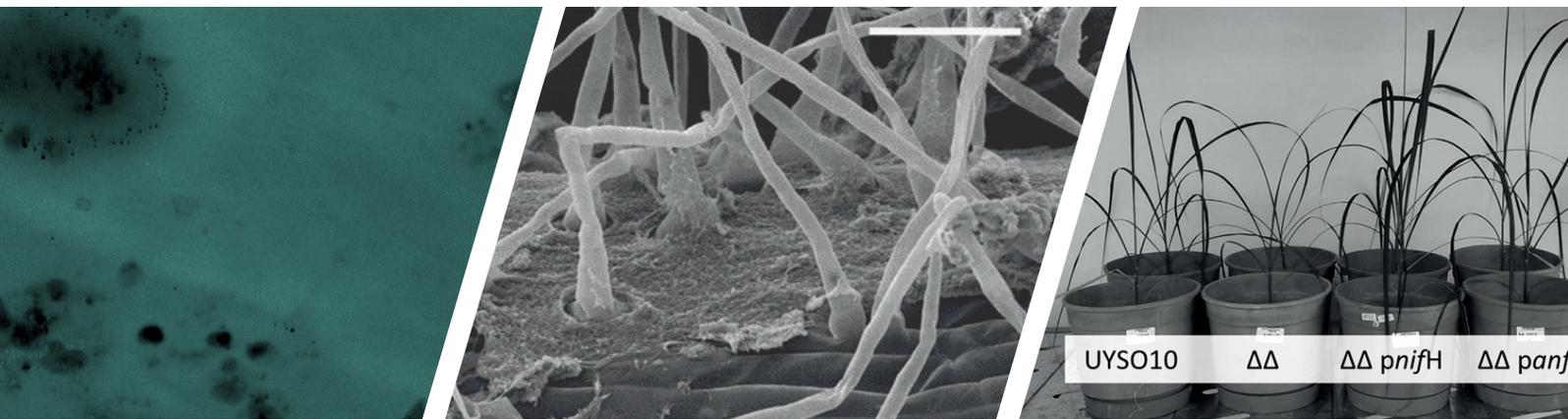


Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA Biología

Descifrando las bases de la interacción entre las cepas endófitas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 y plantas de caña de azúcar



Cecilia Taulé Gregorio

Orientador de tesis:
Dr. Federico Battistoni

Tribunal:
Dr. Pablo Zunino | Dr. Jorge Monza | Dra. María Inés Siri



Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC

Montevideo, Uruguay 2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo, agradeciendo a todas las personas que me han ayudado a alcanzar esta meta.

Fede, gracias por ser guía en este camino, gracias por las oportunidades, por la motivación y por confiar en mí. He crecido y aprendido mucho trabajando contigo, mucho más que de endófitos y su interacción con las plantas.

A Rosario Durán, muchas gracias por recibirme en su laboratorio y estar siempre presente durante mi estadía, tanto para discutir los resultados, como los inconvenientes que fueron surgiendo. También quiero agradecer a su grupo, especialmente a Analía, Madelón, Bernardina y Jessica, por la ayuda y las divertidas charlas de los almuerzos.

A Fabio Olivares, gracias por recibirme en su laboratorio y enseñarme el gusto por la microscopía. A Martin Baraibar y a Bertrand Friguet, gracias por recibirme en su laboratorio y enseñarme la técnica de DIGE.

A Alicia Castillo por las cañitas micropropagadas y a Fernando Hackembruch por los tallos cosechados en campo y por evacuar las dudas sobre el cultivo.

Muchas gracias Rufo, por la valiosísima ayuda en el último capítulo de esta tesis y por siempre estar dispuesto a ayudar. Gracias Cintia por todos los momentos compartidos en el lab hablando de experimentos y de la vida, gracias Martín por la ayuda bioinformática y por compartir no solo los modelos de estudio, sino también esta etapa de terminaaaaaar la tesis; y gracias Delos y Gaby por las valiosas manos que supieron prestar cuando las necesite! Gracias a todos mis compañeros del laboratorio, por festejar en las buenas, acompañar en las malas y por compartir el día a día.

Gracias a PEDECIBA, ANII, CAP, SUM, SUB y a AMSUD Pasteur por la financiación.

Por último, pero no menor, es todo el apoyo que recibo fuera del laboratorio y que sin ellos no podría haber realizado y terminado la tesis. Muchas gracias a mi familia y a los amigos por acompañarme a lo largo de este viaje. Y muy especialmente a Mauri por su paciencia, por compartir este camino que elegimos y por su amor y a Camilito que me acompaña desde los últimos experimentos y que llegó para cambiar nuestras vidas.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
--------------	---

Capítulo I: Introducción

1. Interacción planta-bacteria	3
2. Interacción leguminosa-rizobio.....	4
3. Interacción planta-patógeno.....	5
4. Interacción planta-endófito	6
4. 1 Promoción del crecimiento vegetal por bacterias endófitas	7
4. 1. 1 Reguladores del crecimiento vegetal o fitoestimulantes.....	7
4. 1. 2 Bio-fertilización.....	8
4. 1. 3 Control biológico	9
4. 1. 4 Inducción de la resistencia sistémica en plantas.....	10
4. 2 Colonización de las plantas por las bacterias endófitas.....	10
4. 2. 1 Acercamiento y adhesión bacteriana a la superficie radicular	11
4. 2. 2 Anclaje bacteriano y colonización de la superficie radicular	11
4. 2. 3 Infección y colonización de los tejidos internos radiculares	12
4. 2. 4 La colonización endofítica desde el punto de vista de las plantas.....	13
4. 3 Bases moleculares de la interacción planta-endófito	14
5. Antecedentes del grupo de trabajo y de la línea de investigación	15
5.1 modelo de estudio	16
Hipótesis general.....	17
Objetivo general.....	17

Capítulo II: Infección y colonización de plantas de caña de azúcar por las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24

Objetivos específicos.....	19
Estrategia.....	19
1. Materiales y Métodos	20
1. 1 Cepas bacterianas y plantas	20
1. 2 Identificación <i>in vitro</i> de factores bacterianos vinculados a la interacción planta-bacteria	20

1. 2. 1 Búsqueda de actividades enzimáticas potencialmente relacionadas a la degradación de la pared celular vegetal	20
1. 2. 2 Determinación de la presencia de enzimas antioxidantes.....	23
1. 2. 3 Determinación de la presencia de la enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate desaminasa.....	24
1. 2. 4 Determinación de la movilidad bacteriana	25
1. 2. 5 Determinación de la capacidad de formar biopelículas.....	26
1. 2. 6 Determinación de la capacidad de producir polihidroxitirato	26
1. 3 Búsqueda de factores promotores del crecimiento vegetal.....	26
1. 4 Determinación de la capacidad de las cepas de crecer utilizando distintos pH y fuentes de carbono y nitrógeno	27
1. 5 Descripción del proceso de infección y colonización de plantas de caña de azúcar micropropagadas, por parte de las cepas UYSO10 y UYSO24	28
1. 5. 1 Estudio de la colonización e infección de plantas micropropagadas de caña de azúcar por la cepa UYSO24, mediante microscopía.....	28
1. 5. 2 Identificación de las cepas inoculadas	29
1. 5. 3 Cuantificación de la colonización endófitas por las cepas UYSO10 y UYSO24 en tejidos de plantas cañas de azúcar micropropagadas.....	31
2. Resultados	34
2. 1 Identificación de características fenotípicas bacterianas en las cepas UYSO10 y UYSO24, posiblemente vinculadas a la interacción planta-bacteria	34
2. 1. 1 Determinación de la presencia de enzimas potencialmente degradadoras de la pared celular vegetal.....	34
2. 1. 2 Determinación de la presencia de actividades enzimáticas antioxidantes.....	34
2. 1. 3 Determinación de la presencia de la enzima ACC desaminasa	36
2. 1. 4 Determinación de la movilidad bacteriana	37
2. 1. 5 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas	38
2. 1. 6 Determinación de la producción de polihidroxitirato.....	39
2. 2. Identificación de características fenotípicas en las cepas UYSO10 y UYSO24 posiblemente involucradas en la promoción del crecimiento vegetal	39
2. 3 Determinación de la capacidad de las cepas UYSO10 y UYSO24 de crecer en diferentes fuentes de C, N y en distintos pH	40
2. 4 Localización y cuantificación de las cepas UYSO10 y UYSO24 en los tejidos internos de plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP	43
2. 4. 1 Especificidad de los antisueros cepa específicos producidos	43
2. 4. 2 Colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24.....	44
2. 4. 3 Colonización de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO10.....	46
2. 4. 4 Puesta a punto de la detección de las cepas en estudio por PCR cuantitativa	47

2. 4. 5 Cuantificación de la colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24.....	48
2. 4. 6 Cuantificación de la colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO10.....	49
2. 4. 7 Tratamientos control y referencia.....	50
3. Discusión	51
3. 1 Las cepas UYSO10 y UYSO24 presentan características que probablemente inciden en la colonización e infección radicular	51
3. 2 Las cepas UYSO10 y UYSO24 son endófitos verdaderos	54

Capítulo III: Análisis de la respuesta de las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 a la presencia de exudados radiculares de plantas de caña de azúcar

Objetivo específico.....	57
Estrategia.....	57
1 Materiales y Métodos	58
1. 1 Cepas bacterianas y plantas	58
1. 2 Ensayo biológico	58
1. 3 Extracción de proteínas totales bacterianas	59
1. 4 Cuantificación y visualización de los extractos proteicos	59
1. 5 Análisis proteómico porDIGE	60
1. 5. 1 Preparación de la muestra para DIGE	60
1. 5. 2 Evaluación de la compatibilidad muestra-fluoróforos	61
1. 5. 3 Marcado de las muestras	61
1. 5. 4 Análisis de las muestras por 2D SDS-PAGE.....	62
1. 5. 5 Obtención y análisis de las imágenes	63
1. 5. 6 Análisis de los spots de interés por espectrometría de masas	63
1. 6 Análisis proteómico por nano LC-MS/MS y conteo de espectros.....	64
1. 6. 1 Preparación de las muestras para <i>shotgun</i>	65
1. 6. 2 Análisis mediante espectrometría de masa	65
1. 6. 3 Análisis informático de los espectros obtenidos.....	66
2. Resultados	67
2. 1. Preparación de los extractos proteicos.....	67
2. 2 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO10 a los exudados radiculares, mediante DIGE	68
2. 3 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO24 a los exudados radiculares, mediante DIGE	71
2. 4 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO10 a los exudados radiculares, por nano LC-MS/MS.....	74

LPS-assembly protein LptD	81
3. Discusión	83
3. 1 Los exudados radiculares son la primera señal en la interacción planta-bacteria	83
3. 2 Aplicación de una aproximación proteómica global al estudio de la interacción planta-bacteria	84
3. 2. 1 Uso de las técnicas DIGE y nano LC-MS/MS en nuestros modelos de estudio	85
3. 3 Respuesta de la cepa UYSO10 a la presencia de exudados radiculares de caña de azúcar	88
3. 3. 1 Transporte y metabolismo de nutrientes.....	88
3. 3. 2 Movilidad y quimiotaxis	94
3. 3. 3 Envoltura celular.....	95
3. 3. 4 Chaperonas y funciones relacionadas al estrés.....	96
3. 4 Respuesta de la cepa UYSO24 a los exudados radiculares de caña de azúcar.....	97
3. 4. 1 Transporte y metabolismo de nutrientes.....	97
3. 4. 2 Chaperonas y funciones relacionadas al estrés.....	98
3. 4. 3 Interacción con la planta	98

Capítulo IV: Análisis del proteoma de la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 crecida en co-cultivo con plantas de caña de azúcar

Objetivo específico:.....	99
Estrategia:	99
1 Materiales y Métodos	100
1. 1 Cepa bacteriana y plantas	100
1. 2 Ensayo biológico.....	100
1. 3 Extracción de proteínas totales bacterianas	101
1. 4 Análisis proteómico por nano LC-MS/MS y conteo de espectros	101
1. 5 Otras determinaciones	101
2. Resultados	102
2. 1 Proteoma de la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar	102
2. 2 Análisis del proteoma de la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo en forma planctónica	103
2. 3 Cuantificación de compuestos nitrogenados y determinación del pH en la interacción planta-bacteria	103
3. Discusión	105
3. 1 Análisis del proteoma de la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar	105

3. 1. 1 Transducción de señales ambientales y movimiento	105
3. 1. 2 Envoltura celular, transporte y adhesión	108
3. 1. 3 Adaptación al estrés	109
3. 1. 4 Transporte y metabolismo de nutrientes.....	111
3. 1. 5 Otras características bacterianas posiblemente asociadas a la interacción con la planta	114
3. 1. 6 Presencia de mecanismos posiblemente involucrados en la promoción del crecimiento vegetal.....	115

Capítulo V: Construcción y caracterización de mutantes en los genes *nifH* y *anfH* en la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10

