés); poliquetido sintasas de tipo I (T1PKs); poliquetido sintasas de tipo III (T3PKs); lantipéptidos; lasopéptidos; terpenos; tiopéptidos; péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente (RiPP) y sideróforos (Tabla 1.1). La presencia de un alto número de genes codificantes de metabolitos secundarios coincide con una de las principales características del género. A su vez, los metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* han sido reportados como involucrados en la señalización interespecífica entre cepas del mismo género (Vaz Jauri et al. 2013). Teniendo en cuenta esta característica se podría especular que los potenciales metabolitos secundarios de la cepa UYFA156, podrían estar involucrados en la actividad PCV, ya sea por su interacción con el hospedero, como con el resto de la microbiota endofítica.

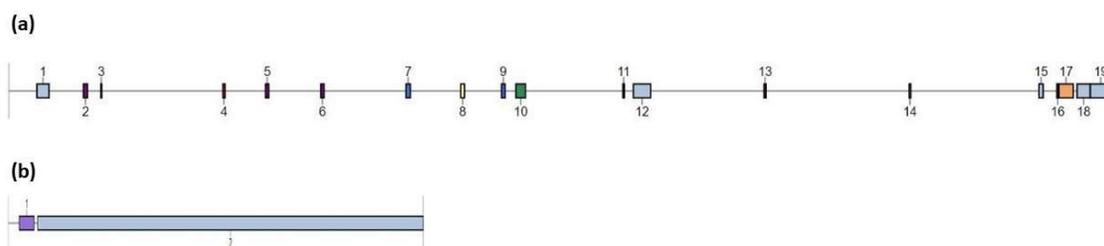


Figura 3.1. Esquema de los clusters de genes codificantes para metabolitos secundarios, presentes en el genoma de *S. albidoflavus* UYFA156 en el cromosoma (6,823,997 pb; a) y en el megaplásmido (307,384 pb; b).

Tabla 3.1. Análisis del genoma de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 mediante la plataforma informática antiSMASH (Medema et al. 2011), para la determinación de *clusters* involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios por homología utilizando un método estricto.

CLUSTER	CLUSTER MÁS SIMILAR CONOCIDO	% HOMOLOGÍA	TIPO DE METABOLITO SECUNDARIO INVOLUCRADO
1	Valinomicina	13	Terpenos y NRPs
2	Hopenos	76	Terpenos
3	-	-	RiPP
4	-	-	RiPP
5	Ficelomicina	5	Sideróforos
6	Geosmina	100	Terpenos
7	Julicromo	22	Terpenos
8	-	-	Tiopéptidos
9	SAL-2242	100	Lantipéptidos case III
10	Kanamicina	1	Lasopéptidos
11	Declorocuracomocina	16	NRPs
12	Herbimicina A	6	RiPP
13	Surugamida	95	NRPs
14	Desferroxiamina	100	Sideróforos
15	Ectoína	100	Ectoína
16	Isorenieratene	85	Terpenos y Tipo RiPP
17	Herboxidieno	13	T1PKs y T3PKs
18	Candidina	71	T1PKs
19	Antimicina	100	T1PKs, tipo NRPs, NRPs, lantipéptidos de clase II y transAT-PKs
PLÁSMIDO.1	Griseoviridina	11	Butirolactona

PLÁSMIDO.2	Concanamicina A	46	T1PKs y NRPs
------------	-----------------	----	--------------

Complementariamente, a través del análisis mediante el software CARD, se identificaron 353 genes en el genoma de la cepa UYFA156, con un porcentaje de homología variable (20,62% - 94,27%) respecto a genes de resistencia a antibióticos. Entre las secuencias con mayor porcentaje de homología se encuentran los de resistencia a β -lactamasas, antibióticos aminocumarínicos, rifamicinas, macrólidos, fenicoles, aminoglucósidos y elfamicinas. Estos resultados apoyan la idea de que la cepa podría producir una serie de antibióticos, ya que las cepas productoras de antibióticos también poseen los genes de resistencia para los mismos.

Tabla 3.2. Análisis del genoma de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 en la plataforma informática CARD, para la determinación de *clusters* involucrados en la síntesis de metabolitos capaces de otorgar resistencia antibiótica.

ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE RESISTENCIA	% HOMOLOGÍA	% DE LARGO DE LA SECUENCIA REFERENCIA
BETA-LACTAMASA	Inactivación del antibiótico	94.27	99.36
BOMBA ABC	Eflujo del antibiótico	81.03	100.33
SUBUNIDAD BETA DE LA ARN POLIMERASA RESISTENTE A LA RIFAMICINA	Alteración del blanco del antibiótico	75.54	98.98
BOMBA DE EFLUJO DE ANTIBIÓTICO DE DIVISIÓN DE CÉLULAS DE NODULACIÓN DE RESISTENCIA	Eflujo del antibiótico	74.55	98.68
APH(3'')	Inactivación del antibiótico	74.45	100.74
CLORANFENICOL FOSFOTRANSFERASA	Inactivación del antibiótico	74.45	94.04
EF-TU RESISTENTE A ELFAMICINA	Alteración del blanco del antibiótico	74.24	97.07
AAC(6')	Inactivación del antibiótico	73.89	101.91

En su conjunto, los resultados del análisis del genoma de la cepa UYFA156 apoyan la hipótesis de que la modulación de la microbiota endofítica mediante la señalización química podría ser uno de los mecanismos involucrados en la PCV por parte de la cepa.

CAPÍTULO 4

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON LA CEPA *S. albidoflavus* UYFA156 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A PLANTAS DE FESTUCA

4.1 ANTECEDENTES

Previamente se demostró que la cepa UYFA156 es endófito verdadera de los cultivares SFRO Don Tomás y Tacuabé (Vaz Jauri et al 2019). Sin embargo, dicha cepa es PCV específicamente del cv. SFRO Don Tomás. Asimismo, análisis *in vitro* no detectaron posibles mecanismos PCV comúnmente presentes en bacterias endófitas (De los Santos *et al* 2015). Por otro lado, el genoma de la cepa UYFA156 presentó varios clusters que codifican para metabolitos secundarios (Vaz Jauri et al 2019b). En este contexto se plantea la hipótesis de que el efecto PCV de la cepa UYFA156 sobre plantas de festuca del cultivar SFRO Don Tomás podría ser consecuencia de la modulación diferencial de la microbiota endófitica de cada cultivar provocada por la inoculación con la cepa. A su vez, análisis anteriores del grupo de trabajo demostraron que la presencia del sobrenadante de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 crecida en TSB, promueve significativamente la producción de auxinas por parte de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, también endófito de festuca (Vaz et al. 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó como objetivo general determinar el efecto de la inoculación con la cepa UYFA156 sobre la estructura, diversidad y actividad de la microbiota asociada a festuca. Parte de los resultados obtenidos fueron publicados en el artículo “Differential modulation of the bacterial endophytic microbiota of *Festuca arundinaceae* (tall fescue) cultivars by the plant-growth promoting strain *Streptomyces albidoflavus* UYFA156” (Vaz Jauri et al. 2022).

A continuación, se presentan los aportes realizados en el marco de esta tesis como objetivos específicos de este capítulo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Analizar el efecto de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 sobre el crecimiento de otros componentes de la microbiota endófitica asociada a plantas de festuca SFRO. Don Tomás.

4.2.2. Evaluar la inducción de metabolitos secundarios por componentes de la microbiota asociada a plantas de festuca (cv. SFRO Don Tomás), en presencia de la cepa UYFA156.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Evaluación del crecimiento de bacterias endofíticas nativas aisladas de plantas de festuca en presencia de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156.

Para evaluar el efecto de la presencia de la cepa UYFA156 sobre el crecimiento de otras bacterias endófitas del mismo hospedero, se inocularon 20 μL de una suspensión de esporas de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 con una concentración de 10^7 ufc/mL en línea recta en el centro de una placa de Petri conteniendo 20 mL de medio de cultivo TSA. Paralelamente se realizaron cultivos líquidos de las cepas *Microbacterium* sp. UYFA61 y UYFA68 y de la cepa *Pseudomonas* sp. UYFA249. Las mismas fueron seleccionadas por ser productoras de AIA y PCV del cv SFRO Don Tomas (De los Santos et al 2015). Tras 72 horas de incubación a 30°C y 200 rpm, 4 μL de los cultivos mencionados, a ser desafiados con *S. albidoflavus* UYFA156, se inocularon en forma de gota 3 veces a cada lado de la línea inoculada con la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 (Figura 4.1.). La inhibición del crecimiento de dichas cepas se comparó tras 48 horas de incubación a 30°C con una placa control conteniendo 4 μL de las cepas a ser evaluadas creciendo en ausencia de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156.

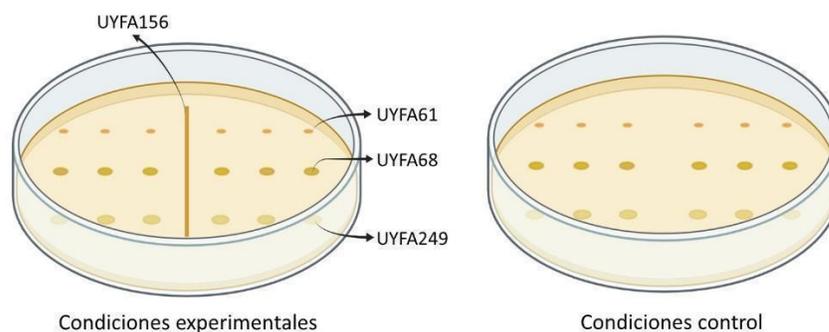


Figura 4.1. Representación de la metodología de siembra en línea utilizada para la detección de metabolitos difusibles producidos por la cepa UYFA156 capaces de inhibir el crecimiento de las cepas *Microbacterium* sp. UYFA61, UYFA68 y *Pseudomonas* sp. UYFA249.

Posteriormente, un segundo abordaje fue utilizado con el fin de evaluar el efecto de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 sobre un conjunto más amplio de bacterias endófitas asociadas a los cultivares de festuca SFRO Don Tomás y Tacuabé, así como a fitopatógenos comunes bacterianos y fúngicos. En este caso, placas conteniendo 20 mL de TSA se inocularon con 4 gotas de 4 μL de una suspensión de esporas de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 de concentración 10^7 ufc/mL. Las mismas se incubaron a 30°C durante 72 horas. Por otro lado, en 5 mL de medio TSB se inocularon las cepas a analizar: *Microbacterium* sp. UYFA61, *Microbacterium* sp. UYFA68, *Pseudomonas* sp. UYFA249,

Kosakonia sp. UYFA343, *Pantoea* sp. UYFA344, *Escherichia* sp. UYFA346, *Bacillus* sp. UYFA348, *Pantoea* sp. UYFA357, *Kosakonia* sp. UYFA358, *Pseudomonas* sp. UYFA359, *Erwinia* sp. UYFA360, *Erwinia* sp. UYFA361, *Kosakonia* sp. UYFA362 y *Kosakonia* sp. UYFA363, y se incubaron hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,3. Posteriormente, tras 72 horas de incubación, a las placas con UYFA156 se les agregó una sobrecapa de 10 mL de medio de cultivo TSA, cubriendo a la cepa en su totalidad. Luego de secada la sobrecapa, se plaquearon 50 μ L de los diferentes cultivos a evaluar sobre ésta. El efecto inhibitorio del crecimiento tras desafiar las diferentes cepas a la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 se analizó tras 24 horas de incubación a 30°C.

Para el estudio de la inhibición del fitopatógeno *Botrytis cinerea* en condiciones de co-cultivo con la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 la metodología fue levemente diferente. En este caso, se inocularon 2 gotas de 4 μ L de una suspensión de esporas de *S. albidoflavus* UYFA156 (1×10^7 esporas / mL), en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TSA (una de las gotas en cada extremo de la placa). Posteriormente en el centro de la placa se añadió una fracción de agar conteniendo un cultivo fresco de *B. cinerea*. Como control se utilizaron placas de TSA suplementadas solamente con una fracción de agar con un cultivo fresco de *B. cinerea* y sin UYFA16. Las placas se incubaron a 25°C, hasta que el microorganismo en la placa control (sin *S. albidoflavus* UYFA156) llegara a los bordes de la placa.

4.3.2 Análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 sobre el crecimiento de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 en medio líquido

Para evaluar el efecto de la presencia de *S. albidoflavus* UYFA156 sobre la actividad de otras bacterias endófitas se seleccionó a la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, ya que es una cepa de interés por ser productora de auxinas y PCV del cultivar de festuca SFRO Don Tomás (De los Santos *et al* 2015; Vaz Jauri *et al* 2019). Para esto se evaluó el efecto de diferentes sobrenadantes de medios de cultivo de 72 horas, de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156, crecida en los medios TSB e ISP2, sobre el crecimiento de la cepa UYFA68. Los sobrenadantes de los medios de cultivo fueron recolectados y esterilizados por filtración, diluyéndose con medio de cultivo TSB (30 g/L) a una concentración final de 50%. Posteriormente se transfirieron 200 μ L de los medios resultantes a placas de 96 pocillos, donde se sembraron 20 μ L de un cultivo fresco de 10^{13} ufc/mL de la cepa UYFA68. La placa se incubó a 30°C durante 24 horas en el Varioskan Flash (Thermo Scientific), y se registró la absorbancia a 600nm, como indicativo del crecimiento bacteriano, cada 30 minutos. En este experimento se realizaron cuatro réplicas biológicas por condición.