Objetivo específico:.....	117
Estrategia:	117
1 Materiales y métodos	118
1. 1 Cepas y plásmidos.....	118
1. 2 Construcción de la cepa mutante derivada de UYSO10 desprovista de los genes <i>nifH</i> y <i>anfH</i>	118
1. 2. 1 Verificación de la cepa UYSO10 $\Delta nifH$ <i>anfH</i> ::pEMG- $\Delta anfH$ pSW-2	122
1. 2. 2 Inducción de la expresión de la nucleasa I Sec-I y selección de la cepa UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$	123
1. 2. 3 Eliminación del plásmido pSW-2	123
1. 3 Construcción de las cepas mutantes complementantes derivadas de las cepas mutantes desprovistas de los genes <i>nifH</i> y <i>anfH</i>	125
1. 4 Caracterización de la cepa UYSO10 y las mutantes obtenidas	127
1. 4. 1 Evaluación de la capacidad de la cepas en estudio, de crecer en medio de cultivo rico (condiciones de no FBN).....	127
1. 4. 2 Evaluación de la actividad nitrogenasa en las diferentes cepas en estudio.	127
1. 4. 3 Evaluación de la respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las diferentes mutantes.....	128
2 Resultados	130
2. 1 Construcción de cepas mutantes en los genes <i>nifH</i> y <i>anfH</i>	130
2. 2 Caracterización <i>in vitro</i> de las cepas UYSO10 parental y mutantes.....	131
2. 3 Caracterización <i>in vivo</i> de las cepas UYSO10 parental y mutantes.....	133
3 Discusión	135
3. 1 FBN en gramíneas por endófitos diazótrofos.....	135
3. 2 Nitrogenasas.....	136
3. 3 Caracterización de las nitrogenasas presentes en la cepa UYSO10	137

3. 4 La MoFe y FeFe nitrogenasas del endófito *Kosakonia* sp. UYSO10 son necesarias para la promoción del crecimiento de caña de azúcar. 139

Conclusiones	141
Perspectivas	143
Anexo A	145
1. Medios de cultivo para bacterias	145
2. Medio de cultivo para plantas.....	147
3. Soluciones	148
Anexo B	149
Anexo C	163
Bibliografía	165

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo II

Tabla 1. Cepas empleadas en este estudio.....	21
Tabla 2. Determinación de potenciales características fenotípicas bacterianas involucradas en la interacción planta-bacteria.....	35
Tabla 3. Cuantificación de la producción de biopelículas.....	38
Tabla 4. Parámetros de crecimiento de las cepas UYSO10 y UYSO24, en los medios de cultivo TY, MS, MS + N, MS + exudados, apoplasto puro y MS + apoplasto.....	41
Tabla 5. Capacidad de las cepas UYSO10 y UYSO24 de crecer en diferentes fuentes de C y N...42	
Tabla 6. Estudio de la especificidad de los antisueros producidos contra las cepas UYSO10 y UYSO24, mediante ELISA.....	43

Capítulo III

Tabla 1. Diseño experimental del marcado de las muestras para DIGE, cepa UYSO10.....	62
Tabla 2. Diseño experimental del marcado de las muestras para DIGE, cepa UYSO24.....	62
Tabla 3. Concentración de proteínas totales en los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24 determinada por densitometría.....	67
Tabla 4. Identidad y características generales de los <i>spots</i> con expresión diferencial por DIGE, en el proteoma de la cepa UYSO10 crecida en presencia de exudados radiculares.....	70
Tabla 5. Identidad y características generales de los <i>spots</i> con expresión diferencial por DIGE en el proteoma de la cepa UYSO24, crecida en presencia de exudados radiculares.....	73
Tabla 6. Número de proteínas únicas y sobreexpresadas, en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas o no a exudados radiculares.....	75
Tabla 7. Proteínas identificadas exclusivamente en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas o no a exudados radiculares, detectadas mediante la aproximación <i>shotgun</i>	77
Tabla 8. Proteínas con expresión diferencial en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas a exudados radiculares, identificadas mediante la aproximación <i>shotgun</i>	79
Tabla 9. Comparación de los resultados obtenidos aplicando la técnica de DIGE y nano LC-MS/MS con conteo de espectros para la cepa UYSO10.	87

Capítulo IV

Tabla 1. Cuantificación de las poblaciones planctónicas de la cepa UYSO10 en el experimento de interacción con plantas de caña de azúcar.....	102
Tabla 2. Comparación del número total de espectros bacterianos detectados por réplica y tratamiento, así como el porcentaje de espectros asignados a posibles contaminaciones.....	103
Tabla 3. Medida del pH y fuentes de N en el medio de co-cultivo de caña de azúcar y la cepa UYSO10, a las 48 h pi.....	104

Capítulo V

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.....	119
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	120
Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo.....	124
Tabla 4. Cepas utilizadas para la construcción de las cepas de UYSO10 mutantes y complementadas en los genes <i>nifH</i> y <i>anfH</i> mutados y para los controles.....	126
Tabla 5. Análisis fisicoquímico del suelo utilizado en el ensayo de respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con las cepas UYSO10 parental y mutantes.....	128
Tabla 6. Tamaños esperados de los productos de amplificación de las PCR realizadas para confirmar las construcciones en las cepas UYSO10 mutantes.....	131
Tabla 7. Actividad nitrogenasa de la cepa UYSO10 parental y las mutantes.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Principales rutas de colonización de la planta por bacterias endófitas.....	10
---	----

Capítulo II

Figura 1. Vista de los ensayos en placa realizados para evaluar las actividades endoglucanasas, hemicelulasas, proteasas, peroxidasa y lacasa.....	34
--	----

Figura 2. Vista de las actividades superóxido dismutasa y catalasa, mediante geles de poliacrilamida nativos.....	35
---	----

Figura 3. Curvas de crecimiento de las cepas UYSO10, UYSO24, Z67y KT2440 en medios de cultivo LGI suplementado con diferentes fuentes de N.....	36
---	----

Figura 4. Gel de agarosa mostrando el producto de amplificación del gen <i>acdS</i> , utilizando los cebadores AccF-AccR y F1937-F1939.....	37
---	----

Figura 5. Micrografía electrónica de suspensiones bacterianas de las cepas UYSO10 y UYSO24, contrastadas con tinción negativa.....	38
--	----

Figura 6. Vista de las placas donde se evaluó la capacidad de moverse en forma de <i>swimming</i> , en las cepas UYSO10 y UYSO24.....	38
---	----

Figura 7. Vista del ensayo en placa realizado para la detección de PHB y/o acumulación de lípidos.....	39
--	----

Figura 8. Vista de los ensayos en placa para la detección de productores de sideróforos y solubilizadores de potasio.....	39
---	----

Figura 9. Curvas de crecimiento de las cepas UYSO10 y UYSO24, en los medios de cultivo TY, MS, MS + N y MS + exudados, apoplasto puro y MS + apoplasto.....	40
---	----

Figura 10. Micrografías de MEB mostrando la colonización por la cepa UYSO24, de la superficie de plantas de caña de azúcar micropropagadas a las 24 h pi.....	44
---	----

Figura 11. Micrografías de MO y MET de secciones transversales de tejido aéreo mostrando la colonización interna de los tejidos de cañas de azúcar micropropagadas por la cepa UYSO24.....	45
--	----

Figura 12. Micrografías de MET de secciones transversales de tallos de caña de azúcar mostrando bacterias marcadas por inmuno-localización con oro, utilizando el antisuero contra la cepa UYSO10.....	46
--	----

Figura 13. Micrografías de MO de secciones transversales de tallos de caña de azúcar colonizadas por la cepa UYSO10.....	47
--	----

Figura 14. Análisis de la especificidad <i>in vivo</i> de los cebadores utilizados para las cepas UYSO10 y UYSO24, en los experimentos PCR cuantitativa.....	48
Figura 15. Cuantificación de la población endofítica de la cepa UYSO24 en raíces y tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas.	49
Figura 16. Cuantificación de la población endofítica de la cepa UYSO10 en raíces y tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas.....	49
Figura 17. Micrografía mediante MEB mostrando la colonización de la superficie de raíces de cañas de azúcar micropropagadas por las cepas utilizadas como referencia a las 24 h pi.....	50

Capítulo III

Figura 1. Estrategia experimental utilizada para estudiar la respuesta bacteriana a los exudados radiculares.....	59
Figura 2. Estrategia general de la técnica deDIGE seguida en este estudio.....	60
Figura 3. Estrategia general de la aproximación del tipo <i>shotgun</i> empleada en este estudio....	64
Figura 4. Visualización por SDS-PAGE de los perfiles de los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24, teñidos con Azul de Coomassie.....	67
Figura 5. Visualización mediante SDS-PAGE de los perfiles de los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24 marcados con los fluoróforos Cy2,Cy3 y Cy5.....	68
Figura 6. Análisis por DIGE de los extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en presencia y ausencia de exudados radiculares.....	69
Figura 7. Análisis por DIGE de los extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en presencia y ausencia de exudados radiculares.....	71
Figura 8. Análisis de principales componentes de las réplicas biológicas del proteoma de la cepa UYSO10 creciendo en presencia y ausencia de exudados.....	74
Figura 9. Diagrama de volcán mostrando las proteínas expresadas diferencialmente en presencia y ausencia de exudados.....	76
Figura 10. Clasificación en categorías funcionales COG de las proteínas presentes únicamente o sobreexpresadas en presencia de exudados.....	82
Figura 11. Representación esquemática de las principales vías del metabolismo del C identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares.....	89
Figura 12. Representación esquemática de las enzimas y sus subunidades que cambian su expresión en el Ciclo de Krebs, identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares.....	90

Figura 13. Análisis esquemático de las posibles fuentes de N y su metabolización, identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares.....93

Figura 14. Ilustración de las proteínas identificadas y asociadas a la envoltura celular, transducción de señales, movilidad y adhesión en la cepa UYSO10 en presencia de exudados radiculares.....95

Capítulo IV

Figura 1. Estrategia experimental utilizada para estudiar el proteoma de la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.....100

Figura 2. Ilustración de las proteínas identificadas y asociadas a la envoltura celular, transducción de señales, movilidad y adhesión en la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.....107

Figura 3. Ilustración de los mecanismos de la cepa UYSO10 expresados en co-cultivo y posiblemente asociados a la interacción con plantas de caña de azúcar.....110

Figura 4. Ilustración del metabolismo de C y N activo en la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar en forma planctónica.112

Capítulo V

Figura 1. Aproximación empleada para la construcción de la mutante en los genes *nifH* y *anfH*, mediante el empleo del sistema ISce-I: construcción de la cepa UYSO10 $\Delta nifH$ *anfH*::pEMG- $\Delta anfH$121

Figura 2. Aproximación empleada para la construcción de la mutante en los genes *nifH* y *anfH*, mediante el empleo del sistema ISce-I: inducción de la resolución del cointegrado.....125

Figura 3. Gel de agarosa mostrando la verificación por PCR de las diferentes mutantes realizadas en la cepa UYSO10.....130

Figura 4. Curvas de crecimiento en medio de cultivo LB, de la cepa UYSO10 y las diferentes mutantes.....132

Figura 5. Vista del ensayo de PCV de plantas de caña de azúcar inoculadas con las cepas UYSO10 parental y mutantes, a los 3 meses pi.....134

Figura 6. Respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las mutantes en las enzimas nitrogenasas.....134

Figura 7. Arreglo genético de los genes que codifican para la MoFe-nitrogenasa y FeFe-nitrogenasa en la cepa UYSO10 y su comparación con la cepa *K. radicincitans* DSM16656.....138

RESUMEN

Los endófitos son bacterias que durante parte o todo su ciclo de vida, invaden los tejidos de plantas vivas sin provocar síntomas de enfermedad. Éstos son de gran interés por su potencial aplicación biotecnológica en los sistemas agrícolas, debido a su capacidad de promover el crecimiento vegetal. La interacción de las bacterias endófitas con las plantas constituye un proceso dinámico que depende de un ambiente adecuado y de factores genéticos. Si bien se conocen varias características bacterianas involucradas en las distintas etapas de la interacción, poco se conoce de las bases moleculares imperantes en la misma. En este sentido se hace necesario entender el proceso de señalización y de regulación de la colonización, ya que dicho conocimiento tiene implicancias en el diseño de nuevas estrategias para promover las interacciones benéficas con las plantas hospederas.

En este trabajo nos basamos en la hipótesis de que las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 son endófitos verdaderos y su proteoma se adapta a la interacción con la planta hospedera. Para esto, como objetivo nos planteamos describir el proceso de interacción de plantas de caña de azúcar por las cepas UYSO10 y UYSO24, e identificar características bacterianas posiblemente involucradas.

En una primera instancia se realizó una caracterización *in vitro* e *in vivo* de las cepas en estudio. Los resultados mostraron que ambas cepas presentan diferentes características posiblemente involucradas en la interacción y se los definió como endófitos verdaderos.

A continuación, se estudiaron diferentes pasos de la interacción planta-endófito, comenzando con el análisis de la respuesta de las cepas a la presencia de exudados de las raíces de plantas de caña de azúcar, mediante un abordaje proteómico. Los resultados mostraron que en presencia de exudados las cepas en estudio adaptan su proteoma con la finalidad de transportar y metabolizar los nutrientes presentes en los exudados, así como para su posterior interacción con la planta.