4.3.3. Análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156, sobre la producción de auxinas por la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68

La producción del sobrenadante de la cepa UYFA156 se realizó de manera similar a lo descrito en la actividad 4.3.2. Se inocularon 50 mL del medio de cultivo ISP2 con 100 μ L de una suspensión 10^7 ufc/mL de la cepa UYFA156 y se incubó por 72 horas con una agitación de 120 rpm. El sobrenadante del cultivo se recolectó por centrifugación durante 5 minutos a 8000 g y se filtró utilizando una membrana estéril de 0,45 μ m. Para el análisis de la producción de auxinas por parte de la cepa UYFA68 se inocularon 10^{11} ufc en 10mL de los siguientes medios: i- TSB 2X suplementado con el sobrenadante de la cepa UYFA156 crecida en medio ISP2 (1:1), (+ SN ISP2/TSB); ii- tratamiento i + triptófano 50 mM; (+ SN ISP2/TSB/Trp) (Taulé et al. 2012). Ambos cultivos se incubaron 24 y 72 horas a 30°C y 120 rpm. En todos los casos se realizaron controles en los cuales se agregó medio de cultivo sin inocular en lugar del sobrenadante. Se realizaron 6 réplicas biológicas para cada tratamiento.

La determinación de AIA se realizó según lo descrito en Sarwar and Kremer 1995. Tras 24 y 72 horas de incubación, 1,5 mL de los cultivos obtenidos se centrifugaron 5 minutos a 12000 g . Posteriormente, 120 μ L del sobrenadante se incubaron en la oscuridad en una placa de 96 pocillos junto a 80 μ L del reactivo de Salkowski (ANEXO 2.5). La producción de AIA se siguió colorimétricamente mediante la lectura de absorbancia a 540 nm, utilizando 3 réplicas técnicas de cada cultivo. Cada una de las medidas obtenidas se normalizó según la absorbancia a 600 nm. En paralelo se realizó una curva de calibración en el rango 0 - 100 μ M de AIA sintético para la cuantificación absoluta de AIA. La concentración de AIA fue también determinada en el sobrenadante de UYFA156 que fue agregado al cultivo de UYFA68 y fue restado de los valores asociados a la cepa UYFA68. La determinación de AIA en los cultivos expuestos a sobrenadante de UYFA156 fue comparada con los niveles de AIA basal, producidos por la cepa UYFA68.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Efecto de la cepa UYFA156 sobre el crecimiento *in vitro* de otros componentes de la microbiota endofítica asociada a festuca

Los resultados mostraron que las cepas *Microbacterium* sp. UYFA61 y UYFA68, *Pseudomonas* sp. UYFA249, *Kosakonia* sp. UYFA343, *Pantoea* sp. UYFA344, *Escherichia* sp. UYFA346, *Bacillus* sp. UYFA348, *Pantoea* sp. UYFA357, *Kosakonia* sp. UYFA358, *Pseudomonas* sp. UYFA359, *Erwinia* sp. UYFA360, *Erwinia* sp. UYFA361, *Kosakonia* sp. UYFA362, *Kosakonia* sp. UYFA363 presentaron cierto

nivel de inhibición en su crecimiento al co-inocularse en placa con la cepa UYFA156 (Vaz Jauri et al. 2022) (Figura 4.2) (Tabla 4.1). Sin embargo, no se observó inhibición del crecimiento al estudiar el mismo grupo de cepas crecidas bajo una sobrecapa de medio de cultivo TSA agregada sobre el cultivo de la cepa UYFA156.

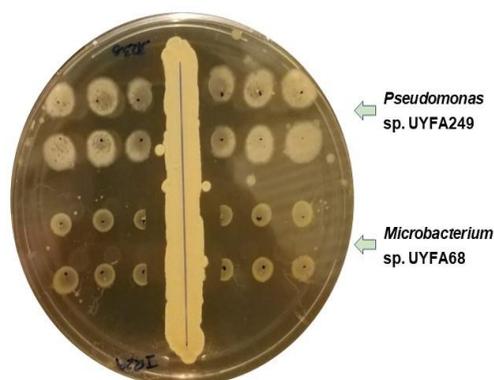


Figura 4.2. Ejemplo del análisis del efecto inhibitorio de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 sobre otras cepas bacterianas endofíticas de festuca.

Tabla 4.1. Ensayos de inhibición por difusión en agar de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 sobre otros endófitos de festuca de los cultivares Don Tomás (DT) y Tacuabé (Ta) y hongos fitopatógenos. La inhibición se calificó sobre bases cualitativas, en una escala de 0 a 3: 0, sin inhibición; 1, inhibición apenas visible; 2, inhibición notoria; 3, inhibición total (ausencia de crecimiento).

Microorganismo blanco	Cultivar	Inhibición
<i>Microbacterium</i> sp. UYFA61	DT	2
<i>Microbacterium</i> sp. UYFA68	DT	3
<i>Pseudomonas</i> sp. UYFA249	DT	2
<i>Kosakonia</i> sp. UYFA343	DT	2
<i>Pantoea</i> sp. UYFA344	DT	3
<i>Escherichia</i> sp. UYFA346	DT	2
<i>Bacillus</i> sp. UYFA348	DT	3
<i>Pantoea</i> sp. UYFA349	Ta	3
<i>Kosakonia</i> sp. UYFA350	Ta	3
<i>Pseudomonas</i> sp. UYFA352	Ta	3
<i>Erwinia</i> sp. UYFA354	Ta	3
<i>Erwinia</i> sp. UYFA355	Ta	3
<i>Kosakonia</i> sp. UYFA357	Ta	3
<i>Kosakonia</i> sp. UYFA358	Ta	3
<i>Alternaria brassicicola</i>	-	2
<i>Botrytis cinerea</i>	-	2

La inhibición del crecimiento observada por parte de la cepas UYFA156 sobre otras cepas bacterianas endofíticas de plantas de festuca concuerda con los resultados del análisis del genoma de la cepa UYFA156 presentado en el capítulo anterior. Aquellos resultados mostraron que la cepa UYFA156 es potencialmente capaz de producir diversos metabolitos con capacidad de modular el crecimiento de otras cepas bacterianas. Esta característica, explicaría los resultados obtenidos en los experimentos en monocapa, si bien éstos difieren de los obtenidos en el experimento en bicapa. En éstos últimos es posible que el o los metabolito/s moduladores no se difundieran suficientemente a través de la segunda capa. Las bacterias del género *Streptomyces* son ampliamente conocidas por su producción de metabolitos secundarios, principalmente antibióticos (de Lima Procópio et al. 2012). Esta característica apoya la hipótesis de que la modulación del crecimiento de otros miembros de la microbiota endofítica de festuca observada *in vitro* es consecuencia de la producción de dichas biomoléculas. A partir de los resultados obtenidos surge la pregunta de si los efectos de la cepa UYFA156 son solo inhibitorios, o también es capaz de inducir la producción de otros metabolitos secundarios (ej fitohormonas), por parte de otras bacterias endofíticas de festuca. Un abordaje para responder esta pregunta podría ser la selección de cepas endofíticas de festuca para evaluar su capacidad de producir compuestos bioactivos para la planta en presencia de la cepa UYFA156.

4.4.2 Análisis del efecto del sobrenadante del medio de cultivo de la cepa UYFA156 sobre el crecimiento de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68.

Teniendo en cuenta los resultados previos, se seleccionó la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, productora de la fitohormona ácido indolacético, PCV del cultivar SFRO Don Tomás, y relacionada filogenéticamente con la cepa UYFA156, ya que ambas son Actinobacterias. En esta cepa se evaluó en una primera etapa, el efecto del sobrenadante de un medio de cultivo de la cepa UYFA156 sobre su crecimiento. Los resultados mostraron que el crecimiento de la cepa UYFA68 se vio afectado, dependiendo del tipo de medio en el cual se cultivó la cepa UYFA156 previamente. Particularmente, cuando el medio TSB 30 g/L donde crece la cepa UYFA68 se suplementa con 50% del sobrenadante de la cepa UYFA156 proveniente del medio ISP2 tras 72h de crecimiento (condición +SN ISP2), el crecimiento de la cepa UYFA68 resultó inhibido respecto al control con ISP2 sin inocular (Figura 4.3.a). Contrariamente, cuando el medio donde crece la cepa UYFA68 se suplementa con el sobrenadante de la cepa UYFA156 crecida en TSB tras 72 h (condición +SN TSB), el crecimiento de la cepa UYFA68 aumentó en comparación con el control sin sobrenadante. (Figura 4.3.b).

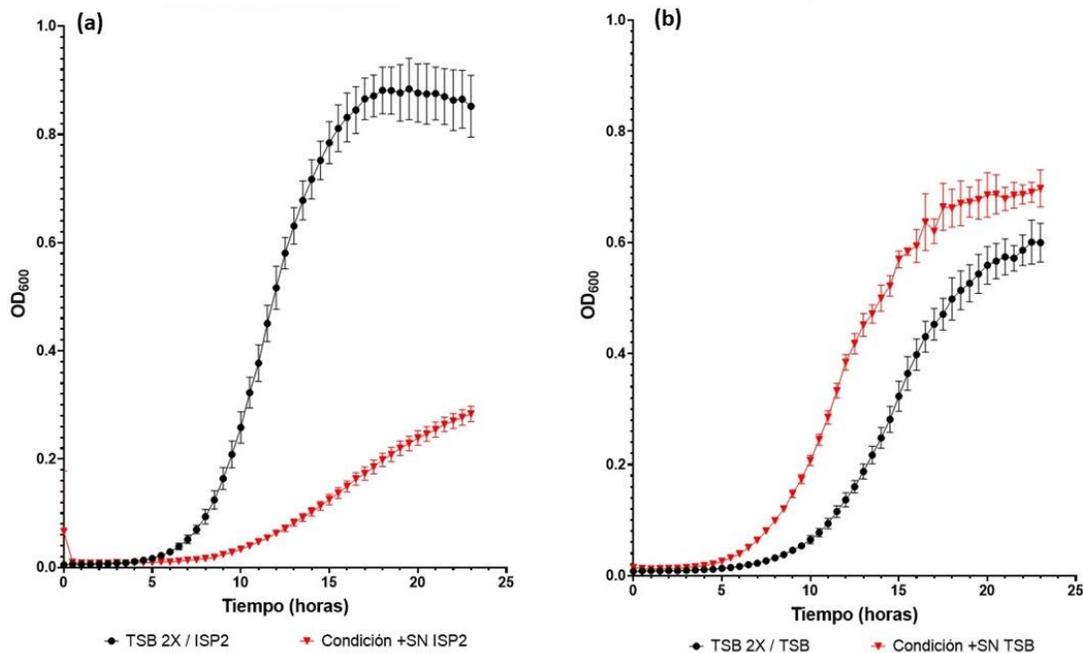


Figura 4.3 Efecto del sobrenadante de la cepa UYFA156 sobre el crecimiento de UYFA68. (a) Crecimiento de la cepa UYFA68 expuesta al sobrenadante de cultivo de la cepa UYFA156 en ISP2 diluido al 50% (condición +SN ISP2, rojo), y a medio ISP2 fresco diluido al 50% (condición control, negro). (b) Crecimiento de la cepa UYFA68 expuesta al sobrenadante de cultivo de la cepa UYFA156 en TSB diluido al 50% (condición +SN TSB, rojo), y a medio TSB fresco diluido al 50% (condición control, negro). Todas las diluciones se realizaron sobre medio de cultivo fresco TSB2X.

La inhibición del crecimiento de *Microbacterium* UYFA68 por parte del sobrenadante de la cepa UYFA156 es concordante con la ya mencionada característica de los *Streptomyces*, que es la producción de compuestos con actividad antibiótica. Se encuentra extensamente reportado que la capacidad de éste género de producir metabolitos secundarios capaces de afectar el crecimiento de otros microorganismos depende de diferentes factores. Los resultados observados en este trabajo de tesis concuerdan con lo reportado sobre el efecto de los componentes del medio de cultivo en la capacidad de las cepas de *Streptomyces* de producir diferencialmente compuestos bioactivos. En este sentido se ha reportado, por ejemplo, que la disponibilidad de hierro, dada por un descenso del pH en el medio de cultivo, afecta la capacidad de *Streptomyces* de producir compuestos volátiles que influyen la exploración de las raíces por parte de la planta hospedera y modifican la dinámica de la comunidad endofítica (Jones et al. 2019). Asimismo, existen trabajos que reportan que la fuente de carbono y nitrógeno del medio de cultivo afecta la capacidad inhibitoria de la cepa de *S. albidoflavus* C247 (Islam et al 2009). En estos reportes, la capacidad inhibitoria fue máxima cuando la fuente de C era maltosa o sacarosa o cuando la fuente de N era orgánica. A su vez, el pH inicial del medio y la temperatura de incubación, también han sido factores que afectan la capacidad

inhibitoria de la cepa C247, siendo máxima a pH=6,5 y 30°C (Islam et al. 2009). Además, otros reportes demuestran la capacidad de producir antibióticos por la cepa *Streptomyces* BT-408, siendo óptima para inhibir la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente cuando fue crecida en medio de cultivo con glucosa como principal fuente de carbono, seguido por fructosa y glicerol (Sujatha et al. 2005).

4.4.3. Análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de la cepa UYFA156 sobre la producción de auxinas por la cepa UYFA68

Siguiendo con la finalidad de determinar si la cepa UYFA156 afecta la actividad de otros miembros de la misma microbiota, en una segunda etapa se evaluó el efecto del sobrenadante de la cepa UYFA156, sobre la actividad de la cepa UYFA68, particularmente sobre la producción de auxinas, potencialmente involucradas en la promoción del crecimiento vegetal. Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de Trp, precursor de la mayoría de las vías de producción de auxinas.