Posteriormente se analizó la respuesta de la cepa UYSO10 de crecer en co-cultivo con plantas de caña de azúcar, mediante un abordaje proteómico. En este caso, los resultados mostraron que el proteoma de la cepa UYSO10 se adapta para el censado de diferentes señales ambientales y para la interacción con la planta hospedera.

Finalmente, se estudió en la cepa UYSO10 el rol de la nitrogenasa en la promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar. La misma se realizó mediante la construcción y caracterización de cepas mutantes en los genes *nifH* y *anfH*. Los resultados obtenidos sugieren que los dos tipos de nitrogenasas presentes en esta cepa son funcionales y necesarias para la promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

Las bacterias fueron los primeros organismos vivos en la tierra. Dentro de los grandes cambios que provocaron se encuentra la generación de una atmosférica rica en oxígeno que permitió la aparición de nuevas formas de vida. Durante la aparición, adaptación y evolución de lo que hoy conocemos como las plantas, formas de vida existentes como las bacterias, reconocieron y colonizaron estos nuevos individuos como nuevos hábitats. De igual forma, las primeras “plantas” se adaptaron a la vida en la Tierra conviviendo con las diversas formas de vida que existían. Por ejemplo, hay evidencia molecular que sugiere que la asociación de las micorrizas con las algas verdes fue fundamental en la evolución de las plantas terrestres hace 700 millones de años [1]. Actualmente, la mayoría de las plantas mantienen esta asociación, la cual ayuda a las raíces a obtener nutrientes como el fósforo [2].

A lo largo del tiempo, los microorganismos y las plantas han co-evolucionado formando distintos tipos de interacciones, entre ellas sinérgicas, antagónicas o neutras [2,3]. Desde el punto de vista de las plantas una interacción sinérgica puede mejorar su crecimiento, mientras que una relación deletérea significa una disminución en el crecimiento de la planta y el posible desarrollo de una enfermedad. Dentro de las interacciones sinérgicas más estudiadas y mejor entendidas se encuentran la simbiosis rizobio-leguminosa, así como la que incluye los hongos micorrízicos [4]. Es interesante resaltar que estudios de las vías de comunicación en ambas interacciones planta-microorganismo, han mostrado similitudes en el proceso de reconocimiento y señalización. En particular, la señalización utilizada por rizobios y hongos micorrízicos para invadir las raíces de leguminosas se encuentra solapada, sugiriendo la hipótesis que la simbiosis micorrízica pudo ser el precursor de la simbiosis leguminosa-rizobio [2, 4]. Por otro lado, la interacción planta-patógeno ha sido también muy estudiada, principalmente debido a las pérdidas económicas asociadas a los cultivos enfermos [5, 6].

Actualmente, el microbioma o conjunto de genomas de la comunidad microbiana asociada a las plantas, se considera una extensión del genoma del hospedero [1]. En los últimos años varios trabajos han tenido como objetivo entender cuál es la función ecológica de la microbiota o conjunto de microorganismos de una comunidad asociada a los tejidos de las plantas, debido a que se considera que es un determinante de la

productividad y salud vegetal [7]. En ese sentido, la manipulación de la microbiota vegetal tiene el potencial de reducir la incidencia de enfermedades, aumentar la producción agrícola, reducir la incorporación de químicos y la emisión de gases con efecto invernadero, lo que en su conjunto resulta en el desarrollo y empleo de prácticas agrícolas más sustentables [1]. Si bien, dentro de la microbiota existen interacciones con la planta bien entendidas, la mayoría de la microbiota y su contribución al fenotipo del hospedero no se encuentra bien comprendida [1]. A su vez, se ha reportado que las plantas y posiblemente su sistema inmune, poseen un rol clave en determinar la estructura y composición de la misma [1, 7].

En particular, se pueden clasificar las bacterias que interactúan con las plantas según su ubicación, en bacterias en vida libre o asociadas, ya sea como bacterias epifíticas (bacterias que habitan la rizósfera y/o filósfera) o bacterias endófitas que habitan en el interior de la planta. Dentro de este grupo debemos diferenciar los rizobios y las bacterias patógenas.

2. INTERACCIÓN LEGUMINOSA-RIZOBIO

La interacción entre los rizobios y la familia de las leguminosas es de las más estudiadas y mejor entendidas. La misma se inicia mediante un conocido intercambio de señales químicas entre ambas partes, proceso conocido como “diálogo molecular” [8]. Dicho diálogo comienza con el censado por parte de los rizobios de los flavonoides secretados por la raíz, generando un movimiento quimiotáctico hacia las raíces de las plantas. En respuesta a los flavonoides, los rizobios secretan los factores Nod [8, 9]. Estos factores son lipoquitooligosacáridos (LCOs), que elicitán en la planta una serie de respuestas fisiológicas y de desarrollo, culminando en la organogénesis de un nuevo órgano, el nódulo. A su vez, los factores Nod son los principales determinantes de la especificidad de la interacción, ya que diferentes rizobios producen LCOs con diferentes sustituciones [8].

En el proceso de interacción, los rizobios se adhieren a los pelos radiculares, los cuales se enrulan y a través del mismo penetran mediante la invaginación de la membrana, formando un hilo de infección. Posteriormente los rizobios ingresan a la planta, se dividen e invaden las células corticales [10]. En respuesta a la infección, las células corticales forman el nódulo mencionado, donde las bacterias sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, diferenciándose en bacteroides, estado en el cual son capaces de realizar la fijación biológica del N (FBN) [10]. Los bacteroides se encuentran separados del citoplasma por una única membrana de la planta llamada peribacterioide, la cual controla el intercambio de nutrientes. De esta forma, la planta

provee a la bacteria con esqueletos carbonados utilizados para crecer y como fuente de energía, mientras que el N fijado por los rizobios es transportado en la dirección opuesta hacia los tejidos de la planta, quien lo asimila [4].

3. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Para establecerse exitosamente, los patógenos bacterianos deben colonizar la superficie vegetal como epífitos, para luego ingresar a la planta a través de aperturas naturales (ej. estomas o heridas), o alternativamente mediante insectos vectores. Una vez dentro, deben ser capaces de invadir los tejidos del hospedero y adquirir nutrientes, desafiando las respuestas de defensa de las plantas [11, 12]. Como primera respuesta a la colonización por patógenos, la planta reconoce ciertos componentes bacterianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (en inglés: *pathogen-associated molecular patterns* o PAMPs). Entre los PAMPs más conocidos se encuentran la flagelina, el factor de elongación EF-Tu, el peptidoglicano, los lipopolisacáridos (LPS), así como proteínas de *cold shock* [3, 12, 13]. La activación de este sistema inmune ocurre a través de receptores localizados en la membrana plasmática de la planta (en inglés: *pattern recognition receptors* o PRR), los cuales inducen una variedad de respuestas defensivas conocidas como inmunidad activada por PAMPs (en inglés: *PAMP triggered immunity* o PTI). El PTI es un programa defensivo que lleva a una reprogramación transcripcional masiva incluyendo el cierre de los estomas, la producción de especies reactivas del oxígeno, el engrosamiento de la pared celular y la producción de compuestos antimicrobianos. Sin embargo, algunos patógenos suprimen o interfieren exitosamente la respuesta PTI mediante la secreción de diferentes compuestos como efectores, proteasas o toxinas, que facilitan la colonización [11]. En este contexto, las plantas también evolucionaron expresando proteínas receptoras intracelulares específicas (R) que detectan los efectores, e inician un programa de defensa llamado inmunidad activada por efectores (en inglés: *Effector Triggered Immunity* ETI). Las proteínas R son generalmente receptores citosólicos con unión a nucleótido (*nucleotide binding site* o NBS) y su acción desencadena diferentes respuestas para combatir a los patógenos [11, 13]. Las respuestas de la planta inducidas por PAMPs o por los efectores, utilizan como señales algunas hormonas vegetales como el ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno. Éstas hormonas inician las defensas órgano específicas, así como influyen en el crecimiento vegetal. De esta forma el crecimiento vegetal y la respuesta al estrés se presentan como fenómenos opuestos en la planta [14].

Debido al constante refinamiento de las proteínas efectoras de los patógenos, así como a los genes de resistencia de la planta, la interacción entre bacterias patógenas y sus hospederos es conocida como “una carrera armamentista” [15].

4. INTERACCIÓN PLANTA-ENDÓFITO

El término **endófito** fue inicialmente definido en referencia a hongos o bacterias que durante parte o todo su ciclo de vida invaden los tejidos de plantas vivas causando una infección no aparente, o sea no provocando síntomas de enfermedad [16]. Más tarde y con fines prácticos se definió el término endófito en referencia a las bacterias que pueden ser aisladas o extraídas de tejidos de plantas esterilizadas en su superficie y que no causan un daño visible en la misma [17]. Posteriormente se propuso el criterio para identificar endófitos "verdaderos", el cual hace referencia a bacterias que no solamente fueron aisladas de tejidos estériles, sino que además se tiene evidencia microscópica de su presencia dentro de los tejidos [18]. A su vez, los endófitos deben cumplir con el postulado de Koch y ser capaces de infectar nuevamente al hospedero. A diferencia de los rizobios, no viven dentro de las células vivas y no inducen la formación de una estructura vegetal diferenciada [19].

En términos evolutivos, se considera a las bacterias endófitas como intermediarios entre bacterias saprófitas y patógenas, bacterias que potencialmente pueden evolucionar a un estado patogénico o como bacterias más evolucionadas que han sido conservadas por el beneficio resultante para la planta [20]. Debido a que ocupan en la planta un hábitat muy parecido al de las bacterias patógenas, varios autores han buscado la presencia de características únicas en los endófitos, con el fin de entender las diferencias genómicas entre éstos y los patógenos [21, 22]. Los resultados de estos trabajos mostraron que no se han encontrado características únicas que permitan la categorización de una bacteria como endófito [22]. Sin embargo, a pesar de que los endófitos pueden presentar varias características similares a los patógenos, los mecanismos de expresión y regulación son diferentes, así como la coordinación de actividades y la comunicación célula a célula en comunidad [21]. Estos autores sostienen que, si bien el límite entre estas formas de vida sigue siendo difuso, la diferencia podría venir de una interacción compleja y multifactorial.

El hábitat endofítico constituye un ambiente protegido en comparación con el suelo o la rizósfera, confiriendo una ventaja ecológica a las bacterias capaces de colonizarlo [20, 23]. En ese sentido, las bacterias encuentran en él una fuente de nutrientes, baja competencia y protección frente al estrés ambiental, asegurándose su dispersión por transferencia en forma pasiva [24]. Por otro lado, el interior de la planta puede

considerarse también un ambiente hostil si se tienen en cuenta los mecanismos de defensas presentes en la planta. Sin embargo, la vida dentro de los tejidos permite a estas bacterias interactuar en una forma más directa con la planta, pudiendo ser la transferencia de los efectos beneficiosos, mayores que en las interacciones rizosféricas [23, 25].

En general se ha reportado que existe cierta especificidad genotipo bacteriano-genotipo planta [11], donde también influyen en la colonización las condiciones ambientales [26–28]. Finalmente, las bacterias endófitas son de interés por su potencial aplicación biotecnológica en los sistemas agrícolas [24]. Dentro de los beneficios posibles potencialmente explotables, se encuentra la promoción del crecimiento vegetal y el control de enfermedades [24].

4. 1 PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL POR BACTERIAS ENDÓFITAS

Los mecanismos por los cuales las bacterias promueven el crecimiento vegetal pueden clasificarse en **mecanismos directos** como la regulación del crecimiento y la biofertilización, y en **mecanismos indirectos** como el control de organismos patógenos (biocontrol) y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas [29, 30]. Si bien algunos de estos mecanismos han sido confirmados para bacterias endófitas, en general se asume que estos mecanismos descritos en principio para bacterias rizosféricas son los mismos que presentan las bacterias endófitas.

4. 1. 1 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL O FITOESTIMULANTES

La regulación del crecimiento engloba diversos mecanismos por los cuales el crecimiento vegetal se ve modulado o alterado. Las bacterias pueden producir fitohormonas como auxinas, giberelinas, ácido abscísico y citoquininas o modular su concentración como en el caso del etileno. Las fitohormonas son fundamentales como reguladoras del desarrollo vegetal, contribuyen a la coordinación de diversos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, floración, la ramificación, macollaje y la maduración de los frutos, e influyen en la resistencia de las plantas a factores ambientales [31]. La producción de hormonas de crecimiento vegetales es considerada una característica importante y posiblemente el mayor mecanismo de promoción vegetal por bacterias endófitas [23]. Dentro de la fito-estimulación también se incluye la modulación del desarrollo radicular mediante la producción de óxido nítrico [32] o compuestos orgánicos volátiles como la acetoina y el 2,3 butanodiol [33].

Producción de auxinas. Se considera que casi el 80% de las bacterias rizoféricas son capaces de sintetizar ácido indol acético (AIA) [34]. El AIA suministrado por la bacteria

a la planta, puede incrementar el desarrollo de las raíces, permitiendo a la planta explorar mejor el suelo, accediendo a más nutrientes y agua [34]. Se conocen 6 vías de síntesis del AIA, incluyendo 5 vías dependientes de triptófano: que presentan como enzimas características la indol-3-piruvato, la indol-3-acetamida, la triptamina, la triptófano oxidasa de cadena lateral o la indol-3-acetonitrilo; así como una vía independiente del triptófano [31]. De las vías descritas, las más comunes son las dependientes del triptófano, el cual es secretado por la planta [35].

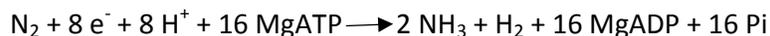
Modulación de los niveles de etileno. La modulación de la concentración de etileno es realizada por la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, la cual hidroliza el ACC que es el precursor inmediato del etileno, produciendo amonio y α -cetobutirato [36]. En particular, la disminución de los niveles de etileno posee como consecuencia la promoción en la elongación de la raíz y la disminución de la respuesta de defensa en algunas plantas.

4. 1. 2 BIO-FERTILIZACIÓN

Las bacterias pueden actuar como biofertilizantes convirtiendo nutrientes y minerales como N, P, K y Fe, en formas biodisponibles por las plantas. Estos procesos son muy importantes para la agricultura ya que constituyen una alternativa a los fertilizantes químicos utilizados en los sistemas productivos. A su vez, el uso de fertilizantes químicos conlleva graves problemas ambientales, debido a que las plantas pueden asimilar hasta un 50 % de los fertilizantes suministrados perdiéndose el resto por escorrentía y lixiviación, pudiendo contaminar cursos de agua [37].

Fijación biológica del nitrógeno. El N es un constituyente esencial de la mayoría de las biomoléculas. Si bien el N₂ conforma el 78% de la atmósfera, este se encuentra poco biodisponible dado que la mayoría de los organismos no son capaces de reducir el N₂ y utilizarlo como fuente de N [38]. La FBN es el proceso por el cual el N₂ es reducido a amonio (NH₄⁺) y es realizado por un grupo de procariotas denominados diazótrofos (*diazo* = N, *trofos* = comida). Este proceso es muy importante en el ciclo del N, ya que aporta un 60 % del N fijado [38].

La enzima encargada de llevar a cabo la FBN es la nitrogenasa, la cual es sensible al oxígeno. Esta enzima cataliza la reducción del N₂ dependiente de ATP, formando dos moléculas de NH₃, según la siguiente reacción:



La nitrogenasa o MoFe-nitrogenasa está conformada por dos componentes metaloproteicos, la dinitrogenasa (Fe proteína) y la dinitrogenasa reductasa (FeMo proteína), codificados por los genes *nifHDK* [39]. Si bien todos los diazótrofos poseen la nitrogenasa clásica (MoFe-nitrogenasa), existen algunos microorganismos que poseen

además una o dos nitrogenasas alternativas (VFe- y FeFe-nitrogenasa) [39]. En las enzimas alternativas, el Mo del sitio catalítico es sustituido por V o Fe.

Con el objetivo de adaptar el proceso de FBN a las restricciones fisiológicas, las bacterias diazótroficas presentan varios mecanismos para censar múltiples señales ambientales como la disponibilidad de N fijado (principalmente amonio y glutamina) o de O₂. La regulación del proceso es principalmente a nivel transcripcional y en algunos casos, se ha reportado la regulación postraducciona de la nitrogenasa mediante una inactivación reversible [40].

Solubilización de fosfato. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos aumentan el P disponible para las plantas por solubilización del P inorgánico o mineralización de P orgánico [41]. Las bacterias pueden solubilizar el P inorgánico a partir de fosfatos de calcio, aluminio o hierro, proceso que se asocia generalmente a la liberación de ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, láctico, succínico y glucónico), con la consecuente quelación de los iones Ca²⁺, Fe³⁺ y Al³⁺ y liberación de los iones ortofosfato.

Por otro lado, la mineralización de P orgánico en el suelo y la consecuente liberación de iones ortofosfato, esta mediada por la actividad microbiana. La mineralización frecuentemente requiere de la solubilización de sustratos con la consecuente hidrólisis por fosfatasas. Los microorganismos producen diferentes enzimas incluyendo fosfatasas ácidas y alcalinas no específicas y enzimas específicas como fitasas que liberan ortofosfatos a partir de fitato y otros inositoles fosfatos [41].

Solubilización de hierro. En condiciones aerobias y principalmente a pH neutro o alcalino, el Fe se encuentra en forma de hidróxidos insolubles, por lo que su biodisponibilidad para las plantas es muy baja. En estas condiciones, las plantas responden produciendo y excretando fitosideróforos, compuestos quelantes que unen Fe³⁺ y lo transportan a la superficie de la raíz donde es reducido y absorbido por la planta [43]. Por otro lado, muchas bacterias en condiciones de deficiencia de Fe producen sideróforos con alta especificidad por el Fe³⁺, el cual es internalizado en la célula a través de receptores de membrana externa que reconocen específicamente el complejo Fe³⁺-sideróforo [44]. Debido a esta característica, los sideróforos bacterianos afectan la comunidad rizosférica, por ser buenos competidores por el Fe nutricional [43].

4. 1. 3 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico implica la prevención de la proliferación de organismos patógenos por microorganismos [42]. El mismo puede deberse al establecimiento de una competencia por los nutrientes, como ser N, Fe, P, espacio, H₂O, O₂ o luz. A su vez las bacterias biocontroladoras pueden producir metabolitos secundarios tóxicos como antibióticos o bacteriocinas, inhibiendo así el crecimiento de los patógenos.

4. 1. 4 INDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA EN PLANTAS

La resistencia sistémica inducida (RSI) es un estado de elevada capacidad de defensa desarrollado por una planta al ser adecuadamente estimulada [42]. Los disparadores de la RSI son variados, incluyendo diferentes componentes bacterianos como los flagelos, LPS, surfactantes lipopeptídicos, sideróforos, así como la producción de compuestos orgánicos volátiles como la acetoina y el 2,3 butanodiol [42,45].

4. 2 COLONIZACIÓN DE LAS PLANTAS POR LAS BACTERIAS ENDÓFITAS

La interacción de las bacterias con las plantas constituye un proceso dinámico que depende de un ambiente adecuado y de factores genéticos. Las bacterias endófitas son bacterias del suelo, del filoplasma o que están presentes en las semillas o en el material de propagación vegetativa, las cuales colonizan el interior de los tejidos de las plantas [20]. A continuación, se describirá la principal vía de colonización de la planta por las bacterias del suelo. En este caso, el proceso involucra el reconocimiento inicial de señales moleculares, seguido del movimiento de la bacteria en dirección a la planta hospedera, su adhesión a la superficie vegetal, colonización del rizoplasma y posterior penetración y multiplicación en el interior de los tejidos, pudiendo alcanzar una dispersión sistémica a través de los tejidos vasculares [19] (Figura 1). Una colonización endofítica exitosa involucra un hospedero compatible.

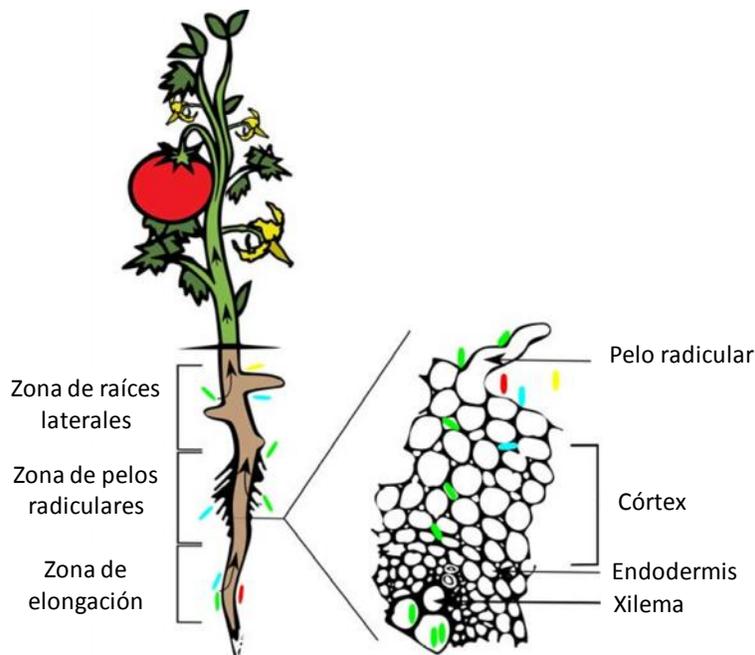


Figura 1. Principales rutas de colonización de la planta por bacterias endófitas. Las bacterias endófitas pueden ingresar a la planta en distintas zonas de la raíz. Una vez dentro, los endófitos pueden permanecer cerca de la zona de entrada (bacterias celestes) o moverse hacia el interior de la raíz,

ocupando los espacios intercelulares del córtex y los vasos del xilema (bacterias verdes). Algunas bacterias pueden moverse y colonizar nuevos órganos o tejidos. Las bacterias rojas y amarillas representan las bacterias rizosféricas que son incapaces de colonizar los tejidos internos de la planta. Modificado de Malfanova y colaboradores (2013).

4. 2. 1 ACERCAMIENTO Y ADHESIÓN BACTERIANA A LA SUPERFICIE RADICULAR

Los mecanismos de acercamiento espacial de la bacteria pueden ser **pasivos**, si la bacteria se encuentra en la semilla o en la yema de propagación vegetativa, o **activos** a través del movimiento por atracción quimiotáctica hacia la superficie de la raíz [46]. Para las plantas, los exudados radiculares representan un componente importante en la comunicación con los microorganismos de la rizósfera. En los mismos se encuentran un amplio grupo de sustancias ricas en carbono y energía, así como moléculas señales [47]. Asimismo, las plantas pueden modificar sus exudados dependiendo de su estado fisiológico y de la microbiota presente en la rizósfera [48]. De esta forma las plantas reconocen y responden específicamente a microorganismos benéficos o patógenos presentes, iniciando la comunicación mediante la producción de señales que pueden modular su colonización [47, 49].

Entre los quimio atrayentes más comunes se encuentran moléculas exudadas por las raíces como los ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos [50]. Particularmente, se ha demostrado en algunos endófitos, que los flavonoides actúan como señales al igual que en las interacciones leguminosa-rizobio y actinorrizas-frankia [51, 52].

Por ejemplo, se observó que ciertos flavonoides estimulan la colonización de plantas de trigo por *Azorhizobium caulinodans* y de maíz por *Herbaspirillum seropedicae* [53, 54]. Asimismo, se ha observado que diversos compuestos químicos liberados por las plantas reclutan específicamente a determinado tipo de bacteria como el caso de la secreción de la benzoxazina DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4 benzoxazin-3(4H)) por plantas de maíz y la rizobacteria *Pseudomonas putida* KT2440; o la secreción de ácido málico por *Arabidopsis*, y la cepa *Bacillus subtilis* FB17 [55, 56].

Una vez que la bacteria se ha desplazado, generalmente por medio de flagelos, hacia la superficie radicular, comienza el desarrollo de la interacción entre la bacteria con la pared celular vegetal, a través de uniones electrostáticas débiles, las cuales son rápidas, **inespecíficas y reversibles** [57].

4. 2. 2 ANCLAJE BACTERIANO Y COLONIZACIÓN DE LA SUPERFICIE RADICULAR

En esta etapa la interacción es **específica e irreversible** involucrando estructuras bacterianas para la adhesión a la superficie de la raíz como fimbrias, pilis, LPS exopolisacáridos (EPS) y proteínas de membrana externa como porinas y la proteína mayor de membrana externa [8, 11, 52, 58–62]. Se ha visto que el establecimiento

bacteriano en los sitios de adhesión puede ser en forma de agregados y/o formando películas bacterianas [19]. Se considera que tanto los agregados como las biopelículas constituyen un microambiente óptimo para la transferencia horizontal de genes, así como para el intercambio de señales de *quorum sensing*, adjudicándole a las finas capas que los cubren, posiblemente compuestas de EPS, la función de barrera de difusión de dichas moléculas [63, 64].

La adhesión junto con el desarrollo de una población bacteriana presenta una ventaja selectiva para la bacteria, aumentando la probabilidad de ingresar a los tejidos internos. Por lo tanto, los endófitos que infectan plantas tienen que ser colonizadores competitivos y posicionarse estratégicamente en los sitios de potencial ingreso a la raíz [50].

4. 2. 3 INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE LOS TEJIDOS INTERNOS RADICULARES

El ingreso a los tejidos de la planta normalmente es **pasivo** y se realiza a través de las aperturas naturales como el área de emergencia de las raíces laterales y de la cofia [19, 65]. Asimismo, la infección puede darse pasivamente a través de heridas causadas por factores bióticos o abióticos.

Por otro lado, se han descrito también procesos **activos** de ingreso a los tejidos, los cuales involucran vectores (insectos) o la participación de enzimas del tipo endoglucanasas y pectinolíticas como en el caso de *Azoarcus*, *Klebsiella* y *Burkholderia* [66–68].