Los resultados mostraron una diferencia significativa en la relación AIA/DO para la cepa UYFA68 tras 24 horas de incubación en presencia del sobrenadante de la cepa UYFA156 crecida en ISP2 y en ausencia de triptófano (+SN ISP2/TSB; Figura 4.4.a; ANOVA $p < 0,001$), aunque a las 72 h las diferencias ya no fueron significativas (Figura 4.4.b). Sin embargo, cuando se adiciona Trp al medio no se observan diferencias significativas para la relación AIA/DO de la cepa UYFA68 tras 24 ni 72 horas de incubación. Esta no detección de una diferencia significativa a las 24 h podría deberse a la gran dispersión de los datos para la condición +SN ISP2/TSB/Trp (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio habían demostrado una fuerte inducción de la producción de AIA por UYFA68 al crecer en presencia del sobrenadante de UYFA156 cultivada en el medio TSB.

Estos resultados muestran la capacidad de la cepa UYFA156 de modular la capacidad fisiológica de producir AIA en la cepa UYFA68. Como se mencionó, en este ensayo se realizó una curva de calibración con concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μM de AIA. Sin embargo, no fue posible la cuantificación de AIA producido por la cepa UYFA68 dado que los valores de absorbancia obtenidos a 540 nm se encuentran por debajo del rango de linealidad.

La posibilidad de la estimulación de la producción de auxinas por parte de la microbiota endofítica de festuca in planta, por parte de la cepa UYFA156, podría desencadenar en un mayor desarrollo vegetal. A su vez, este crecimiento y mayor desarrollo del sistema radicular permitirá una mayor captación de nutrientes, mejorando las condiciones del hábitat de la microbiota, y en particular, de la cepa UYFA156.

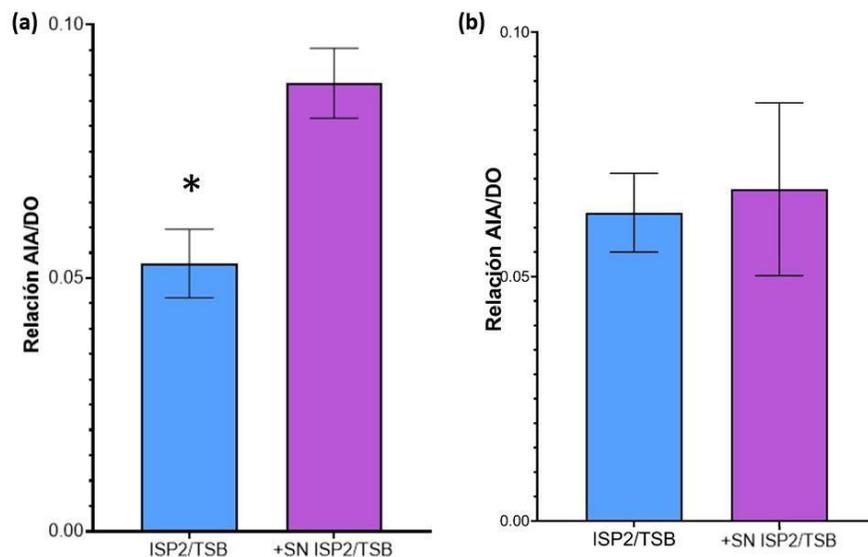


Figura 4.4. Producción de AIA por parte de la cepa UYFA68 normalizada por su crecimiento (Ab_{540}/Ab_{600}), en el medio TSB con el agregado del sobrenadante de UYFA156 crecida en ISP2 (+SN ISP2/TSB) en comparación con la condición control (con ISP2 fresco) tras 24 h de incubación (a) y tras 72 h de incubación (b). Se observan diferencias significativas entre tratamiento y control en la relación AIA/DO a las 24 horas de incubación, pero no tras 72 horas.

Como se mencionó anteriormente, estos resultados son parte del trabajo publicado en el artículo “Differential modulation of the bacterial endophytic microbiota of *Festuca arundinaceae* (tall fescue) cultivars by the plant-growth promoting strain *Streptomyces albidoflavus* UYFA156” (Vaz Jauri et al. 2022). En esta publicación también se reporta el efecto de la inoculación de la cepa UYFA156 sobre la microbiota *in planta*, mediante análisis de secuenciación masiva. En este trabajo se demostró que la composición del microbioma del cultivar SFRO Don Tomás se ve significativamente alterada tras la inoculación con la cepa UYFA156. Sin embargo, en el cultivar Tacubé, los cambios debidos a la inoculación son más lentos y menos significativos. Asimismo, los resultados mostraron que la promoción del crecimiento por parte de la cepa UYFA156 se acompaña de un efecto en la diversidad y composición endofítica.

En su conjunto, los resultados sugieren que existe una regulación de la composición y la actividad de la microbiota endofítica asociada a festuca al inocularse la cepa UYFA156

CAPÍTULO 5

PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LA CEPA *Microbacterium* sp. UYFA68 EN PRESENCIA DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA *Streptomyces* SP. UYFA156

5.1 ANTECEDENTES

Como se indicó en el capítulo anterior, la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 aumenta su producción de auxinas en presencia de sobrenadante de un cultivo de *S. albidoflavus* UYFA156 tanto cuando esta última se cultiva en medio líquido TSB como en ISP2.

Si bien sabemos que existe una alteración de la composición del microbioma en presencia de *S. albidoflavus* UYFA156, los resultados de estimulación de la producción de AIA en UYFA68 indican una influencia de UYFA156 sobre la expresión de características fisiológicas de otras cepas originarias del mismo ambiente. Esta modificación de la expresión del fenotipo puede deberse a cambios en la regulación de la expresión génica en la cepa UYFA68 a diferentes niveles. Se plantea entonces la hipótesis de que esta modulación de la actividad observada en la cepa UYFA68 está modulada a nivel transcripcional.

5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analizar el efecto a nivel transcripcional del sobrenadante del medio de cultivo de la cepa UYFA156, sobre el transcriptoma de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Diseño experimental del ensayo de transcriptómica

Para el análisis del efecto del sobrenadante de cultivo de *S. albidoflavus* sp. UYFA156 sobre la expresión génica de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, se cultivaron cuatro réplicas biológicas de la cepa UYFA68 en presencia del sobrenadante de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 previamente crecida en los medios de cultivo TSB e ISP2 (+SN TSB/TSB y + SN ISP2/TSB, respectivamente). Como

condición control se creció la cepa UYFA68 en ambos medios, pero sin exposición a los sobrenadantes mencionados (n total =16).

El sobrenadante se preparó inoculando 100 mL de los medios de cultivo TSB o ISP2, con 1 mL de una suspensión de esporas de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 de 1×10^9 ufc/mL, incubándose durante 72 horas a 30°C y 200 rpm. Posteriormente se cosecharon las células por centrifugación a 5000 *g* durante 15 minutos y los sobrenadantes obtenidos se filtraron asépticamente. Los sobrenadantes filtrados se mezclaron con el medio fresco TSB2X (1:1), y se inocularon con la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68. Dichos cultivos se incubaron por 12 y 24 horas a 30°C como se menciona en la sección 4.3.2 del capítulo 4. Las células se recolectaron por centrifugación a 4000 *g* por 15 minutos a 4°C y se almacenaron a -80°C para la posterior extracción de ARN bacteriano (Figura 5.1).

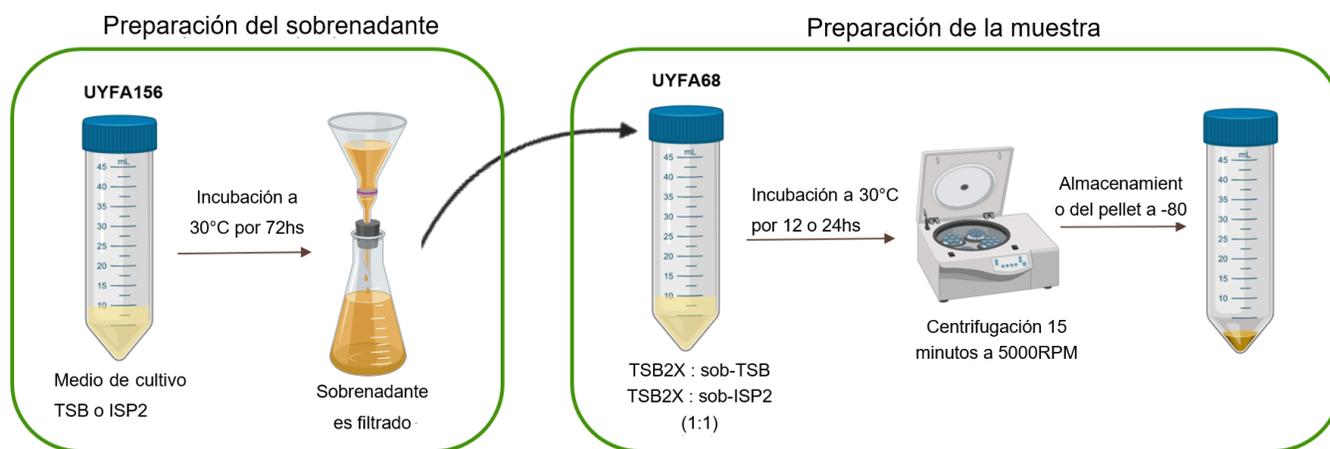


Figura 5.1. Diagrama de trabajo utilizado para el análisis del efecto del sobrenadante de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156 sobre la expresión génica de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68.

5.3.1.2 Extracción de ARN total

Se extrajo el ARN total de cada muestra, utilizando el kit RNeasy Mini Kit de QIAGEN. Para esto en primera instancia, se resuspendió el *pellet* en 600 μ L Trizol y 4 μ L glicógeno 20 μ g/ μ L (Invitrogen™). La suspensión se transfirió a tubos O-ring conteniendo 500 μ L de beads y se realizó una lisis celular mecánica en el homogeneizador Mini Beadbeater-16 (Biospect Products), agitando tres veces por 30 segundos con intervalos de 1 minuto en hielo. El lisado se centrifugó a 12000 *g* durante 2 minutos, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo libre de ARNasas. Las proteínas presentes en la muestra se desnaturalizaron mediante la adición de 400 μ L de cloroformo. Posteriormente se homogeneizó por inversión y se centrifugó 10 minutos a 12000 *g*. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo libre de ARNasas, al que se le agregaron 550 μ L de buffer RLT (Qiagen), diseñado para la lisis de tejidos previo a la extracción de ARN (1), con β -mercaptoetanol al 1% y 400 μ L de etanol

99%. Los tubos se mezclaron por inversión y se transfirieron a columnas de RNeasy Mini kit. Luego, se realizaron tres lavados al ARN unido a la columna, adicionando 700 μL de buffer RW1 la primera vez y dos veces con buffer RPE. Entre cada lavado se centrifugó la columna 30 segundos a 12000 g para eluir el buffer de lavado. La columna se colocó en un nuevo tubo y se resuspendió el ARN agregando 30 μL de agua DEPC (Diethylpolycarbonato, por su sigla en inglés) (ANEXO 2.6) directamente sobre la columna. Finalmente, el ARN se eluyó centrifugando 1 minuto a 9000 g y se agregó 1 μL de SUPERase-In™ 20 U/ μL (Invitrogen™) para inhibir las ARNasas. Durante toda la extracción los tubos con ARN se mantuvieron en hielo para minimizar su degradación.

El ARN obtenido se cuantificó por absorbancia a 260nm en el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometric (Thermo Scientific™), verificándose que la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ fuera mayor a 2. Asimismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sybr™Safe (Invitrogen™) para comprobar que el ARN no hubiera resultado degradado durante su extracción.

5.3.1.3 Preparación de las librerías de ARN para su secuenciación

Desfosforilación del ARN y degradación del ADN

La preparación de las muestras para la secuenciación del ARN (RNAseq) se realizó según el protocolo de (Jensen et al. 2017) (Figura 5.2). Esta técnica tiene como objetivo la formación de ADN para secuenciar, a partir del ARN extraído de la muestra. Para ello se genera ADNc a partir del ARN, y luego dicho ADNc se amplifica por PCR para obtener ADN doble cadena. A su vez, dado que el secuenciador secuencia ADN proveniente de diferentes condiciones experimentales, es necesario la adición de adaptadores y códigos de barra para su diferenciación.

El ARN extraído se alicuotó de forma de contener 600 μg en un volumen de 16 μL . Cada alícuota se fragmentó en secuencias de aproximadamente 200 pb y se desfosforiló el extremo para la posterior unión de un adaptador en 3', todo esto mediante la adición de 4 μL de buffer Fast AP (Thermo Scientific™) y su incubación por dos minutos y medio a 94°C. El ARN fragmentado se trató con 4 μL de TURBO DNase 2 U/ μL (Invitrogen™) y se llevó a un volumen final de 40 μL mediante el agregado 1 μL del inhibidor de ARNasas recombinante de origen murino (40 U/mL) (M0314L - New England Biolabs® Inc.), 10 μL de buffer Fast AP y 5 μL de agua DEPC. La suspensión se incubó durante 30 minutos a 30°C, permitiendo la degradación del ADN presente en la muestra.



Figura 5.2. Esquema de trabajo para la preparación del ARN para su secuenciación.

5.3.1.4 Remoción de enzimas y buffers de las muestras

El volumen de reacción se llevó a 60 μL mediante el agregado de agua DEPC y se agregaron *beads magnéticos*. Enzimas y buffers previamente agregados se eliminaron con 2 volúmenes de RNAClean XP (Beckman Coulter - Life Sciences), incubándose 15 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la unión de ARN a los *beads* magnéticos. A continuación, los tubos se colocaron en un rack magnético, el cual atrae los *beads* unidos al ARN al fondo del tubo. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 200 μL de alcohol 70%, incubando durante 30 segundos cada vez. El alcohol remanente se dejó evaporar durante 10 minutos a temperatura ambiente. El ARN se eluyó mediante el agregado de 12 μL de agua DEPC y agregándose 1 μL de SUPERase-In™ 20 U/ μL (ver Figura 5.3).