La colonización interna de los tejidos por parte de las bacterias ocurre primariamente en los espacios intercelulares, reportándose en el caso de *Azoarcus* sp. BH72 su presencia intracelular pero únicamente en células muertas [65]. Una vez dentro de la planta, las bacterias endófitas pueden permanecer en un tejido específico o colonizar la planta sistemáticamente, transportándose por los tejidos vasculares o el apoplasto [46]. Se considera que las bacterias para atravesar la barrera que constituye la endodermis e ingresar al tejido vascular, utilizan las rupturas naturales causadas por la aparición de raíces secundarias o a través de células indiferenciadas de la cofia. En este sentido, se han definido como **endófitos competentes**, a aquellas bacterias que poseen la maquinaria genética para infectar el espacio endofítico y persistir en él. Por lo tanto, son bacterias que poseen mecanismos que le aportan una rápida adaptación a un ambiente muy diferente en cuanto a pH, presión osmótica, fuentes de C y disponibilidad de oxígeno [50].

En general se considera que las bacterias benéficas evolucionaron en términos de poder reducir la capacidad de estimular el sistema inmune del hospedero. Lo mismo ocurre en los rizobios, los cuales mediante los factores Nod, suprimen la señalización de defensas de las leguminosas vía el ácido salicílico [69, 70]. Por lo tanto, el estado endofítico de una bacteria dependerá de factores probabilísticos, como la presencia de

los niveles bacterianos necesarios para una colonización endofítica exitosa, y que los mismos entren en contacto con zonas de activa división celular (cofia y desarrollo de raíces secundarias). Asimismo, dependerá de factores determinantes como la presencia de componentes genéticos dedicados a la interacción por ambas partes.

4. 2. 4 LA COLONIZACIÓN ENDOFÍTICA DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LAS PLANTAS

Las plantas se encuentran constantemente desafiadas por las fluctuaciones del ambiente, entre ellas la presencia de microorganismos en la rizósfera [11]. Se ha demostrado que las interacciones benéficas y patogénicas comparten algunas vías, sugiriendo que la respuesta adaptativa de las plantas debe estar finamente regulada de forma de balancear entre la respuesta de protección contra patógenos y el beneficio de interactuar con bacterias PCV [2, 11]. Si bien deben existir mecanismos de reconocimiento y de señalización similares entre una interacción patogénica o benéfica, es posible suponer que los primeros pasos de percepción y reconocimiento de la bacteria como benéfica, son cruciales en determinar el tipo asociación [11]. Varias líneas de evidencia sugieren que el reconocimiento inicial de las bacterias benéficas activa el sistema inmune de la planta y luego en etapas posteriores de la asociación, la expresión de genes de defensa es reprimida [2]. En particular en gramíneas se ha visto que la inducción de respuestas de defensa por parte de la planta contribuye a la restricción de la colonización de las bacterias [70].

Receptores de la planta. Como se mencionó, las plantas reconocen la colonización bacteriana mediante los PAMPs o MAMPs (*microbial-associated molecular patterns*) [71]. El mecanismo de reconocimiento a las señales bacterianas es principalmente vía receptores tipo quinasas, muy estudiado en patógenos y poco en endófitos [11]. Uno de los receptores más estudiados en patógenos es el FLS2, el cual es un receptor tipo quinasa con motivo de leucina repetido (*leucine rich repeat containing receptor like kinases* o LRR-RLK), que reconoce la flagelina. Se considera que además de reconocer bacterias patógenas, puede ser también una señal en bacterias benéficas. En ese sentido, se ha demostrado que cuando se inoculan plantas de vid (*Vitis vinífera*) con el endófito PCV *Burkholderia phytofirmans*, se induce a través de FLS2 una menor respuesta de defensa por parte de la planta que cuando se inocula con patógenos [72]. Sin embargo, cuando se inocula *B. phytofirmans* a plantas de *Arabidopsis thaliana*, no se observa un efecto promotor del crecimiento vegetal (PCV) tan marcado como en el caso de la vid y se expresan los mecanismos de defensa de la planta [72]. A partir de estos resultados se postula que hubo una evolución de la flagelina y del receptor que llevó a diferentes tipos de activación de las respuestas de defensa. Por otro lado, en plantas de caña de azúcar se descubrió un nuevo receptor tipo LRR-RLK: SHR5 [73]. Dicho receptor se reprime durante la asociación con bacterias benéficas como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum brasilense*. En

oposición, cuando las plantas fueron expuestas a patógenos u otros estreses abióticos, el receptor no se observó reprimido [73]. Si bien se conoce que miembros de esta familia de receptores poseen roles en el desarrollo de la planta, simbiosis y defensa, aun no se conoce el rol de SHR5 en la interacción bacteria endófito-caña de azúcar [73].

Respuesta de defensa. El establecimiento de una nueva asociación planta-bacteria debe activar una intrincada red de señalizaciones para manejar las defensas de la planta. Una hipótesis es que la bacteria endófito es primero reconocida como un patógeno potencial, activando los mecanismos de defensa, los cuales posteriormente son reprimidos, permitiendo así que se establezca la interacción benéfica [74]. En ese sentido, el establecimiento de esta asociación puede depender de un correcto balance entre las respuestas de defensa inducidas y reprimidas. Por ejemplo, se ha observado la inducción de especies reactivas al oxígeno en la planta frente a la colonización por bacterias benéficas, lo que conlleva a que las bacterias endófitas responden produciendo enzimas detoxificantes [75]. También se observó que plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus* expresaron la vía de biosíntesis de ácido salicílico, el cual se acumula en la respuesta a patógenos y es esencial en la inducción de la respuesta sistémica adquirida (RSA) [74, 76]. Asimismo, se ha observado que las bacterias endófitas pueden modular la respuesta de defensa de las plantas mediante efectores, ampliamente reportado en patógenos [71].

Diversos autores han realizado estudios donde se buscó analizar la respuesta global de la planta frente a la inoculación con bacterias endófitas PCV. Al evaluar la respuesta de distintos cultivares de arroz o de caña de azúcar frente a la inoculación con *Azoarcus* sp. BH72 o *G. diazotrophicus* respectivamente, se observaron respuestas diferenciales. En aquellas interacciones consideradas incompatibles (sin efecto PCV), en las plantas se desencadenaron intensas respuestas de defensa y de estrés, mientras que en las interacciones compatibles (con efecto PCV) la respuesta de la planta fue más atenuada [70, 77].

Asu vez, varios trabajos señalan que componentes específicos en la vía de respuesta del etileno, son modulados en las plantas en respuesta a la colonización por endófitos benéficos, particularmente regulando diferencialmente la expresión de receptores y así la respuesta de defensa frente a bacterias benéficas [74, 78–80].

4. 3 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-ENDÓFITO

En los últimos años, la mayoría de los esfuerzos se han enfocado en estudiar características puntuales de la interacción planta-endófito. Gracias a estos estudios se conocen varios factores bacterianos involucrados en las distintas etapas de la interacción [74]. Sin embargo, este tipo de estudios no permite comprender la

naturaleza compleja y multifactorial de la interacción endófito-planta. Estudios más recientes han comenzado a analizar desde un punto de vista más amplio la naturaleza de dicha interacción.

En ese sentido, es importante conocer como las plantas censan las señales de los microorganismos y cuando reconocen a las bacterias benéficas, de forma de permitir el establecimiento de una interacción benéfica [11]. Otra interrogante aun no respondida es si las bacterias benéficas son siempre percibidas como benéficas y necesarias. Si bien hay muchos beneficios de la interacción, esta no siempre se establece, pudiendo ser que condiciones ambientales como la disponibilidad de agua y nutrientes regulen conjuntamente su establecimiento.

Por otro lado, así como se conoce una comunicación química entre las partes en las simbiosis rizobio-leguminosa y planta-micorrizas arbusculares, la misma debería existir en la interacción planta-endófito [4]. Si bien anteriormente se describieron los pasos de la interacción endófito-planta hospedera, es muy poco lo que se conoce de las bases moleculares de las misma en contraste con los sistemas endosimbióticos bien estudiados, tales como los rizobios y las leguminosas, o los sistemas patogénicos [47, 51].

Entender el proceso de señalización y la regulación de la colonización, tiene implicancias en el diseño de nuevas estrategias para promover las interacciones benéficas con las plantas hospederas.

5. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO Y DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del IIBCE, cuenta con una extensa experiencia en el estudio de la interacción entre bacterias PCV y leguminosas [81–88], así como con gramíneas [89–92]. En particular, la línea de investigación focalizada al estudio de las gramíneas y su microbiota asociada ha tenido como objetivo general aportar conocimiento para el desarrollo de inoculantes, basados en bacterias endófitas PCV nativas, con el fin de sustituir total o parcialmente la fertilización química aplicada. Entre los cultivos que se estudian se encuentran la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), la canola (*Brassica napus*) y la festuca (*Festuca arundinacea*).

Particularmente en la línea de investigación focalizada al estudio de la microbiota asociada a plantas de caña de azúcar, previamente se construyó y caracterizó una colección de BPCV asociadas a variedades de cañas de azúcar cultivadas en Uruguay

[89]. A partir de la misma y mediante ensayos de invernáculo se demostró que las cepas UYSO10 y UYSO24 son PCV al ser inoculadas a plantas micropropagadas [93] o a esquejes de caña de azúcar var. LCP85384 (var. LCP) [94]. Asimismo, mediante ensayos bioquímicos y fisiológicos se determinó que ambas cepas son productoras de ácido indol acético y que la cepa UYSO10 es diazótrofa [89]. Por otra parte, mediante microscopía, se obtuvieron datos preliminares que sugieren que la cepa UYSO10 es un endófito verdadero de caña de azúcar [93].

5.1 MODELO DE ESTUDIO

La caña de azúcar pertenece a la familia *Poaceae*. En nuestro país se cultiva en la región más al norte, en los alrededores de la ciudad de Bella Unión. La propagación del cultivo se realiza asexualmente partiendo de las yemas presentes en los tallos. A su vez durante su industrialización se utilizan los tallos, los cuales constituyen la mayor área de reserva de los productos fotosintéticos (sacarosa). En nuestro país se considera al cultivo multipropósito porque a partir de su explotación se obtienen principalmente azúcar y alcohol etílico utilizado como biocombustible, así como subproductos aprovechables como energía y alimento animal. Uno de los problemas que presenta este cultivo son los altos costos de producción relacionados a la fertilización química nitrogenada.

La cepa UYSO10 fue identificada inicialmente como una γ -Proteobacteria perteneciente al género *Enterobacter*, en base a la secuenciación del gen ARNr 16S. Sin embargo, posteriormente se reclasificó teniendo en cuenta otros trabajos, como perteneciente al género *Kosakonia* [95]. Una vez comenzada esta tesis, se secuenciaron los genomas de ambas cepas en estudio (Beracochea en preparación). A partir del análisis de los mismos se confirmó la pertenencia de la cepa UYSO10 al género *Kosakonia* presentando una alta homología (98,91 % de similitud) con la cepa de referencia *Kosakonia radicincitans* DSM16656^T (Beracochea en preparación). La cepa *K. radicincitans* DSM16656 fue aislada de cultivos de maíz de invierno y se describió como una cepa que *in vitro* es capaz de FBN y solubilizar P por secreción de ácidos orgánicos [96, 97]. Asimismo, se reportó como PCV de plantas de *Arabidopsis*, tomate (*Solanum lycopersicum*), rabanito (*Raphanus sativus*), entre otros [27, 98, 99].

Por otro lado, la α -Proteobacteria *Shinella* sp. UYSO24 se reclasificó como perteneciente al género *Rhizobium* (Beracochea en preparación). Tradicionalmente el género *Rhizobium* ha sido reportado como bacterias nodulantes de leguminosas y fijadoras de N₂, sin embargo, en los últimos años se han aislado bacterias de este género a partir de tejidos esterilizados en su superficie de plantas no leguminosas y se ha demostrado que su inoculación promueve el crecimiento vegetal [92, 100]. Sin embargo, a la fecha el grupo de cepas de *Rhizobium* no nodulantes ha sido poco caracterizado [101–103].

HIPÓTESIS GENERAL

Las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 son endófitos verdaderos y su proteoma se adapta a la interacción con la planta hospedera.

OBJETIVO GENERAL

Describir el proceso de interacción de plantas de caña de azúcar por las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24, e identificar características bacterianas posiblemente involucradas.

CAPITULO II: INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR POR LAS CEPAS *KOSAKONIA* SP. UYSO 10 Y *RHIZOBIUM* SP. UYSO24

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Identificar en las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 características fenotípicas posiblemente involucradas en la colonización e infección radicular.
- 2- Describir el proceso de colonización superficial, infección y colonización de los tejidos internos de las plantas de caña de azúcar var. LCP por la cepa *Rhizobium* sp. UYSO24, mediante microscopía.
- 3- Determinar si las cepas las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 son endófitos verdaderos.
- 4- Cuantificar la población endofítica de las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 en los tejidos internos de plantas de caña de azúcar var. LCP inoculadas.