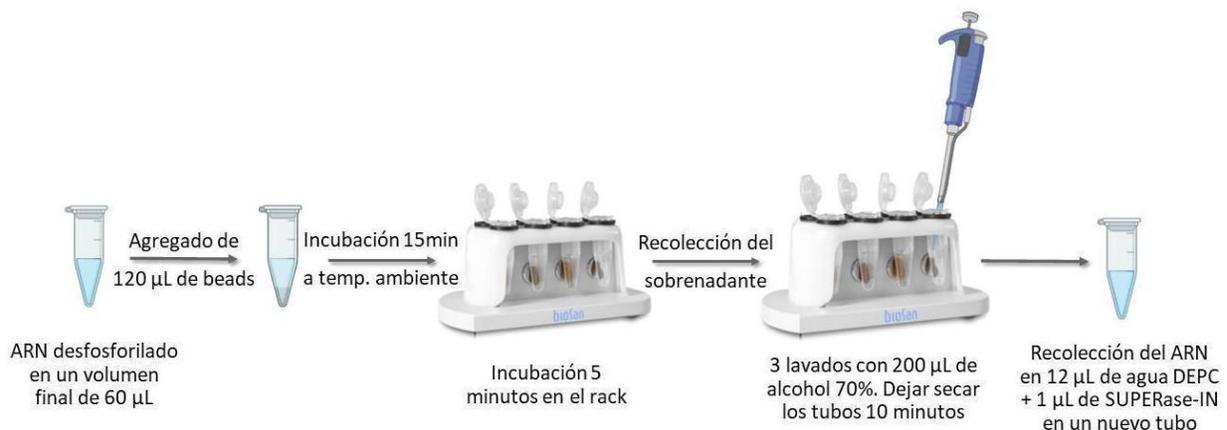


Figura 5.3. Esquema de trabajo utilizado para la remoción de enzimas y buffer de la muestra conteniendo el ARN de interés.

5.3.1.5 Ligación de códigos de barra

Para cada muestra, se tomaron 5 μL de ARN desfosforilado y lavado y se le agregó 1 μL de un adaptador con el código de barra a utilizar (ver ANEXO 4.2.1) a partir de una concentración stock de 100 mM. Los tubos con la mezcla se incubaron 2 minutos a 72°C para luego ser transferidos rápidamente en hielo. Posteriormente se agregaron 16 μL de una mezcla de reacción conteniendo 2 μL de 10x buffer T4 RNA ligase (New England Biolabs® Inc.), 1,8 μL de DMSO 100% (Thermo Fisher Scientific Inc.), 8 μL de poli-etilenglicol (PEG) 50%, 0,2 μL de ATP 100 mM, 0,3 μL de inhibidor de ARNasas murina (40 U/mL) y por último 1,8 μL de T4 RNA ligase1 30.000 U/mL (New England Biolabs® Inc.). Para la reacción de ligación se incubó 90 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 60 μL de buffer RLT a cada ligación para inhibir la actividad ligasa.

5.3.1.6 Formación de *pools*

Se formaron *pools* (mezclas) de aquellas muestras con diferentes adaptadores utilizando el kit RNA Clean & Concentrator (Zymo Research - C1004). Para esto, los productos de ligación se unieron con diferentes adaptadores a una misma columna IC Zymo-Spin. Una vez unidas todas las muestras, se agregaron 400 μL de buffer Prep (provisto por el kit C1004) y luego 700 μL de buffer de lavado. Entre cada uno de estos pasos se centrifugó 30 segundos a 12000 *g*. Luego, se realizó un segundo lavado con 400 μL de buffer de lavado, tras lo cual se centrifugó 2 minutos a 12000 *g*. La columna se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 16 μL de agua DEPC centrifugándose 30 segundos a 12000 *g*, permitiendo eluir el ARN.

5.3.1.7 Remoción del ARNr

Una vez generados los *pools* con las diferentes muestras, se removió el ARNr con una sonda de unión a los *beads* RiboPOOL (siTOOLS Biotech). Los *beads* de estreptavidina a utilizar requieren un pretratamiento, para una correcta unión de la sonda. Para esto 80 μL de la suspensión de *beads* 10 mg/mL se trataron con 1 mL de solución de resuspensión (SR – ANEXO 2.7.3), incubando la mezcla por 2 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se colocó en un rack magnético y, tras 1 minuto de incubación, se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez, posterior a lo cual se agregó 1 mL de solución de lavado (SL – ANEXO 2.7.4). Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 160 μL de buffer de unión 2X (2BU – ANEXO 2.7.1), homogeneizando con la pipeta 10 veces. Para la unión de las sondas RiboPOOL al ARN, a 14 μL de ARN eluidos de la columna IC Zymo se le agregó 1 μL de sonda y 5 μL de 2BU. Se agregaron 60 μL de buffer de dilución (BD – ANEXO 2.7.2) y 20 μL de la solución conteniendo el ARNr unido a la sonda, a 80 μL de *beads* de estreptavidina previamente tratados (primera depleción). A continuación, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, golpeteando los tubos cada 2 - 3 minutos. Posteriormente a 80 μL de *beads* de estreptavidina se colocaron en el rack magnético y se extrajo el sobrenadante (segunda depleción). Se dio un *spin*

down a la primera depleción y se colocó en el rack magnético por 2 minutos. El sobrenadante de estos tubos fue cuidadosamente transferido a los tubos de la segunda depleción. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, golpeando suavemente los tubos cada 2 - 3 minutos. Se dio un *spin down* y se colocó en el rack magnético por 2 minutos. El sobrenadante conteniendo el ARN no ribosomal (el cual no se une a los *beads*), se transfirió a un nuevo tubo libre de ARNasas. Este último paso se repitió para asegurar la completa eliminación de los *beads*. Nuevamente se realiza una limpieza del ARN obtenido como se describe anteriormente. En este caso la columna se usó solamente para la eliminación de buffers y enzimas de reacción, no para la formación de nuevos *pools*.

5.3.1.8 Síntesis de ADN copia (ADNc)

A 12 μL de ARN no ribosomal de cada *pool* se le agregaron 2 μL del cebador AR2 25 mM (ver ANEXO 4.3.1) y se incubó a 70°C. Luego de 2 minutos se transfirieron los tubos rápidamente a hielo. A estos tubos se les agregó 6 μL de la mezcla de reacción, consistiendo en: 2 μL de buffer 10x AffinityScript RT, 2 μL de DTT 100 mM, 0,8 μL de dNTPs 25 mM, 0,4 μL de inhibidor de ARNasas murina (40 U/mL) y 0,8 μL de la enzima AffinityScript RT. La mezcla se homogeneizó, se le dio un *spin down* y se incubó la mezcla 55 minutos a 55°C.

5.3.1.9 Degradación del ARN

Con este fin, en primera instancia se agregó 0,1 Vol. de NaOH 1 M preparado en el momento, a cada tubo de reacción, incubándose por 12 minutos a 70°C, permitiendo así la hidrólisis del ARN. Posteriormente se neutralizaron las soluciones agregando 4 μL de ácido acético 500 mM. A continuación, se realizó una segunda depleción de enzimas y buffers con pequeñas modificaciones (ver sección 5.3.1.4), utilizando en esta ocasión AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc.), de unión al ADN obtenido durante la síntesis de ADNc. Al recuperar el ADNc, el sobrenadante no se transfirió a un nuevo tubo, sino que se continuó trabajando con los *beads*.

5.3.1.10 Ligación de adaptador 3Tr3

A la suspensión obtenida en el paso anterior se le agregaron 2 μL del adaptador 3Tr3 40 mM (ver ANEXO 4.2.1) y se incubó a 72°C. Luego de 2 minutos los tubos se transfirieron rápidamente al hielo. A continuación, se le agregaron 13 μL de una mezcla de reacción conteniendo 2 μL de buffer 10x T4 RNA ligase, 0,8 μL de DMSO 100%, 0,2 μL de ATP 100 mM, 8,5 μL de poli-etilenglicol (PEG) y por último 1,5 μL de T4 RNA ligase1. La ligación se incubó 16 horas a temperatura ambiente. Se realizaron dos limpiezas del producto de ligación como se describe en la sección 5.3.1.4, para eliminar los adaptadores no ligados. La segunda limpieza se realizó agregando 1,5 Vol. de *beads*, en lugar de 2 Vol. La elución del ADNc se realizó en 25 μL de agua DEPC en ambos casos.

5.3.1.11 Reacción de PCR para la secuenciación de las librerías

Para la reacción de PCR se utilizaron los cebadores RTS_Enr_P5 complementario al cebador 3Tr3 y RTS_Enr_P7_BC01, RTS_Enr_P7_BC 02 o RTS_Enr_P7_BC 04 (ANEXO 4.3.1), dependiendo del adaptador agregado durante la primera ligación. La mezcla de reacción consistió en 22 µl de agua desionizada estéril, 10 µl de buffer 5X Q5® (New England Biolabs® Inc.), 0,5 µl de dNTPs 25 mM, 2,5 µl de cada cebador, 10 µL de ADNc y 2,5 µl de la polimerasa Q5® High Fidelity de concentración 2000 U/ml (New England Biolabs® Inc.). Luego de la amplificación, se realizó una limpieza del producto de PCR (ver sección 5.3.1.4) con el fin de eliminar buffers y cebadores remanentes de la PCR.

El programa empleado para la reacción de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98°C, seguido de 17 ciclos de 30 segundos a 98°C, 25 segundos a 68°C y 15 segundos a 72°C. Por último, se realizó una extensión final de 2 minutos a 72°C.

5.3.1.12 Verificación del producto obtenido y secuenciación

El tamaño de banda y la concentración de las secuencias obtenidas se verificaron por electroforesis capilar en TapeStation (Agilent Technologies, Inc.) y por fluorescencia, utilizando fluoróforos de unión específica al ADN (Qubit - Thermo Scientific™). Las muestras se secuenciaron en la plataforma Illumina NextSeq500 con NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (ID: 20024908) con una profundidad de 75 ciclos.

5.3.2 Análisis bioinformático de los transcriptomas obtenidos

Los datos crudos de secuenciación se procesaron y analizaron usando el *pipeline* Aerobio desarrollado por Jon Anthony, Boston College, Estados Unidos (Plataforma Aerobio 2.3.0 disponible en <https://github.com/jsa-aerial/aerobio>) (Anthony, J. S. & van Opijnen, T. A. 2019). Éste análisis consistió de cuatro pasos: demultiplexado, recorte (*trimming*), mapeo y cálculo de expresión diferencial. Inicialmente, las lecturas sin procesar se separaron de acuerdo a sus códigos de barra (*demultiplex*) para diferenciar a qué muestra pertenece cada lectura primero por el extremo 5' y luego por el extremo 3'. Posteriormente se eliminaron las secuencias de cebadores, adaptadores y códigos de barra (*trimming*) (Shishkin et al. 2015), (Langdon 2015), se recortaron a 59 pb y se realizó un filtrado por calidad de secuencia mediante un test Q14 con un punto de corte del 96%. Las lecturas filtradas fueron mapeadas contra los genomas de referencia utilizando *bowtie2* con los siguientes parámetros (-D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S, 1, 0.50). Las lecturas mapeadas se cuantificaron y asignaron por gen utilizando featureCounts (Liao et al. 2014). Por último, se calculó la expresión diferencial mediante el paquete bioinformático DESeq2 (Love et al. 2011) (Figura 5.4). DESeq2 realiza una normalización interna donde se calcula la media geométrica para cada gen en todas las muestras. Los recuentos de un gen en cada muestra se dividen por esta media. La mediana de estas

razones en una muestra es el factor de tamaño para esa muestra. Este procedimiento corrige el tamaño de la biblioteca y el sesgo de composición del ARN, que puede surgir, por ejemplo, cuando sólo un pequeño número de genes se encuentran altamente expresados en una condición experimental pero no en la otra.

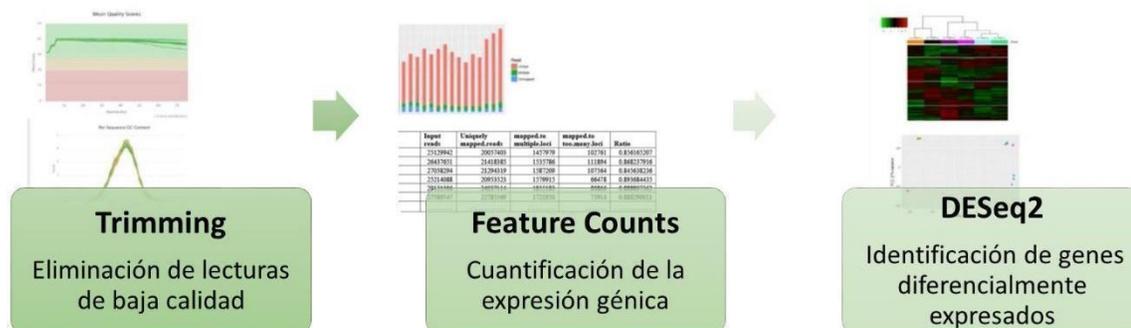


Figura 5.4. Esquemización del procesamiento bioinformático de las lecturas obtenidos en la secuenciación.

En este trabajo se consideró que un gen fue expresado diferencialmente entre dos condiciones cuando la diferencia de expresión fue más del triple ($|\log_2\text{-fold change}| > 1,5$) y el valor p ajustado para múltiples comparaciones es menor a 0,05 ($\text{padj} < 0,05$). A su vez, de la lista de genes diferencialmente expresados se eliminaron aquellos genes que no se encontraron en al menos 2 réplicas biológicas.