ESTRATEGIA

Como estrategia para abordar los objetivos específicos planteados se buscó por un lado, identificar características reportadas en la bibliografía como involucradas en la interacción mediante ensayos *in vitro* y por otro, estudiar la colonización de plantas de caña de azúcar mediante la inoculación de las cepas en un sistema *gnotobiótico*.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1. 1 CEPAS BACTERIANAS Y PLANTAS

Las cepas bacterianas empleadas en este capítulo se listan en la Tabla 1.

Por otra parte, se utilizaron plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP, amablemente cedidas por la Dra. Alicia Castillo de la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). A continuación, se describe brevemente el protocolo seguido para su obtención.

El material de partida consistió en las puntas de los brotes de plantas de caña de azúcar crecidas en sustrato estéril (vermiculita:turba) durante 3 meses, en condiciones de invernáculo. Los brotes (4 cm de largo), se esterilizaron en su superficie con hipoclorito de sodio 20 % (v/v), durante 15 min y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. A partir de los mismos, se escindieron los meristemas, los cuales fueron colocados en papel de filtro estéril y posteriormente transferidos a tubos conteniendo medio de cultivo MS base líquido (sin vitaminas) (Anexo A), pero suplementados con las vitaminas descritas en el medio de cultivo Staba (Anexo A), reguladores del crecimiento vegetal [104] y sacarosa 3 % (p/v). Las condiciones de crecimiento fueron 30 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ de irradiación con 16/8 h luz/oscuridad y 21 °C. Después de un mes, los explantes fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación: MS suplementado con 0,1 mg/l benciladenina y una mezcla de antioxidantes [105]. A partir de los mismos se obtuvieron subcultivos cada 3 semanas. Finalmente, las plantas fueron enraizadas en medio de cultivo MS con 1 g/l de carbón activado y a continuación utilizadas en los ensayos de este capítulo.

1. 2 IDENTIFICACIÓN *IN VITRO* DE FACTORES BACTERIANOS VINCULADOS A LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

1. 2. 1 BÚSQUEDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS POTENCIALMENTE RELACIONADAS A LA DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL

Las actividades endoglucanasa y hemicelulasa fueron evaluadas inoculando con ansa las cepas en estudio, en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI sólido (Anexo A), suplementado con carboximetil celulosa sal (CMC) 0,2 % (p/v) o avicel 0,5 % (p/v), respectivamente [106]. A los 7 días posteriores a su inoculación (pi), las colonias fueron removidas utilizando algodón humedecido en NaCl 1 M y las placas incubadas con 10 ml de Rojo Congo 0,05 % (p/v), por 16 h a 4 °C, para finalmente, ser lavadas con NaCl 1 M durante 20 min. En ambos casos, las cepas positivas fueron identificadas por la aparición de un halo de degradación alrededor de la colonia y se empleó como control positivo la cepa *Acinetobacter* sp. UYSB41 (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas empleadas en este capítulo.

Cepa	Características	Referencia
<u>Cepas en estudio</u>		
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad FAM 81-77, en medio de cultivo LGI-P. Promotora del crecimiento de cañas de azúcar var. LCP.	[89, 107]
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad TUC 77-42, en medio de cultivo LGI-P. Promotora del crecimiento de cañas de azúcar var. LCP.	[89, 107]
<u>Cepas usadas como referencia</u>		
<i>De la colección de aislamientos de plantas de caña de azúcar del laboratorio</i>		
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO01, <i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03, <i>Pantoea</i> sp. UYSO13 y <i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	Aisladas de tallos de caña de azúcar de las variedades CP 92-618, TUC 77-42 y FAM 81-77. Utilizadas en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros y de los cebadores utilizados para qPCR.	[89]
<i>Agrobacterium</i> sp. UYSO04, <i>Enterobacter</i> sp. UYSO08, <i>Enterobacter</i> sp. UYSO09, <i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27 y <i>Xanthomonas</i> sp. UYSO35	Aisladas de tallos de caña de azúcar de las variedades TUC 77-42 y TUC78-12. Utilizadas en los ensayos de evaluación de la especificidad de los cebadores utilizados para qPCR.	[89]
<i>Rhanella</i> sp. UYSO22	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad TUC 77-42. Utilizada en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos.	[89]
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO14	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad TUC 78-12, no promotora del crecimiento de cañas de azúcar var. LCP. Cepa utilizada como referencia en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos y en los estudios de colonización.	[89, 107]

De otras colecciones de aislamientos del laboratorio

<i>Rhizobium</i> sp. UYPR7. 63	Aislada de nódulos de angico, utilizada en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos.	[85]
<i>Bacillus</i> sp. UYSB04	Aislada de plantas de sorgo dulce, variedad M81E. Utilizada como control positivo de la solubilización de potasio (observación del laboratorio).	[92]
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSB41	Aislada de plantas de sorgo dulce, variedad M81E. Utilizada como control positivo para la actividad endoglucanasas y hemicelulasas.	[92]
Aislamiento UYFA144	Aislamiento de plantas de festuca. Utilizada como control positivo para la actividad proteasas.	[90]
Otras cepas usadas como referencia		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	Endófito y PCV de caña de azúcar. Utilizada en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos y en los estudios de colonización.	[108]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 242	Utilizada en ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos.	[109]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> CE52G	Utilizada como control positivo para la actividad lacasa.	[110]
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	Utilizada como control positivo para la actividad catalasa y superóxido dismutasa, así como para la presencia de la enzima ACC desaminasa y producción de sideróforos. También se utilizó en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos.	[111,112]
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Utilizada como control positivo para la presencia de la enzima ACC desaminasa.	[113]

La actividad proteasa fue evaluada en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con leche en polvo 5 % (p/v). Las cepas fueron consideradas positivas cuando a las 48 h pi se observó un halo translúcido alrededor de las colonias [114]. Como control positivo se utilizó el aislamiento UYFA144 (Tabla 1).

En la evaluación de la actividad lacasa, las cepas se inocularon en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY (Anexo A), suplementado con Azul brillante de Remazol (ABR) 0,04 % (p/v) o con guaiacol 0,01 % (p/v) [115]. Las colonias se consideraron positivas cuando a los 5 días pi cambiaron su color a azul o marrón-rojizo, dependiendo del sustrato utilizado: ABR o guaiacol respectivamente. Como control positivo se utilizó la cepa *Sinorhizobium meliloti* CE52G (Tabla 1).

Por último, para la determinación de la actividad peroxidasa, las cepas se crecieron en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con 250 mg/l de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS) y para las Mn-peroxidasas medio LGI suplementado con 250 mg/l de ABTS y 100 mg/l de MnCl₂ · 4H₂O [116]. A los 5 días pi las placas se revelaron mediante incubación con 10 ml de H₂O₂ 10X (v) durante 20 min. Las cepas fueron consideradas positivas cuando las colonias se tornaron de color verde oscuro o marrón [116].

En todos los casos las actividades fueron evaluadas por triplicado y a 30 °C.

1. 2. 2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La presencia de las actividades catalasa y superóxido dismutasa (SOD), fueron evaluadas en extractos de proteínas totales de ambas cepas. Para ello, 5 ml de un cultivo bacteriano de cada cepa, crecido en tubos conteniendo medio de cultivo TY, fueron centrifugados a 5.000 g durante 5 min y las células suspendidas en buffer fosfato 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, pH 7,2. Posteriormente, las suspensiones fueron sonicadas 5 veces a potencia máxima durante 15 s con un sonicador Ultrasonic Homogeneizer (Cole-Parmer Instruments Co.), y la suspensión obtenida centrifugada a 10.000 g por 10 min, conservándose el sobrenadante a -20 °C. Los extractos proteicos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida 8 % (p/v) naturalizantes, a 80 V durante 2 h. Cada actividad fue evaluada en geles independientes. En la determinación de la actividad catalasa, los geles fueron lavados 3 veces con agua destilada durante 20 min, e incubados con H₂O₂ 0,015 % (v/v) en agitación. A continuación, fueron transferidos a un recipiente conteniendo una solución de FeCl₃ 1 % (p/v) y K₃Fe(CN)₆ 1 % (p/v). La actividad se evidenció por la aparición de bandas de color amarillo sobre fondo verde, momento en el que se detuvo la reacción con agua [117].

Por otro lado, los geles utilizados para visualizar la actividad SOD fueron lavados con agua destilada, e incubados en primera instancia en una solución conteniendo Nitro azul de tetrazolio 2,45 mM por 20 min, para luego incubarse en la oscuridad en una solución de riboflavina 0,028 mM, tetrametiletilendiamina (TEMED) 28 mM en buffer fosfato 50 mM pH 7,2, durante 20 min [117]. Por último, se expuso el gel a la luz detectándose la actividad SOD por la aparición de bandas acromáticas sobre fondo oscuro. Como control positivo se incluyó la cepa *H. seropedicae* Z67 (Tabla 1).

1. 2. 3 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA ENZIMA 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE DESAMINASA

La actividad de la enzima ACC desaminasa, sobre la molécula de ACC, genera como productos α -cetobutirato y NH_4 . En el presente ensayo, se evaluó la presencia de la enzima a partir de la evaluación de la producción de amonio. La misma se estudió mediante curvas de crecimiento en microplacas de 96 pocillos, utilizando un espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Scientific). Para esto, las cepas a ensayar fueron previamente crecidas en medio de cultivo líquido LB por 16 h, a partir del cual se cosecharon 2 ml que fueron lavados con NaCl 0,9 % (p/v). Seguidamente, las células se suspendieron en tubos conteniendo medio de cultivo LGI líquido sin N y se incubaron durante 6 h (adaptación). A partir del cultivo en adaptación se inocularon 1×10^6 células en 200 μl del medio de cultivo LGI líquido conteniendo como única fuente de N, ACC 1,5 mM [118]. Las microplacas se incubaron con una agitación de 180 rpm a 30 °C. Como controles se crecieron las cepas en el mismo medio de cultivo, pero con las siguientes variaciones: i) sin N y sin ACC y ii) con N (NH_4Cl 1 % (p/v) o KNO_3 0,1 % (p/v)). El crecimiento bacteriano se siguió midiendo la absorbancia a 620 nm (D. O. $_{620\text{nm}}$) cada 2 h y durante 60 h. Las curvas de crecimiento se realizaron por cuadruplicado. Como cepas de referencia se utilizaron *H. seropedicae* Z67 y *P. putida* KT2440 (Tabla 1).

En paralelo, se buscó amplificar mediante PCR el gen *acdS*, codificante de la enzima ACC desaminasa. Para ello se utilizaron dos juegos de cebadores: i- F1937 (5' MGVAAGCTCGAATAYMTBRT3') y F1939 (5' GARGCRTCGAYVCCRATCAC 3') [119] y ii- AccF (5' ATGAATCTGAATCGTTTTGAAC 3') y AccR (5' TCAGCCGTTGCGGAACAG 3') [120]. Ambas reacciones se realizaron en un volumen total de 25 μl , conteniendo: 12,5 μl de Dream Taq Green Master Mix (Thermo Scientific), 1 μl de cada cebador 10 μM y 10,5 μl de H_2O . Como molde de ADN se utilizaron 2 μl de ADN genómico (50 ng/ μl) obtenido de las cepas UYSO10, UYSO24 y de las cepas utilizadas como control positivo: *H. seropedicae* Z67 y *P. putida* KT2440. El ADN genómico se obtuvo utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen), según recomendación del fabricante. Como control negativo se empleó una mezcla de reacción sin el agregado de ADN en el tubo. El programa de ciclado presentó una desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de una primera etapa de desnaturalización durante 1 min a 95 °C,

hibridación de los cebadores durante 1 min a 52 °C y una extensión durante 2 min a 72 °C. La corrida se finalizó con una extensión durante 6 min a 72 °C. También se evaluaron como temperatura de hibridación de los cebadores, 53, 54, 55 y 56 °C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1 % (p/v), utilizando el intercalante Good View (Beijing SBS. Genetech. Co. Ltd.), en una relación de 1 µl intercalante/50 ml agarosa. El tamaño del amplicón esperado fue de 516 pb para los cebadores F1937-F1939 y de 996 pb para los cebadores AccF y AccR [119, 120].

Para confirmar la identidad de la banda obtenida, el producto de PCR se purificó utilizando el kit Wizard^R SV Gel and PCR Clean Up (Promega) y se envió a Macrogen Inc. Corea para su secuenciación. Las secuencias se compararon para su identificación con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

1. 2. 4 DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD BACTERIANA

En ambas cepas se analizó la presencia de flagelos, así como la capacidad de realizar *swimming*, *swarming* y *twitching*.

La presencia de flagelos bacterianos se evaluó utilizando el método de tinción negativa [121]. Para esto, células crecidas en medio de cultivo TY líquido, fueron lavadas con agua y fijadas en glutaraldehído 2,5 % (v/v) durante 1 h, para posteriormente ser lavadas cuatro veces con agua ultra pura estéril. Las células fijadas se transfirieron a grillas cubiertas con una película de Formvar (Fluka). Pasados 2 min de exposición al cultivo, la grilla se expuso a acetato de uranilo 2 % (p/v) por 1 min y fue lavada varias veces con agua ultra pura estéril por 1 min. Las grillas fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL (100 CXII, Japón), de la plataforma de Microscopía del IIBCE. Para cada cepa se observaron varias células a partir de dos experimentos independientes.