Los genes diferencialmente expresados se contrastaron para cada condición problema con los genes pertenecientes a *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios identificados mediante el antiSMASH (Medema et al. 2011a). A su vez, la totalidad del transcriptoma se analizó mediante el software [blastKOALA](#) de la plataforma [KEGG](#) (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

5.3.3 Extracción de ADNg de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, purificación y secuenciado.

Para poder realizar el mapeado de los genes expresados por parte de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 fue necesaria la secuenciación de su genoma. Para ello, se realizó la extracción de ADNg de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 usando el DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) con modificaciones, a partir de un cultivo en fase exponencial con una DO_{600} de 0,2. El ADNg se cuantificó en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific™) y por fluorometría con Qubit (Thermo Scientific™), alcanzando una concentración de 200 ng/ μL . La integridad se verificó en un gel de agarosa al 1 % con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sybr™Safe (Invitrogen™). El ADN obtenido fue secuenciado, mediante el kit *NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5* (ID: 20024908) con 300 ciclos en la plataforma Illumina NextSeq500. Las secuencias obtenidas fueron gentilmente procesadas por el Dr. Federico Rosconi

mediante el software SPAdes y el genoma curado se anotó en el servidor RAST (<http://rast.theseed.org>).

5.3.4 GhostKoala

El análisis de las lecturas obtenidas mediante RNAseq se realizó mediante la plataforma GhostKoala. El GhostKoala es un servidor de anotación automática para secuencias de genoma y metagenoma que permite la asociación de las lecturas a proteínas con función. Para ello, realiza asignaciones de KO (ortología KEGG) para caracterizar funciones de genes individuales y reconstruir vías KEGG para inferir funciones de alto nivel del organismo o el ecosistema (Kanehisa et al. 2016).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Análisis genómico de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68.

Luego del procesamiento y ensamblado de las lecturas, el genoma se anotó con el servidor RAST (<http://rast.theseed.org>). Se analizó la especie a la cual pertenece la cepa de *Microbacterium* sp. UYFA68 mediante el servidor JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>). El algoritmo utilizado por JSpeciesWS basa su análisis en una comparación de la identidad nucleotídica promedio (ANI) y del índice de correlación de las firmas de tetra-nucleótidos entre el genoma de interés y los genomas de referencia depositados en la base de datos. Sin embargo, los valores de ANI obtenidos resultaron menores al límite establecido para la adjudicación de una cepa como perteneciente a una especie.

Asimismo, dada la capacidad PCV de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68, se buscaron genes potencialmente involucrados con la promoción del crecimiento vegetal, particularmente de auxinas, mediante la plataforma RAST.

5.4.2. Análisis genómico preliminar de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68

Los resultados de los análisis de la secuenciación de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 mostraron que su genoma está compuesto por 3.385.068 pb y presenta un contenido GC de un 69,7 %, correspondiente a lo esperado para un genoma proveniente del filo *Actinobacteria* (Kieser 2000). La cepa en estudio no presenta homología suficiente con ninguna especie de referencia como para su clasificación a nivel de especie de acuerdo al análisis realizado en la plataforma JSpecies. La especie más cercana, *Microbacterium binotii*, presenta un ANIb de 74,93 %, muy inferior al 95 %

necesario para considerar dos cepas como pertenecientes a la misma especie. Dicha especie se encuentra reportada como asociada a organismos eucariotas fotótrofos (Mitra et al. 2021).

Mediante la plataforma RAST se lograron identificar 3.287 secuencias codificantes en el genoma de la cepa UYFA68, de las cuales 1261 (38 %) corresponden a proteínas hipotéticas. A su vez, dentro del total de genes identificados, 822 de ellos (25 %) pudo ser asignado a un subsistema. Las secuencias codificantes identificadas y categorizadas se asociaron principalmente al metabolismo de carbohidratos (20 %), al metabolismo de aminoácidos y sus derivados (18 %), al metabolismo proteico (12 %) y producción de cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos (11,3 %) (ver Figura 5.5).

Por otra parte, el análisis del genoma se focalizó en la búsqueda de genes potencialmente involucrados con la promoción del crecimiento vegetal, particularmente de auxinas, ya que fue la característica detectada en condiciones *in vitro* (de los Santos et al 2016), así como afectada por el sobrenadante de la cepa UYFA156 en el capítulo anterior. Es así que a través de la plataforma RAST se detectaron cuatro genes relacionados al metabolismo secundario, siendo todos ellos vinculados a la producción de auxinas: triptofano sintasa – cadena α (EC 4.2.1.20), antranilato fosforibosiltransferasa (EC 2.4.2.18), triptofano sintasa – cadena β (EC 4.2.1.20) y monoamina oxidasa (EC 1.4.3.4). Si bien estos genes se encuentran relacionados a la producción de auxinas, no constituyen una vía metabólica completa. A su vez, se detectaron 14 secuencias codificantes involucradas en la producción de tiamina, un cofactor de la enzima triptofano pirolasa, necesaria para la biosíntesis de triptófano. Si bien se requieren estudios más profundos dirigidos a identificar en su totalidad las vías metabólicas en cuestión, éstos resultados remarcan la importancia de la producción de auxinas en la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68.

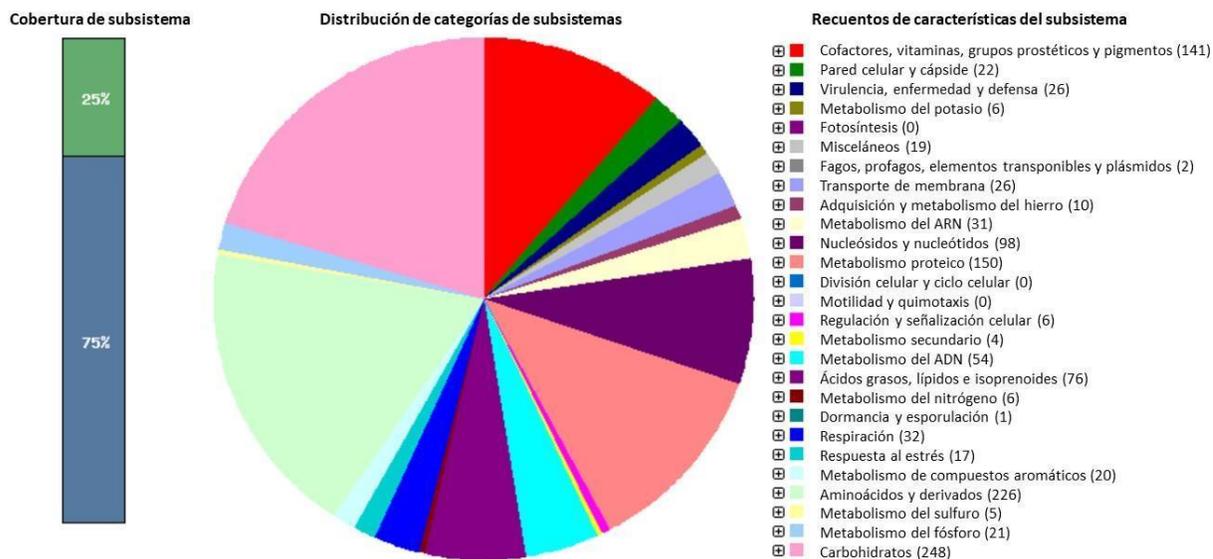


Figura 5.5. Diagrama de los diferentes subsistemas presentes y su abundancia, en el genoma de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 identificados mediante la plataforma RAST.

5.4.3. Perfil transcripcional de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 crecida en presencia del sobrenadante de la cepa *S. albidoflavus* UYFA156.

La profundidad de secuenciación del transcriptoma de la cepa UYFA68 en presencia del sobrenadante de la cepa UYFA156, definida como la cantidad de lecturas totales por muestra, fue en promedio, de 7.707.599.

A continuación, se presenta el análisis del perfil transcripcional de la cepa UYFA68 crecida en presencia del sobrenadante de la cepa UYFA156 crecida en medio de cultivo TSB (i) e ISP2 (ii), por 12 y 24 horas.

i- Cepa UYFA68 crecida en medio de cultivo TSB suplementado con el sobrenadante del medio de cultivo de la cepa UYFA156 crecida en TSB (+SN TSB/TSB)

12 horas de crecimiento: Los resultados de los análisis con el programa DESeq2 mostraron que, en estas condiciones, la cepa UYFA68 expresó un total de 1186 genes con calidad necesaria para el estudio de su expresión diferencial, de los cuales 45 fueron diferencialmente expresados considerando un $\text{Log}_2\text{FoldChange} > |2|$, $p < 0,05$, y 124 con un $\text{Log}_2\text{FoldChange} > |1,5|$. De éstos primeros, 26 se encontraron sobreexpresados y 19 subexpresados. Por otra parte, la plataforma

GhostKoala, permitió la anotación de solamente 647 de los mismos (54,6%) (Figura 5.6), y ninguno de los diferencialmente expresados se encontraron entre ellos. De los genes anotados por GhostKoala, 284 se corresponden a genes pertenecientes a vías metabólicas, 128 a genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios, 74 a genes involucrados en el metabolismo microbiano en diversos ambientes, 37 a genes relacionados al metabolismo del carbono, 46 a genes relacionados a la biosíntesis de aminoácidos y 49 a genes relacionados con la biosíntesis de cofactores. A este tiempo de incubación, ninguno de los genes anotados por la plataforma GhostKoala se encontró expresado diferencialmente ($p < 0.05$) en la cepa UYFA68 en presencia del sobrenadante de la cepa UYFA156 respecto a la condición control, con la cepa UYFA68 creciendo en medio TSB fresco.

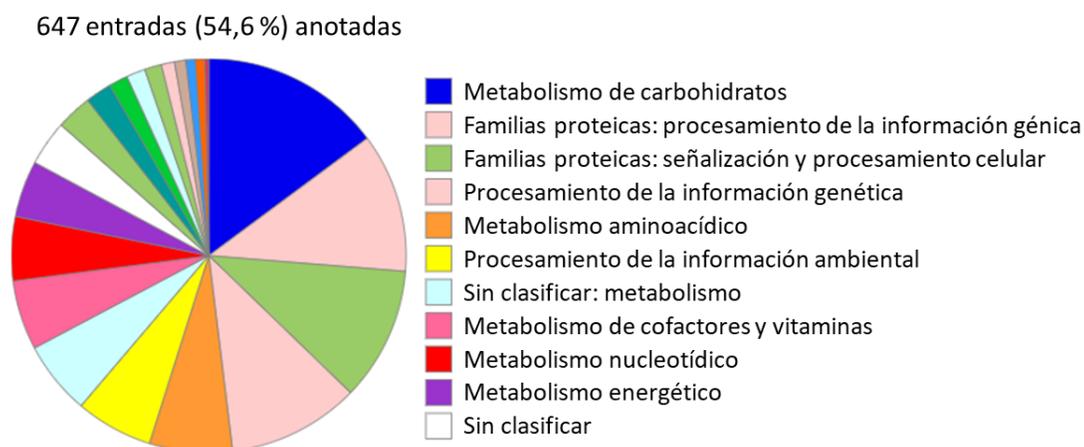


Figura 5.6. Categorización funcional de los 647 genes identificados por la plataforma GhostKoala, expresados por *Microbacterium* sp. UYFA68 tras 12 horas de incubación con el sobrenadante de la cepa UYFA156 de TSB (+SN TSB/TSB).

La plataforma RAST permitió la predicción de la función de los 45 genes diferencialmente expresados. Algunos de estos cambios se describen a continuación. Se observó una disminución de la expresión de genes de captación de manitol respecto al control ($\text{Log}_2\text{FoldChange}$ de entre $|2,57|$ y $|2,17|$), sugiriendo un cambio en las vías de adquisición y metabolismo del carbono. Es interesante resaltar que, en estas condiciones, un gen que codifica para una probable aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3), se sobreexpresó significativamente ($\text{Log}_2\text{FoldChange}$ de $|2,36|$), respecto a las condiciones control. Esta enzima está involucrada en la síntesis de AIA (Figura 5.7), mediante la síntesis de ácido indol-3-acetato, lo cual podría explicar el aumento en la producción de esta

fitohormona por parte de la cepa UYFA68 cuando la misma es incubada en presencia de sobrenadante de la cepa UYFA156 crecido en TSB.

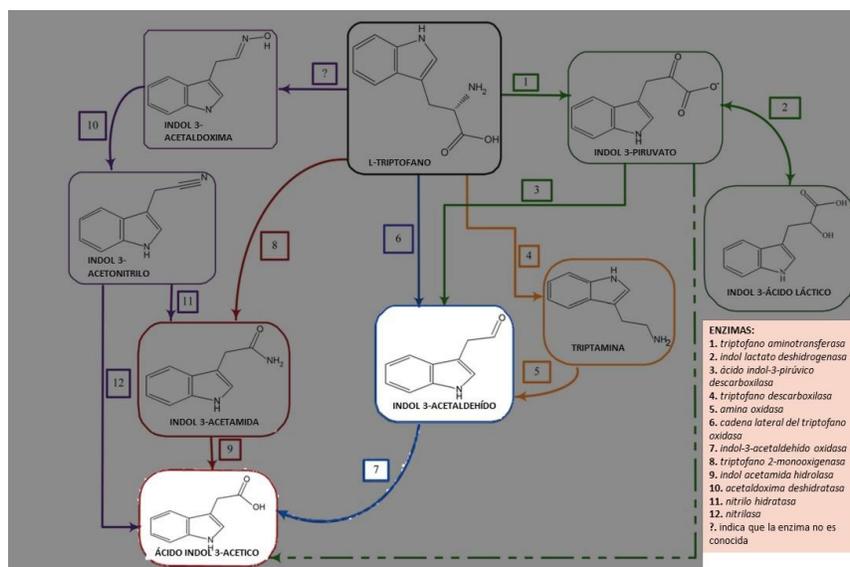


Figura 5.7. Representación esquemática de las vías conocidas de síntesis de AIA en bacterias. Se enfatiza la reacción enzimática catalizada por la enzima encontrada en los análisis de RNAseq. Modificado de (Olanrewaju et al. 2017).