Para evaluar la capacidad de realizar *swimming* y *twitching*, se crecieron las cepas en medio de cultivo líquido TY, toda la noche. A partir de ese cultivo se inocularon por punción usando un escarbadiantes, placas conteniendo medio de cultivo TY y agar 0,3 % (p/v) o agar granulado 1 % (p/v), de acuerdo a cada determinación [121].

La capacidad de realizar *swarming* fue evaluada en placas conteniendo medio de cultivo TY suplementado con glucosa 0,5 % (p/v) y agar 0,5 % (p/v), e inoculadas con escarbadiantes a partir de las placas de *swimming* [121].

En todos los casos las actividades fueron evaluadas a las 24 h pi, por triplicado en experimentos independientes.

1. 2. 5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMAR BIOPELÍCULAS

La capacidad de formar biopelículas fue evaluada en microplacas de 96 pocillos utilizando el método de cristal violeta (CV) [122]. Para esto, cada pocillo conteniendo 200 µl de medio de cultivo TY o MS suplementado con exudados (MS + exudados), fue inoculado con 1×10^8 células de cada cepa. El medio de cultivo MS + exudados se obtuvo a partir del medio de cultivo MS 1/10 sin N [123], el cual se expuso por 72 h a las secreciones radiculares de plantas de caña de azúcar micropropagadas. La microplaca fue incubada sin agitación durante 48 o 96 h a 30 °C. Posteriormente el sobrenadante fue removido y los pocillos se tiñeron con CV 0,1 % (p/v) durante 20 min. El exceso de CV fue removido mediante lavados con buffer fosfato y el CV unido a las paredes de los pocillos se solubilizó con etanol 95 %. Finalmente se midió la absorbancia de la suspensión a 570 nm. Como control se incluyeron pocillos sin inocular. Esta determinación fue realizada por quintuplicado para cada una de las cepas y condiciones.

1. 2. 6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PRODUCIR POLIHIDROXIBUTIRATO

La producción de polihidroxitirato (PHB) se evaluó en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con glucosa en exceso (30 g/l) y NH_4Cl 40 mM. Las placas inoculadas fueron incubadas por 48 h a 30 °C, momento en que fueron cubiertas con una solución de Rojo Nilo 0,01 % (p/v) en acetona. Una vez evaporada la acetona, las placas se observaron en un transiluminador bajo luz UV. Las colonias que presentaron fluorescencia fueron consideradas como positivas para la acumulación de lípidos y posible acumulación del polímero PHB [124]. Como control positivo se utilizó *H. seropedicae* Z67 y como control negativo una cepa de *Escherichia coli* [124]. La determinación se realizó por triplicado.

1. 3 BÚSQUEDA DE FACTORES PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Determinación de la capacidad de solubilizar potasio

La capacidad de solubilizar potasio fue evaluada en placas de Petri conteniendo medio de cultivo Aleksandrov (Anexo A). Las placas inoculadas fueron incubadas por 5 días a 30 °C, considerándose a una cepa solubilizadora de potasio, cuando se observó un halo translúcido alrededor de la colonia. Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus* sp. UYSB04 (observación del laboratorio) (Tabla 1).

Determinación de la capacidad de producir sideróforos

Si bien anteriormente se había determinado que las cepas UYSO10 y UYSO24 no eran capaces de producir sideróforos en medio Cromo Azurol S. (CAS) [94], se decidió realizar una nueva determinación utilizando placas conteniendo medio de cultivo CAS modificado. En este caso se sustituyó en la receta original del medio CAS (Anexo A), la

fuelle de C, utilizando ácidu málico 5 % (p/v), glucosa 2,5 % (p/v), piruvatu de sodio 2,53 % (p/v) y acetatu de sodio 2,46 % (p/v), teniendo en cuenta la composición del medio NFCC. Las placas inoculadas fueron incubadas por 48 ha 30 °C, considerándose una cepa positiva, cuando se observó un halo alrededor de la colonia. Como control positivo se utilizó la cepa *H. seropedicae* Z67 (Tabla 1).

Ambas determinaciones descriptas se realizaron por triplicado.

1. 4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS DE CRECER UTILIZANDO

DISTINTOS PH Y FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO

La capacidad de las cepas en estudio de crecer en distintos medios de cultivo fue evaluada mediante: (i) ensayos en placa de Petri y (ii) curvas de crecimiento. Los ensayos se realizaron utilizando como medio de cultivo base LGI, variando las fuentes de C y N utilizadas.

Las placas fueron inoculadas con 5 µl de células lavadas con NaCl 0,9 % (p/v) provenientes de un cultivo crecido en medio LGI toda la noche. La evaluación del crecimiento se realizó a las 48 h pi, donde la condición se consideró positiva cuando se observó crecimiento en forma de colonia.

Por otra parte, las curvas de crecimiento se realizaron en microplacas de 96 pocillos utilizando un espectrofotómetro de placa Varioskan Flash (Thermo Scientific). Para ello, 1×10^6 células de cada cepa, fueron inoculados en 200 µl del medio de cultivo a evaluar, incubándose la placa con agitación de 180 rpm a 30 °C. El crecimiento bacteriano se evaluó midiendo la D. O. $_{620nm}$ cada 2 h, durante 60 h.

Las fuentes de C y N se incorporaron en concentración final 0,05 % (p/v) o (v/v), según correspondiese. Las fuentes de C ensayadas fueron: fructosa, lactosa, ácido pirúvico, citrato de amonio, cis-aconitato, glicerina y vinaza de ALUR, etanol, CMC, avicel y celobiosa y la fuente de N ensayada fue urea. Por otra parte, y también mediante curvas de crecimiento, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en: 1- medio de cultivo rico TY, 2- medio MS 1/10 sin N, empleados en los ensayos de interacción con plantas, 3- medio MS 1/10 sin N sin fuente de C y suplementado con apoplasto de caña de azúcar, obtenido a partir de plantas adultas y 4- medio MS 1/10 sin N suplementado con exudados radiculares, obtenido de plantas micropropagadas de la var. LCP (Capítulo II_1. 2. 5). El apoplasto se obtuvo mediante centrifugación de los internodos de tallos de plantas de caña de azúcar provenientes de campo, previamente cortadas en trozos de 5 cm y esterilizados en su superficie por flambeo. Los mismos fueron colocados en tubos Falcon de 50 ml y sometidos a una primera centrifugación de 300 g durante 5 min. El líquido obtenido fue descartado y se realizó una nueva centrifugación a 3.000 g durante 20 min, considerándose el líquido obtenido como apoplasto [89, 125].

Por último, se evaluó la capacidad de crecer a pH 5, 6, 7 y 8. Para esto se inocularon placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY, al cual se le ajustó el pH. A las 48 h se evaluó la aparición de colonias.

Todas las determinaciones descriptas se realizaron por triplicado, excepto las curvas de crecimiento que se realizaron por cuadruplicado.

1. 5 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR MICROPROPAGADAS, POR PARTE DE LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24

El estudio de la colonización de plantas de caña de azúcar var. LCP se realizó mediante el seguimiento de la colonización bacteriana por microscopía y el recuento de la población endófito en los diferentes tejidos. En esta sección se describen los ensayos de: (1) seguimiento en el tiempo de la colonización e infección de plantas micropropagadas de caña de azúcar por la cepa UYSO24 mediante microscopía, (2) identificación de las cepas UYSO10 y UYSO24 mediante antisueros específicos en los tejidos vegetales y (3) cuantificación de la colonización endofítica de plantas de caña de azúcar por conteo de unidades formadoras de colonia (ufc) en placa y PCR cuantitativa.

1. 5. 1 ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR POR LA CEPA UYSO24, MEDIANTE MICROSCOPÍA

En esta aproximación se emplearon técnicas de microscopía óptica (MO), electrónica de transmisión (MET) y electrónica de barrido (MEB). Las mismas fueron realizadas principalmente en el Laboratorio de Biología Celular e Tecidual, de la Universidad Estadual do Norte Fluminense en el marco de una pasantía. El análisis de las muestras fue culminado con observaciones de MO realizadas en la plataforma de Microscopía del IIBCE y observaciones de MEB realizadas en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, Udelar.

Para ello, plantas de caña de azúcar var. LCP micropropagadas en etapa de enraizamiento, fueron transferidas de a 4, a un nuevo frasco conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS modificado [123] y como soporte bolitas de polipropileno. Al tercer día los frascos que no mostraron contaminación visible fueron inoculados con 1×10^7 células de la cepa UYSO24 por planta. Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. El experimento se mantuvo en cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a 30 °C y las plantas fueron cosechadas a 1, 6, 12, 24, 48 h y 6 días pi. Se procesaron 2 plantas (réplicas biológicas) por tiempo de cosecha evaluado. En el momento de la cosecha se separaron con un bisturí estéril, la base del tallo y las raíces. Los segmentos obtenidos fueron lavados con buffer fosfato y fijados con una solución de glutaraldehído 5 % (v/v) y paraformaldehído 4 % (p/v) en buffer fosfato,

durante toda la noche a temperatura ambiente (James 1994). El fijador residual fue removido mediante sucesivos lavados. Posteriormente se procedió a la deshidratación del material mediante la incubación de los tejidos en una serie de soluciones de concentración creciente de EtOH (15, 30, 50, 70, 90 y 2 veces en 100 % (v/v)), durante 15 minutos en cada una de las soluciones.

Las muestras procesadas para MO y MET se sometieron a infiltración con la resina acrílica LR White (Sigma). La misma se realizó mediante la inmersión de la muestra en soluciones de concentraciones crecientes de la resina, durante 7 días a 4 °C [126]. Posteriormente, las muestras individuales, fueron cuidadosamente transferidas a cápsulas transparentes de gelatina conteniendo resina fresca, y orientadas para obtener cortes transversales. Las cápsulas se polimerizaron a 60 °C durante toda la noche.

Mediante el empleo de un Ultramicrotomo Reichert Ultracut Leica, se realizaron cortes semi-finos (0,9 –1 µm) para MO con cuchillas de vidrio preparadas en un Knife maker II Reichert-Jung. Las secciones semi-finas fueron colectadas en portaobjetos de vidrio conteniendo una gota de agua, fijadas en placa metálica caliente, e inmediatamente teñidas con azul de toluidina 0,2 % (p/v) por unos segundos [126]. Los cortes se visualizaron en MO de campo claro utilizando los lentes: 10x, 20x, 40x y 100x.

Para los estudios con MET se realizaron cortes ultrafinos de 60-70 nm en el ultramicrotomo utilizando una cuchilla de diamante. Las secciones fueron colectadas en gradillas de cobre hexagonal de malla 300–400. Las muestras fueron secadas con papel de filtro y contrastadas por inmersión en una solución de acetato de uranilo 5 % (p/v) durante 20 minutos, seguido de 2 lavados con agua destilada. A continuación, el material se incubó con citrato de plomo 0,2 % (p/v) en NaOH 0,01 N por 4 -5 min, seguido de 2 lavados con agua destilada [63]. Las muestras fueron examinadas en un MET Zeiss EM-900.

Las muestras para estudios de MEB fueron fijadas, lavadas y deshidratadas con etanol como fue descrito anteriormente. A continuación, las mismas fueron transferidas al equipo Critical Point Drying (CPD 030 BALTEC), para su secado completo. Posteriormente fueron cubiertas con un metal conductor, en este caso con una película de paladio de aproximadamente 10 – 20 nm de espesor, por la aplicación de una corriente de 40 mA durante 150 s en un Sputter Coater SCD 050 (BALTEC). Las muestras se observaron en un MEB Digital Scanning Microscope Zeiss DSM-962 utilizando un voltaje entre 15 y 24 kv.

1. 5. 2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS INOCULADAS

La identificación de las bacterias inoculadas en los cortes de microscopía se realizó mediante una inmuno-localización, utilizando antisueros específicos para las cepas UYSO10 y UYSO24. En esta sección se analizaron también cortes obtenidos a partir de muestras de plantas de caña de azúcar var. LCP micropropagadas e inoculadas con la

cepa UYSO10, que fueron procesadas para estudios de MO y MET durante mi tesis de maestría [93].

1. 5. 2. 1 OBTENCIÓN DE LOS ANTISUEROS ESPECÍFICOS

Para esto, las cepas bacterianas en estudio fueron crecidas en matraces conteniendo medio de cultivo TY hasta fase exponencial, centrifugadas y lavadas con buffer fosfato. Los pellets fueron suspendidos en formaldehído 3 % (v/v), incubados durante 16 h a 4 °C y lavados con abundante buffer fosfato. De esta suspensión un inóculo de 1×10^9 células/ml fue utilizado como antígeno e inoculado con adyuvante de Freund en conejo. El antisuero policlonal fue producido en el Laboratorio de Biotecnología del Polo Tecnológico de Pando (Facultad de Química, Udelar).