-24 horas de crecimiento: En estas condiciones se identificaron un total de 891 genes expresados con calidad necesaria para el estudio de su expresión diferencial. Según los resultados del DESeq2, 9 resultaron diferencialmente expresados con un $\text{Log2FoldChange} > |2|$, y 47 con un $\text{Log2FoldChange} > |1,5|$, en todos los casos con $p < 0,05$. De éstos 891 genes, mediante la plataforma GhostKoala se lograron anotar un total de 490 (55%) (Figura 5.8). De los genes anotados, 183 se corresponden a genes pertenecientes a metabolismo celular basal, 90 a genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios, 56 a genes involucrados en el metabolismo exclusivamente microbiano, 26 a genes relacionados al metabolismo del carbono, 36 a genes relacionados a la biosíntesis de aminoácidos y 27 a genes relacionados con la biosíntesis de cofactores. Ninguno de los genes diferencialmente expresados pudo ser anotados por la plataforma GhostKoala. Sin embargo, dos proteínas probablemente asociadas a la interacción con sideróforos (según la anotación por RAST) fueron significativamente sobreexpresadas en presencia del sobrenadante ($\text{Log2FoldChange} |1,8|$ y $|2,2|$).

De todos los cambios de expresión mencionados a las 12 y 24 horas de incubación, 5 se detectaron en ambas situaciones. Los genes anotados en el sistema RAST como "Phosphotransferase system, phosphocarrier protein HPr", "PTS system, cellobiose-specific IIB component" y "PTS system, mannitol-specific IIB component (EC 2.7.1.197) / PTS system, mannitol-specific IIC component",

mencionado arriba como uno de los involucrados en el transporte de manitol, se encuentran subexpresados respecto a la condición control tras los dos tiempos de incubación. Por otro lado, se encuentran sobreexpresadas en ambas comparaciones dos genes clasificados como "Short-chain dehydrogenase" y "Probable carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase (EC 2.7.8.23)".

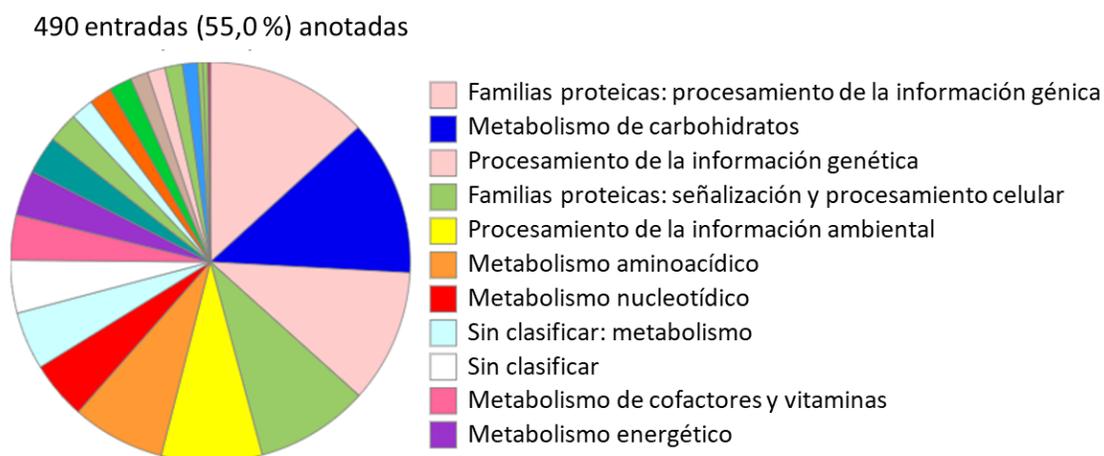


Figura 5.8 Categorización funcional de los 490 genes identificados por la plataforma GhostKoala, expresados por *Microbacterium* sp. UYFA68 en medio TSB tras 24 horas de incubación.

ii-Cepa UYFA68 crecida en medio de cultivo TSB suplementado con el sobrenadante de la cepa UYFA156, crecida en medio de cultivo ISP2 (+SN ISP2/TSB)

12 horas de crecimiento: En estas condiciones se identificaron un total de 554 genes expresados por la cepa UYFA68 con calidad necesaria para el estudio de su expresión diferencial, de los cuales solamente 6 se vieron diferencialmente expresados, según los resultados del DESeq2, en comparación con el control ($\text{Log}_2\text{FoldChange} > |1,5|$). Dos de ellos se encuentran subexpresados (una oxidoreductasa NAD(P)-dependiente, una Enoil-CoA hidratasa y α -L-arabinofuranosidasa) y 4 sobreexpresados respecto al control (una proteína hipotética, un antígeno de 18KDa, la α/β hidrolasa plegable y una proteína de unión al ADN). El total de genes detectados de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 se analizaron en la plataforma GhostKoala, pudiendo anotarse 318 del total de genes expresados (57,4 %) (Figura 5.9). De los genes anotados, 125 se corresponden a genes pertenecientes a vías metabólicas básicas, 64 a genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios, 44 a genes involucrados en el metabolismo exclusivamente microbiano, 23 a genes relacionados al metabolismo del carbono, 22 a genes relacionados a la biosíntesis de aminoácidos y 21 a genes relacionados con la biosíntesis de cofactores. Ninguno de los anotados por GhostKoala fue diferencialmente expresado.

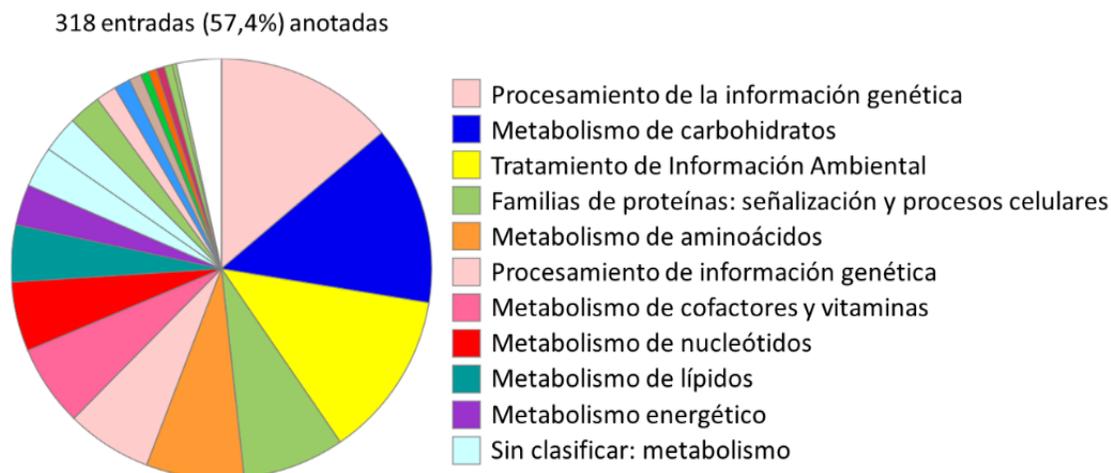


Figura 5.9. Categorización funcional de los 318 genes identificados por la plataforma GhostKoala, expresados por *Microbacterium* sp. UYFA68 en medio ISP2 tras 12 horas de incubación.

24 horas de crecimiento: en estas condiciones se identificaron 66 genes expresados con calidad necesaria para el estudio de su expresión diferencial, y solamente 1 diferencialmente expresado con un valor de $\text{Log}_2\text{FoldChange} > 1,5$, el cual se encontró sobreexpresado (oxidorreductasa de clase PPOx (o PNPOx) dependiente de F420). Mediante la plataforma GhostKoala, se lograron anotar 29 (43,9%) del total de 66 genes identificados (Figura 5.10). De los genes anotados, 9 se corresponden a genes pertenecientes a vías metabólicas, 9 a genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios, 5 a genes involucrados en el metabolismo microbiano en diversos ambientes, 3 a genes relacionados al metabolismo del carbono, 1 a genes relacionados a la biosíntesis de aminoácidos y 1 a genes relacionados con la biosíntesis de cofactores. No se observan coincidencias entre los genes diferencialmente expresados tras 12 y 24 horas de incubación en ISP2.

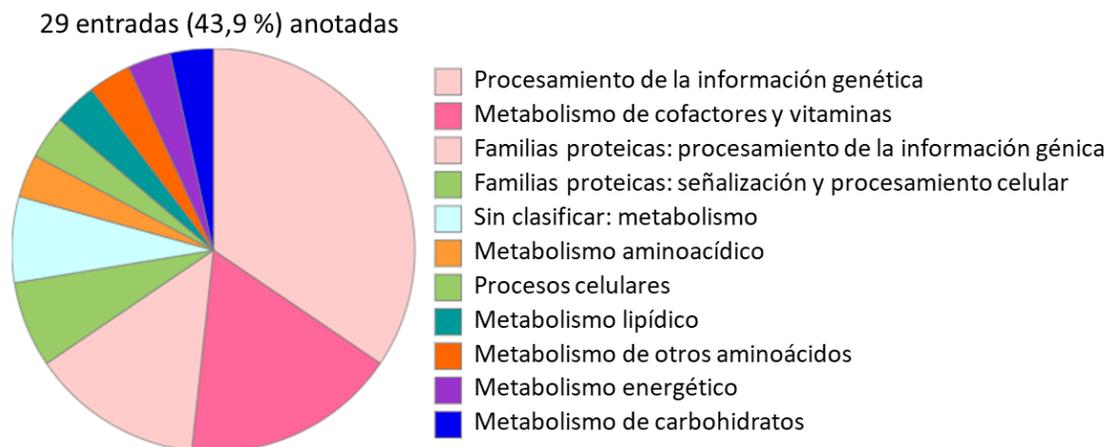


Figura 5.10. Categorización funcional de los 29 genes identificados por la plataforma GhostKoala, expresados por *Microbacterium* sp. UYFA68 en medio ISP2 tras 24 horas de incubación.

5.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los análisis de RNAseq suelen ser validados por PCR cuantitativa, lo cual excede los objetivos de esta tesis. Para ello, es necesario la construcción de primers dirigidos a genes housekeeping de *Streptomyces*, como es el caso del gen codificante del principal factor sigma en *Streptomyces* (gen *hdrB*) (Luo et al. 2015) y primers dirigidos a los genes de interés.

El análisis realizado sobre el genoma de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 no logró determinar la especie, siendo la más cercana la cepa *Microbacterium binotii*. Desafortunadamente, recién en los últimos tiempos ha empezado a estudiarse más extensamente al género *Microbacterium* (Gao et al. 2022; (Patel et al. 2023); (Corretto et al. 2020), por lo que el número de genomas secuenciados disponibles y de especies profundamente estudiadas, es relativamente bajo. Gracias a nuestro trabajo ahora se cuenta con más datos genómicos de *Microbacterium*. Para poder realmente afirmar que la cepa UYFA68 es una nueva especie corresponde realizar más caracterizaciones de las que se encontraban como objetivo de este trabajo (Xie et al., 2021; Zhang et al., 2021). La secuenciación del genoma de la cepa, sin embargo, fue fundamental para realizar los posteriores experimentos de transcriptómica, además de representar una importante contribución a la lista de genomas del clado.

Al ser expuesta al sobrenadante de la cepa UYFA156 crecida en TSB, la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 mostró un gran número de genes afectados. Estos resultados abren una amplia gama de

preguntas a diversos niveles. Respecto a la estimulación del crecimiento observado en cultivos líquidos, sería interesante el estudio de los genes involucrados en las interacciones colaborativas (sobrenadante de UYFA156 en TSB estimulando el crecimiento) en comparación con las condiciones en las cuales la interacción es de antagonismo (ensayos de inhibición en placa). El gran número de genes cuya expresión fue alterada en las condiciones del experimento de transcriptómica realizado podría estar indicando cambios metabólicos beneficiosos para la cepa *Microbacterium* UYFA68. Por otro lado, es también en estas condiciones que estudios previos encontraron una fuerte estimulación de la producción de auxinas por parte de *Microbacterium* UYFA68, y la sobreexpresión del gen potencialmente codificante para una aldehído deshidrogenasa que podría estar participando de la síntesis de auxinas en la cepa. Futuros estudios acerca de la relación de esta proteína con la síntesis de auxinas en *Microbacterium* UYFA68 podrían elucidar el mecanismo subyacente en lo observado fenotípicamente. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de la tesis, *Streptomyces* influye no solo el crecimiento, pero también la fisiología de las otras cepas del holobionte.

Por otro lado, la inhibición observada en los ensayos *in vitro* presentados en los capítulos anteriores indican la capacidad de *S. albidoflavus* UYFA156 de inhibir el crecimiento del resto de la microbiota endofítica. Si bien estos efectos también se observaron sobre la cepa *Microbacterium* UYFA68 en presencia del sobrenadante de la cepa UYFA156 crecida en ISP2 (capítulo 4), en los análisis transcriptómicos no fue posible observar la expresión de genes de respuesta al estrés. De todos modos, estudios futuros podrían enfocarse a elucidar la función de los genes sobreexpresados tanto a las 12 como a las 24 horas de incubación con este sobrenadante, ya que entre ellas se encuentran proteínas hipotéticas y algunas predichas como de unión al ADN, las cuales podrían estar cumpliendo funciones regulatorias asociadas a la respuesta al estrés. Este bajo número puede ser consecuencia de una baja calidad de extracción dado que la cepa UYFA68 se encuentra inhibida en esta condición. Es decir, que la razón de la no expresión diferencial puede ser que la cepa se encuentra inactiva o que el metabolismo y la actividad de la cepa se encuentran minimizados.

La producción de auxinas por parte de bacterias asociadas a especies vegetales del género *Microbacterium* ha sido ya reportada (Yadav et al. 2022). En el capítulo anterior se vio una estimulación de la producción de auxinas por parte de la cepa UYFA68 al ser crecida expuesta a sobrenadante de la cepa UYFA156 en ISP2. Sin embargo, los resultados transcriptómicos no llegaron a detectar la sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis de auxinas en estas condiciones. Esto podría deberse a una regulación de la expresión génica a otro nivel, por ejemplo, a nivel traduccional. Por otro lado, el crecimiento de la cepa UYFA156 en las condiciones de cultivo en medio ISP2 no fue óptimo (datos no mostrados), por lo que quizás este sobrenadante poseyera menor cantidad de metabolitos potencialmente funcionales como señales que las presentes en el

sobrenadante de medio TSB. De hecho, la cantidad de genes diferencialmente expresados fue mayor cuando la cepa UYFA68 fue expuesta al sobrenadante del cultivo de UYFA156 en TSB, indicando una mayor alteración que frente al sobrenadante de ISP2.

Finalmente, la falta de evidencia de una inhibición de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 expuesta al sobrenadante del medio ISP2 podría deberse a falta de profundidad en la secuenciación de los datos, ya que el número de genes identificados como expresados fue bajo en comparación a la condición con sobrenadante de medio TSB. Por otro lado, en ninguna de las condiciones analizadas se observan vías metabólicas esenciales completamente expresadas, lo cual también sugiere que la profundidad de lectura no fue óptima. Esto podría explicar la ausencia de genes asociados al estrés, a la resistencia antibiótica, o a la producción de metabolitos asociados a la PCV.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

1- La cepa UYFA156 es un endófito verdadero de ambos cultivares evaluados.

Los análisis de microscopía láser confocal en semillas esterilizadas superficialmente e inoculadas con *S. albidoflavus* UYFA156 confirmaron su naturaleza endofítica. Estos ensayos también permitieron evidenciar la capacidad de esta cepa de colonizar los tejidos aéreos y raíces de ambos cultivares (SFRO Don Tomás y Tacuabé), por lo que la actividad PCV diferencial en el cultivar SFRO Don Tomás no estaría dada por la incapacidad de la cepa de colonizar otros cultivares. Por lo tanto, si bien la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 tiene la capacidad de colonizar ambos cultivares, los resultados obtenidos parecerían indicar que la interacción planta-microorganismos en ambos cultivares es diferente. Más experimentos de microscopía podrían dirigirse hacia la visualización de la actividad genética dentro de los tejidos vegetales.

2-La cepa *Streptomyces* sp. UYFA156 pertenece a la especie *S. albidoflavus*.

La secuenciación del genoma de *S. albidoflavus* UYFA156 permitió la obtención de dos contigs de 6,823,997 pb y 307,384 pb de largo, correspondientes al cromosoma y a un mega-plásmido respectivamente. El genoma presenta un valor de identidad nucleotídica promedio del 96,27% con la cepa *Streptomyces albidoflavus* SM254, un fuerte antagonista de patógenos. Además, análisis en las plataformas RAST, CARD y antiSMASH permitieron la identificación de genes de resistencia antibiótica, hidrolasas y clusters de genes de síntesis de metabolitos secundarios, característicos del género. Estos metabolitos secundarios podrían ser responsables de la actividad PCV de la cepa, tanto por interacciones con el hospedero como con el resto de la microbiota endofítica.

3-La cepa UYFA156 es capaz de modular el crecimiento de diversas cepas endófitas de plantas de festuca.

Particularmente, dependiendo del medio de cultivo en el cual se crece previamente la cepa UYFA156, se observó que el sobrenadante de la misma, afecta el crecimiento, así como la capacidad de producir auxinas por la cepa UYFA68. Los análisis transcriptómicos de la cepa UYFA68, crecida en las dos condiciones evaluadas dieron resultados dispares. En uno de los medios, se detectó la sobreexpresión de un gen que podría estar asociado a la síntesis de auxinas. Sin embargo, en otro de los medios, los resultados no fueron concluyentes. Los resultados a partir del medio TSB abren

camino para futuras investigaciones respecto al rol de una potencial aldehído deshidrogenasa sobreexpresada en presencia del sobrenadante de UYFA156.

4- Los análisis de la secuencia del genoma de la cepa UYFA68 sugieren que el aislamiento es una especie no descrita.

La especie más relacionada fue la cepa *Microbacterium binotii* con un ANIb de 74,93 %. A su vez nuestros resultados coinciden con reportes de otras bacterias del mismo género asociadas a especies vegetales en interacciones benéficas (Croucher and Thomson 2010).

5- *Streptomyces* es capaz de modificar/manipular la fisiología de otras bacterias del holobionte de festuca

En su conjunto los resultados de esta tesis aportaron conocimientos novedosos y valiosos que aportan a la comprensión de la interacción de la cepa UYFA156-microbiota-planta de festuca. Se pudo comprobar que la cepa UYFA156 es moduladora de la composición, diversidad y actividad de la microbiota endofítica asociada a los cultivares estudiados. Esta modulación es altamente probable que afecte el crecimiento vegetal del hospedero. Dicho resultado es sumamente novedoso como mecanismo no clásico de PCV. Si bien es posible que esta modulación sea la causante de la promoción del crecimiento vegetal final observada, restan experimentos confirmatorios de que éste sea el único mecanismo de PCV.

ANEXO

1. Medios de Cultivo

1.1. Medio de cultivo TSB

Componente	Cantidad por litro
Tripteína Soya Caldo	15 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.2. Medio de cultivo TSA

Componente	Cantidad por litro
Tripteína Soya Caldo	15 g
Agar	15 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.3. Medio mínimo para *Streptomyces* (MMS)

Componente	Cantidad por litro
Asparagina / (NH₄)₂SO₄	1 g
K₂HPO₄	0,5 g
MgSO₄·7H₂O	0,2 g
FeSO₄·7H₂O	0,01 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

Posterior al autoclave agregar:

Componente	Cantidad por litro
------------	--------------------

Glucosa (50 g/L)	20, 10, 7 mL/L
Solución de micronutrientes	2 mL/L

1.3.1. Solución de micronutrientes

Componente	Cantidad por litro
ZnSO₄·7H₂O	80 mg
CuCl₂·2H₂O	10 mg
MnCl₂·4H₂O	10 mg
Na₂B₂O₇·10H₂O	10 mg
Na₂MoO₄	2 mg
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.4. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido

Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.1. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido

Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.2. Medio de cultivo Proyecto Internacional de *Streptomyces* 2 (ISP2)

Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Dextrosa	4 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.3. Medio de cultivo Agar Agua

Componente	Cantidad por litro
Agar	15 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

1.4. Medio para plantas Jensen

Componente	Cantidad por litro
Ca₃(PO₄)₂	1 g
K₂HPO₄	0,2 g
MgSO₄·7H₂O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl₃·6H₂O	0,17 g
Solución de micronutrientes	1 mL
Agua	c.s.p. 1000 mL
Ajustar el pH a 6,8 - 7	

1.4.1. Solución de micronutrientes para medio Jensen

Componente	Cantidad por litro
H₃BO₄	2,86 g
MnSO₄·H₂O	2,03 g
ZnSO₄·7H₂O	0,22 g
CuSO₄·5H₂O	0,08 g
Na₂MoO₄	0,14 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

2. Soluciones

2.1. PBS

Componente	Cantidad por litro
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na₂HPO₄	1,44 g
KH₂PO₄	0,24 g
Agua	c.s.p. 1000 mL
Ajustar el pH a 7,4	

2.2. Buffer TAE

Componente	Concentración
EDTA	0,001 M
Tris-acetato	0,04 M
Ajustar el pH a 8	

2.3. Buffer TE25S

Componente	Concentración
Tris-HCl pH 8	25 mM
EDTA pH 8	25 mM
Sucrosa	0,3 M

2.4. Solución CTAB/NaCl

Componente	Concentración
NaCl	0,7 M
CTAB	10 %
Precalentar la solución de NaCl 0,7 M a 55°C. Agregar lentamente la solución de CTAB y autoclavar.	

2.5. Reactivo de Salkowski

Componente	Concentración
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5 M
HClO ₄ 35%	35 %
Se agrega 50 mL de HClO ₄ 35% a 1 mL de FeCl ₃ .6H ₂ O 0,5 M en campana de gases. (76)	

2.6. Agua DEPC

Componente	Cantidad por litro
Dietil pirocarbonato	1 mL
Incubar 16 horas a temperatura ambiente con agitación y luego autoclavar.	

2.7. Buffers para la depleción de ARNr con RiboPOOL

2.7.1. Buffer de unión 2X (2BU)

Componente	Concentración
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	2 M

2.7.2. Buffer de dilución (BD)

Componente	Concentración
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	200 mM

2.7.3. Solución de resuspensión (SR)

Componente	Concentración
NaOH	100 mM

NaCl	50 mM
------	-------

2.7.4. Solución de lavado (SL)

Componente	Concentración
NaCl	100 mM

2.8. Buffer de lisis (extracción de ADN genómico de la cepa *Microbacterium* sp. UYFA68)

Componente	Concentración
Tris - HCl	20 mM
EDTA	2 mM
Tritón® X-100	1,2 %
Ajustar pH a 8 y agregar lisozima a una concentración final de 20 mg/mL inmediatamente antes de usar.	
Agua	c.s.p. 1000 mL

3. Primers y Adaptadores

3.1. PCR 16S

27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1942R	GGTTACCTGTTACGACTT

3.2. Construcción de las librerías para RNAseq

3.2.1. Códigos de barra

NOMBRE	SECUENCIA	CÓDIGO DE BARRA
RNABC01	/5Phos/rArUrU rGrCrU rUrArG rArUrC rGrGrA rArGrA rGrCrG rUrCrG rUrGrU rArG/3SpC3/	AAGCAAT
RNABC04	/5Phos/rArGrG rCrUrG rUrArG rArUrC rGrGrA rArGrA rGrCrG rUrCrG rUrGrU rArG/3SpC3/	ACAGCCT

RNABC06	/5Phos/rArArU rUrArG rArUrC rGrGrA rArGrA rGrCrG rUrCrG rUrGrU rArG/3SpC3/	ACTAATT
RNABC08	/5Phos/rArUrG rGrUrC rUrArG rArUrC rGrGrA rArGrA rGrCrG rUrCrG rUrGrU rArG/3SpC3/	AGACCAT
CONSTANT	AGAUCGGAAGAGCGUGUGUAG (ARN) AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAG (ADN, need to RC for 1 st strand cDNA)	

Constant-RC: 5'-CTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

Adaptador 3Tr3: 5'-AGATCGGAAGAGCACACGTCTG/3SpC3-3'

3Tr3 adapter-RC: 5'-CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'

3.3. Adaptadores

3.3.1. Primers para los adaptadores:

RTS_Enr_P5_RNAtag	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
RTS_Enr_P7_BC_01	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCG GTGTGC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
RTS_Enr_P7_BC_04	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GGCTCCTG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
RTS_Enr_P7_BC_06	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATA AACATAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
RTS_Enr_P7_BC_08	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GCTAAGT AGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
RTS_AR2	TACACGACGCTCTTCCGAT
RTS_AR2-RC	ATCGGAAGAGCGTCGTGTA

4.3.2. Adaptadores:

NOMBRE	SECUENCIA ORIGINAL	REVERSO COMPLEMENTARIO
BC01	TCGTGTGC	GCACACGA
BC04	GGCTCCTG	CAGGAGCC
BC06	AACATAAT	ATTATGTT
BC08	GCTAAGTA	TACTTAGC

5. Protocolos

5.1. Recolección de esporas

Para la obtención de esporas, se estría la cepa de interés en cinco placas de medio TSA y se incuba cuatro días a 20°C, o hasta la formación de esporas en las placas. Con un hisopo estéril sumergido en glicerol 25% se remueven las esporas de la placa. Las esporas recolectadas se

transfieren a una solución de glicerol 25% y se filtran utilizando un tip de 1000 μ L con la punta cortada y un poco de algodón en la punta. Calcular 500 μ L de glicerol 25% por cada placa. La solución obtenida se cuantifica por recuento en placa y se almacena a -20°C .

BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1–12
- Ait Barka E, Vatsa P, Sanchez L, et al (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. 80:1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15
- Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, et al (2020) CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517–D525. doi: 10.1093/nar/gkz935
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO (2017) Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8:1–8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971
- Azziz G, Bajsa N, Haghjou T, et al (2012) Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Appl Soil Ecol* 61:320–326. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.10.004
- Badalamenti J, Erickson J, Salomon C (2016) Complete Genome Sequence of *Streptomyces albus* SM254, a Potent Antagonist of Bat White-Nose Syndrome Pathogen *Pseudogymnoascus destructans*. *Genome Announc* 4:1–2. doi: 10.1128/genomeA.00290-16
- Badri D V., Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642–650. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.014
- Baedke J, Fábregas-Tejeda A, Nieves Delgado A (2020) The holobiont concept before Margulis. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 334:149–155. doi: 10.1002/jez.b.22931
- Ballouz S, Verleyen W, Gillis J (2015) Guidance for RNA-seq co-expression network construction and analysis: Safety in numbers. *Bioinformatics* 31:2123–2130. doi: 10.1093/bioinformatics/btv118
- Bao K, Cohen SN (2003) Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev* 17:774–785. doi: 10.1101/gad.1060303
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379–407. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Brover S, Ciufu S, Kannan S, et al (2018) Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2386–2392. doi: 10.1099/ijsem.0.002809
- Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, et al (2016) Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. *Plant Mol Biol* 90:561–574. doi: 10.1007/s11103-016-0435-1

- Chater KF (1972) A Morphological and Genetic Mapping Study of White Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*
- Colombo C, Palumbo G, He JZ, et al (2014) Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J Soils Sediments* 14:538–548. doi: 10.1007/s11368-013-0814-z
- Conn VM, Franco CMM (2004) Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Appl Environ Microbiol* 70:1787–1794. doi: 10.1128/AEM.70.3.1787-1794.2004
- Cooper JE (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: Disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* 103:1355–1365. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x
- Corretto E, Antonielli L, Sessitsch A, et al (2020) Comparative Genomics of Microbacterium Species to Reveal Diversity, Potential for Secondary Metabolites and Heavy Metal Resistance. *Front Microbiol* 11:1–17. doi: 10.3389/fmicb.2020.01869
- Croucher NJ, Thomson NR (2010) Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 13:619–624. doi: 10.1016/j.mib.2010.09.009
- de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, et al (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J Infect Dis* 16:466–471. doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014
- de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, et al (2016) Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Ann Microbiol* 66:329–342. doi: 10.1007/s13213-015-1113-2
- Denarie J, Debelle F, Truchet G, Prome J-C (1993) Rhizobium and Legume Nodulation: A Molecular Dialogue. 19–30. doi: 10.1007/978-94-017-2416-6_3
- Dong Y, Iniguez AL, Triplett EW (2003) Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 257:49–59
- Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, et al (2017) Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol* 8:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2017.02104
- Gamalero E, Glick BR (2011) Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. pp 17–46
- Gao Y, Feng J, Wu J, et al (2022) Transcriptome analysis of the growth-promoting effect of volatile organic compounds produced by *Microbacterium aurantiacum* GX14001 on tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *BMC Plant Biol* 22:1–15. doi: 10.1186/s12870-022-03591-z
- García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng* 2:183–205. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183

- Glick BR (2012) *Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications*. Hindawi Publ Corp 2012:
- Gouda S, Das G, Sen SK, et al (2016) Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Front Microbiol* 7:1–8. doi: 10.3389/fmicb.2016.01538
- Ha SYS, Lim J, Kwon S, Chun J (2017) A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. doi: 10.1007/s10482-017-0844-4
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD Van (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16:463–71. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.008
- Hatano K, Nishii T, Kasai H (2003) Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) *coring.*, sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1519–1529. doi: 10.1099/ijs.0.02238-0
- Heath LS, Sloan GL, Heath HE (1986) A Simple and Generally Applicable Procedure for Releasing DNA from Bacterial Cells. 51:1138–1140
- Heijo G, Taulé C, Mareque C, et al (2021) Interaction among endophytic bacteria, sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars and chemical nitrogen fertilization. *FEMS Microbiol Ecol* 97:1–12. doi: 10.1093/femsec/fiaa245
- Huang CH, Lin YS, Yang YL, et al (1998) The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol* 28:905–916. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00856.x
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, Van Montagu M, Kellenberger E (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J Bacteriol* 176:1913–23
- Hwang KS, Kim HU, Charusanti P, et al (2014) Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 32:255–268. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72:1719–1728. doi: 10.1128/AEM.72.3.1719
- Jauri PV, Beracochea M, Fernández B, Battistoni F (2019) Whole-Genome Sequencing of *Streptomyces* sp. Strain UYFA156, a Cultivar-Specific Plant Growth-Promoting Endophyte of *Festuca arundinacea*. *Microbiol Resour Announc* 8:1–2. doi: 10.1128/MRA.00722-19
- Jensen PA, Zhu Z, Van Opijnen T (2017) *Cell Rep*. 20:1705–1716. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.062
- Jones SE, Leong V, Ortega J, Elliot MA (2014) Development, Antibiotic Production, and Ribosome Assembly in *Streptomyces venezuelae* Are Impacted by RNase J and RNase III Deletion
Downloaded from. 196:4253–4267. doi: 10.1128/JB.02205-14
- Jones SE, Pham CA, Zambri MP, et al (2019) *Streptomyces* volatile compounds influence exploration

- and microbial community dynamics by altering iron availability. *MBio* 10:1–18. doi: 10.1128/MBIO.00171-19
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol* 428:726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Keeffe KRO, Jones CD, Hill C, Hill C (2019) Challenges and solutions for analysing dual RNA- - seq data for model host – pathogen systems. *Methods Ecol Evol* 2019:401–414. doi: 10.1111/2041-210X.13135
- Khavkin E (2021) Plant-Pathogen Molecular Dialogue: Evolution, Mechanisms and Agricultural Implementation. *Russ J Plant Physiol* 68:197–211. doi: 10.1134/S1021443721020072
- Kieser, M.J. Bibb, K.F. Chater, M.J. Butter, D.A. Hopwood, K.F. Chater, MJ Bittner, MJ Bibb, MJ Buttner, KF Chater DH (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom Kim BJ, Kim CJ, Chun J, et al (2004) Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:593–598. doi: 10.1099/ij.s.0.02941-0
- Kutchma AJ, Roberts MA, Knaebel DB, Crawford DL (1998) Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. *Biotechniques* 24:452–457. doi: 10.2144/98243st05
- Labeda DP (2011) Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *streptomyces*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2525–2531. doi: 10.1099/ij.s.0.028514-0
- Langdon WB (2015) Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min* 8:1–7. doi: 10.1186/s13040-014-0034-0
- Lanver D, Müller AN, Happel P, et al (2018) The biotrophic development of *ustilago maydis* studied by RNA-seq analysis. *Plant Cell* 30:300–323. doi: 10.1105/tpc.17.00764
- Law JW-F, Tan K-X, Wong SH, et al (2018) Taxonomic and Characterization Methods of *Streptomyces*: A Review. *Prog Microbes Mol Biol* 1:1–13. doi: 10.36877/pmmb.a0000009
- Lee KJ, Palmer T, Schrempf H, et al (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. 34:171–198. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x
- Lee LH, Zainal N, Azman AS, et al (2014) Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *Sci World J* 1–14. doi: 10.1155/2014/698178
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- López-Fernández S, Sonogo P, Moretto M, et al (2015) Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils similarities and differences between endophytes and other symbiotic

- bacteria. *Front Microbiol* 6:1–15. doi: 10.3389/fmicb.2015.00419
- Loria R, Kers J, Joshi M (2006) Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu Rev Phytopathol* 44:469–487. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147
- Love MI, Huber W, Anders S (2011) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013) Microbial Control of Plant Root Diseases. *Mol Microb Ecol Rhizosph* 2:575–586. doi: 10.1002/9781118297674.ch54
- Luo Y, Zhang L, Barton KW, Zhao H (2015) Systematic Identification of a Panel of Strong Constitutive Promoters from *Streptomyces albus*. *ACS Synth Biol* 4:1001–1010. doi: 10.1021/acssynbio.5b00016
- Maria Ines Lapaz (2019) “Estudio genómico comparativo de cepas de *Streptomyces* patógenas de papa en Uruguay”
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, et al (2011a) AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:339–346. doi: 10.1093/nar/gkr466
- Medema MH, Breitling R, Takano E (2011b) *Synthetic biology in streptomyces bacteria*, 1st edn. Elsevier Inc.
- Meyer F, Paarmann D, Souza MD, et al (2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. 8:1–8. doi: 10.1186/1471-2105-9-386
- Mitra M, Nguyen KMAK, Box TW, et al (2021) Isolation and characterization of a heavy metal- and antibiotic-tolerant novel bacterial strain from a contaminated culture plate of *Chlamydomonas reinhardtii*, a green micro-alga. *F1000Research* 10:1–34. doi: 10.12688/f1000research.53779.2
- Nikodinovic J, Barrow KD, Chuck JA (2003) High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. *Biotechniques* 35:932–936. doi: 10.2144/03355bm05
- Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV DI (2014) The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. In: *Nucleic Acids Res*.
- Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato JY, et al (2005) AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:431–439. doi: 10.1271/bbb.69.431
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33:0. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9
- Palmer BR, Marinus MG (1994) The dam and dcm strains of *Escherichia coli* - a review. *Gene* 143:1–12. doi: 10.1016/0378-1119(94)90597-5

- Patel A, Sahu KP, Mehta S, et al (2023) New Insights on Endophytic Microbacterium-Assisted Blast Disease Suppression and Growth Promotion in Rice: Revelation by Polyphasic Functional Characterization and Transcriptomics. *Microorganisms* 11:. doi: 10.3390/microorganisms11020362
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, et al (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:489–521. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, et al (1998a) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in arabidopsis. *Plant Cell* 10:1571–1580. doi: 10.1105/tpc.10.9.1571
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, et al (1998b) A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, et al (2009) The rhizosphere, a playground and battlefield.pdf. *Plant Soil* 321:341–361
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Critical Reviews in Plant Sciences Interactions of Gramineous Plants with Azoarcus spp . and Other Diazotrophs : Identification , Localization , and Perspectives to Study their Function Interactions of Gramineous Plants with Azoarcus spp . and Other Diazo. *CRC Crit Rev Plant Sci* 17:29–54
- Romero S, Nastasa A, Chapman A, et al (2019) The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Mol Biol* 28:455–472. doi: 10.1111/imb.12567
- Rong X, Guo Y, Huang Y (2009) Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*. *Syst Appl Microbiol* 32:314–322. doi: 10.1016/j.syapm.2009.05.003
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, et al (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* 5:355–362. doi: 10.1038/nrmicro1635
- Segre JA (2013) What does it take to satisfy Koch’s postulates two centuries later?: Microbial genomics and propionibacteria acnes. *J Invest Dermatol* 133:2141–2142. doi: 10.1038/jid.2013.260
- Sharifi R, Ryu CM (2018) Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: Lessons from the past and objectives for the future. *Ann Bot* 122:349–358. doi: 10.1093/aob/mcy108
- Shishkin AA, Giannoukos G, Kucukural A, et al (2015) Simultaneous generation of many RNA-seq libraries in a single reaction. *Nat Methods* 12:323–325. doi: 10.1038/nmeth.3313
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–48. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Sprent JI, de Faria SM (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110:157–165. doi: 10.1007/BF02226795

- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, et al (2009) Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75:748–757. doi: 10.1128/AEM.02239-08
- Taulé C, Castillo A, Villar S, et al (2016) Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant Soil* 403:403–418. doi: 10.1007/s11104-016-2813-5
- Taulé C (2018) Descifrando las bases moleculares de la interacción entre las cepas endófitas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 y plantas de caña de azúcar. Universidad de la República
- Thomashow LS (1996) Biological control of plant root pathogens. *Curr Opin Biotechnol* 7:343–347. doi: 10.1016/S0958-1669(96)80042-5
- Tian B, Yang J, Zhang KQ (2007) Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiol Ecol* 61:197–213. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x
- Tripathi G, Rawal SK (1998) Simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol Tech* 12:629–631. doi: 10.1023/A:1008836214495
- Turner TR, James EK, Poole PS (2013) The plant microbiome. *Genome Biol* 14:209. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-209
- Ulrich K, Ulrich A, Ewald D (2008) Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 63:169–180. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00419.x
- Urem M, Świątek-Połatyńska MA, Rigali S, van Wezel GP (2016) Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* 102:183–195. doi: 10.1111/mmi.13464
- Valdez RA, Soriano B, Prado G, et al (2016) Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant–Microbe Interactions. Springer International Publishing
- Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, et al (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* 206:1196–1206. doi: 10.1111/nph.13312
- Vaz Jauri P, Bakker MG, Salomon CE, Kinkel LL (2013) Subinhibitory Antibiotic Concentrations Mediate Nutrient Use and Competition among Soil *Streptomyces*. *PLoS One* 8:e81064. doi: 10.1371/journal.pone.0081064
- Vaz Jauri P, de los Santos C, Fernández B, et al (2022) Differential modulation of the bacterial endophytic microbiota of *Festuca arundinaceae* (tall fescue) cultivars by the plant-growth promoting strain *Streptomyces albidoflavus* UYFA156. *Plant Soil* 1–25. doi: 10.1007/s11104-022-05831-5

- Vaz Jauri P, Taulé C, de los Santos MC, et al (2019) Interactions between putatively endophytic bacteria and tall fescue (*Festuca arundinacea*): plant growth promotion and colonization in host and non-host cultivars. *Plant Soil*. doi: 10.1007/s11104-019-04359-5
- Vaz P, de los Santos MC, Fernandez B, Battistoni F (2019) Exploración de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en la cepa *Streptomyces* sp. UYFA156
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics in Western Equatoria State. *Nat Rev Genet* 10:57
- Westermann AJ, Barquist L, Vogel J (2017) Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog* 13:1–19. doi: 10.1371/journal.ppat.1006033
- Xie F, Niu S, Lin X, Pei S, Jiang L, Tian Y, Zhang G. Description of *Microbacterium luteum* sp. nov., *Microbacterium cremeum* sp. nov., and *Microbacterium atlanticum* sp. nov., three novel C50 carotenoid producing bacteria. *J Microbiol*. 2021 Oct;59(10):886-897. doi: 10.1007/s12275-021-1186-5.
- Yadav A, Mudoi KD, Kumar N, et al (2022) Auxin biosynthesis by *Microbacterium testaceum* Y411 associated with orchid aerial roots and their efficacy in micropropagation. *Front Plant Sci* 13:1–13. doi: 10.3389/fpls.2022.1037109
- Zeng Q, Wu X, Wen X (2016) Effects of Soluble Phosphate on Phosphate-Solubilizing Characteristics and Expression of *gcd* Gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2. *Curr Microbiol* 72:198–206. doi: 10.1007/s00284-015-0938-z
- Zhang L, Jiao Y, Ling L, Wang H, Song W, Zhao T, Guo L, Xiang W, Zhao J, Wang X. *Microbacterium stercoris* sp. nov., an indole acetic acid-producing actinobacterium isolated from cow dung. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021 Nov;71(11). doi: 10.1099/ijsem.0.005099. PMID: 34762581.
- Zhu F, Qu L, Hong X, Sun X (2011) Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao saltern on the coast of yellow sea of China. *Evidence-based Complement Altern Med* 2011:. doi: 10.1155/2011/615032
- Zhu Z, Surujon D, Ortiz-Marquez JC, et al (2020) Entropy of a bacterial stress response is a generalizable predictor for fitness and antibiotic sensitivity. *Nat Commun* 11:1–15. doi: 10.1038/s41467-020-18134-z