La especificidad de los antisueros producidos fue evaluada en placas de 96 pocillos mediante un ensayo de reacción cruzada utilizando la técnica de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) [127]. En la misma se evaluó la reacción cruzada con cepas aisladas a partir de variedades de caña de azúcar cultivadas en nuestro país, incluyendo: *Pseudomonas* sp. UYSO01, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO14, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22 [89]; así como otras cepas diazótrofes disponibles en el laboratorio: *S. meliloti* 242, *Rhizobium* sp. UYPR7. 63, *H. seropedicae* Z67 y *G. diazotrophicus* Pal5 (Tabla 1). Para esto, células crecidas toda la noche en medio de cultivo TY, fueron lavadas con NaCl 0,9 % (p/v) y fijadas en formaldehído 0,1 % (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. Inmediatamente y con el fin de adsorber las células a los pocillos de la microplaca, las mismas fueron lavadas con buffer fosfato, sembradas a razón de 1×10^8 células/pocillo, e incubadas durante toda la noche a 37 °C. A continuación, los pocillos fueron lavados 2 veces con una solución de inmuno-bloqueo (Tween 0,5 % (v/v), leche en polvo 3 % (v/v), azida sódica 1,2 % (p/v) en buffer fosfato 50 mM) (SIB). Seguidamente, se realizó un bloqueo de 2 h con una solución de bloqueo sin Tween (SIB*), seguido de dos lavados con SIB. Posteriormente, se incubó la microplaca con el antisuero primario en SIB* durante 2 h, seguido de 2 lavados con SIB* y una última incubación con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina en SIB* (1/500), durante 90 min. A continuación, se realizaron 2 lavados con solución SIB, uno con agua y finalmente la microplaca fue incubada con una solución de p-nitrofenil fosfato 0,014 % (p/v) en buffer Na_2CO_3 0,5 M pH 9.8. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μl por pocillo de NaOH 3 M, midiéndose la absorbancia a 405 nm.

En el diseño del ensayo, se evaluaron las diluciones del antisuero primario 1/1.000, 1/5.000, 1/10.000 y 1/50.000. A su vez se emplearon como controles pocillos en los cuales no se agregó el anticuerpo secundario y pocillos empleando suero pre-inmune en vez del antisuero.

Luego del primer ELISA realizado, los antisueros fueron purificados por adsorción con las cepas que mostraron mayor reacción cruzada. Para la purificación de los antisueros,

se partió de 200 ml de cultivo bien crecido de las cepas seleccionadas. Los mismos fueron centrifugados a 5.000 g durante 10 min y las células suspendidas y fijadas en una solución de formaldehído 0,5 % (v/v) en buffer fosfato durante 2 h a 37 °C. Luego de fijadas, las células fueron lavadas 3 veces con buffer fosfato y suspendidas en leche descremada en polvo 3 % (p/v) en buffer fosfato junto con una dilución del antisuero de 1:50, durante 2 h a 4 °C. Finalmente, la suspensión fue centrifugada y el sobrenadante utilizado como solución de trabajo del antisuero específico. A continuación, se evaluó nuevamente la reacción cruzada mediante un nuevo ensayo de ELISA.

1. 5. 2. 2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO EN CORTES SEMI-FINOS Y ULTRAFINOS DE TEJIDOS DE PLANTAS, EMPLEANDO ANTISUEROS ESPECÍFICOS

Para la visualización por MO, se realizaron cortes semi-finos como se describió anteriormente, los cuales fueron colectados en portaobjetos de vidrio cubiertos con BioBond (Life Science, USA). Posteriormente, los mismos fueron incubados primero durante 1 h en SIB y luego por 1 h con una dilución 1:10 del antisuero purificado o del suero pre-inmune en SIB*. Luego de 3 lavados, los cortes fueron incubados durante 1 h en una dilución 1:50, del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo con una partícula de oro de 5 nm (British Biocell International, UK) en SIB (James et al 1994). La marca de oro fue potenciada utilizando el kit de multiplicación de plata (BB Solutions, UK), siguiendo la recomendación del fabricante.

En el caso de la observación por MET se utilizó el mismo protocolo, pero en este caso, el anticuerpo secundario utilizado tenía asociado una partícula de oro de 15 nm (BB Solutions, UK). Los controles realizados en el análisis de los cortes seriados fueron: omisión del antisuero primario y reemplazo del antisuero primario por suero pre-inmune en la dilución apropiada.

Las muestras fueron visualizadas mediante el uso de un MO de campo claro y un MET Zeiss EM-900.

1. 5. 3 CUANTIFICACIÓN DE LA COLONIZACIÓN ENDÓFITA POR LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 EN TEJIDOS DE PLANTAS CAÑAS DE AZÚCAR MICROPROPAGADAS

Para esto se realizaron dos estrategias de cuantificación: (i) mediante recuento bacteriano por ufc, y (ii) mediante PCR cuantitativa. Como modelo de estudio se emplearon muestras de tejidos de plantas provenientes de un ensayo de interacción planta-bacteria igual al descrito en la sección 1.4.1 de este capítulo. En ambas aproximaciones, las cuantificaciones se realizaron por triplicado biológico, así como triplicado técnico en el caso de recuento por ufc y duplicado técnico en el caso de la PCR cuantitativa.

1. 5. 3. 1 CUANTIFICACIÓN DE LA COLONIZACIÓN ENDÓFITA MEDIANTE RECuento BACTERIANO:
MÉTODO DE LA GOTA

Las plantas fueron cosechadas y esterilizadas en su superficie, mediante una primera inmersión en etanol 70 % (v/v) durante 1 min, seguido de una incubación en hipoclorito de sodio 2 % (v/v) por 15 min y finalmente sucesivos lavados con agua destilada estéril [128]. A continuación, raíces y tejido aéreo fueron macerados por separado con un mortero esterilizado utilizando 1 g de tejido en 9 ml de NaCl 0,9 % (p/v) estéril y considerando él macerado obtenido como la dilución -1. Diez microlitros de cada dilución (-1 a -6), fueron sembrados por triplicado en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY.

1. 5. 3. 2 PUESTA A PUNTO DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 EN TEJIDOS DE PLANTAS POR PCR CUANTITATIVA

Previamente, se diseñaron cebadores específicos para las cepas UYSO10 (UYSO10for: 5' CCGTGCTGATTGACGGTTA 3' y UYSO10rev: 5' TCACATCCGGACTTGACAGAC 3') y UYSO24 (UYSO24for: 5' TGACTGTAGTCGGAGAAGAAGC 3' y UYSO24rev: 5' CAGTATCAAAGGCAGTCCG 3'), a partir de la secuencia del gen *ARNr* 16S [93]. La especificidad de los mismos fue evaluada *in silico* y el producto de la reacción de PCR confirmado mediante secuenciación. En este estudio se comenzó evaluando la especificidad de los cebadores *in vitro*, empleando como molde ADN genómico de las cepas: *Pseudomonas* sp. UYSO01, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Agrobacterium* sp. UYSO04, *Enterobacter* sp. UYSO08, *Enterobacter* sp. UYSO09, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27 y *Xanthomonas* sp. UYSO35 (Tabla 1).

La reacción de PCR cuantitativa fue realizada utilizando el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR (BIORAD) y las medidas correspondientes mediante la aproximación SybrGreen [129]. La mezcla de reacción de PCR se realizó con el kit iQ SYBR Green Supermix (BIORAD), utilizando 1 μ M de cada cebador y 4 ng de ADN molde, en un volumen total de 25 μ l. Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo durante 10 min a 95 $^{\circ}$ C, 40 ciclos de 15 s a 95 $^{\circ}$ C, 30 s a 58 $^{\circ}$ C (al final de este paso se tomó la medida de fluorescencia) y finalmente durante 30 s a 72 $^{\circ}$ C. La especificidad del producto fue confirmada en una curva de disociación realizada entre 65 - 95 $^{\circ}$ C, aumentando de 0,5 $^{\circ}$ C cada 5 s. Los datos se analizaron en el software BIORAD CFX Manager 3. 1.

1. 5. 3. 3 CUANTIFICACIÓN DE LA COLONIZACIÓN ENDÓFITA EN LOS TEJIDOS DE LAS PLANTAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Con el objetivo de desprender las células adheridas a las raíces de las plantas, las mismas fueron sonicadas durante 5 min en buffer fosfato y agitadas con vortex por 1 min en buffer fosfato fresco. A continuación, la parte aérea fue separada de la

radicular con un bisturí estéril. A partir de 200 y 500 mg de raíces y parte aérea respectivamente, se extrajo el ADN total utilizando el kit comercial PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.). El ADN obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific) y su calidad evaluada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (p/v).

Posteriormente el ADN fue sometido por duplicado (réplica técnica) a la reacción de PCR cuantitativa descrita en el punto 1.4.3.2. La cuantificación absoluta de las muestras se realizó mediante la comparación con una curva estándar realizada a partir del ADN extraído de cultivos puros de las cepas UYSO10 o UYSO24. La curva se realizó utilizando diluciones seriadas al décimo, por triplicado. El número de copias del gen *ARNr 16S* se calculó usando la fórmula siguiente [129]:

$$\text{Equivalente genómico} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{copias/mol}) \times \text{cantidad de ADN (g)}}{\text{largo del ADN (pb)} \times 660 (\text{g/mol/pb})}$$

Para aplicar la fórmula se consideró que (i) el número de copias de cada gen en el genoma es uno (Beracochea com. pers.), y (ii) como aproximación del tamaño del genoma se tomó el tamaño reportado para cepas secuenciadas filogenéticamente cercanas.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Infostat v2015e. Para ello se aplicó un análisis de varianza (ANAVA) con un p-valor < 0,05 y de existir diferencias significativas, las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Tukey considerando un p-valor < 0,05.

2. RESULTADOS

2. 1 IDENTIFICACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS BACTERIANAS EN LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24, POSIBLEMENTE VINCULADAS A LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

2. 1. 1 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ENZIMAS POTENCIALMENTE DEGRADADORAS DE LA PARED CELULAR VEGETAL.

Los resultados mostraron que la única actividad positiva común a ambas cepas fue la presencia de endoglucanasas (celulasas). Por su parte, la cepa UYSO24 presentó actividad lacasa, y ninguna de las cepas mostró actividad hemicelulasa, proteasa o peroxidasa bajo las condiciones ensayadas (Figura 1; Tabla 2).

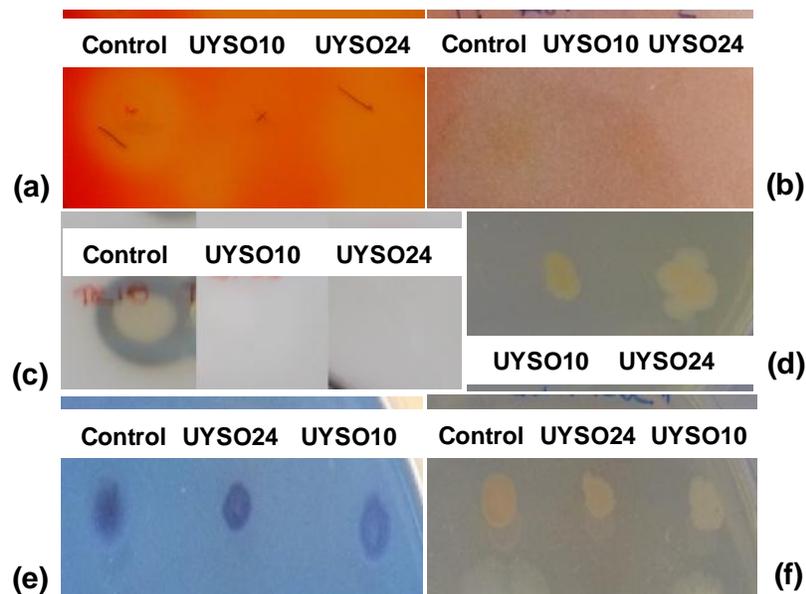


Figura 1. Vista de los ensayos en placa realizados para evaluar las actividades: endoglucanasas (a), hemicelulasas (b), proteasas (c), peroxidasas (d), lacasas usando como sustrato guaiacol (e) y ABR (f).

2. 1. 2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

Los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas presentaron actividad superóxido dismutasa y catalasa (Tabla 2, Figura 2).

Tabla 2. Determinación de potenciales características fenotípicas bacterianas involucradas en la interacción planta-bacteria.

Características vinculadas a la infección e interacción		Cepas bacterianas	
		UYSO10	UYSO24
Presencia de enzimas	Endoglucanasas	+	+
	Hemicelulasas	-	-
	Proteasas	-	-
	Peroxidasas	-	-
	Mn-peroxidasas	-	-
	Lacasas (ABR)	-	+
	Lacasas (guaiacol)	-	+
	Catalasa	+	+
	SOD	+	+
	ACC desaminasa	-	+
Movilidad	Presencia de flagelos	+	+
	Swimming	+	+ ^a
	Swarming	-	-
	Twitching	+	-
Producción de biopelículas	TY ^b /48 h	-	-
	TY/96 h	-	++
	MS+ ^c /96 h	-	++
Reserva	Producción de PHB	-	-

^aLa actividad se observó positiva a las 72 h pi; ^bmedio de cultivo TY incubado a diferentes tiempos; ^cmedio de cultivo MS suplementado con exudados.

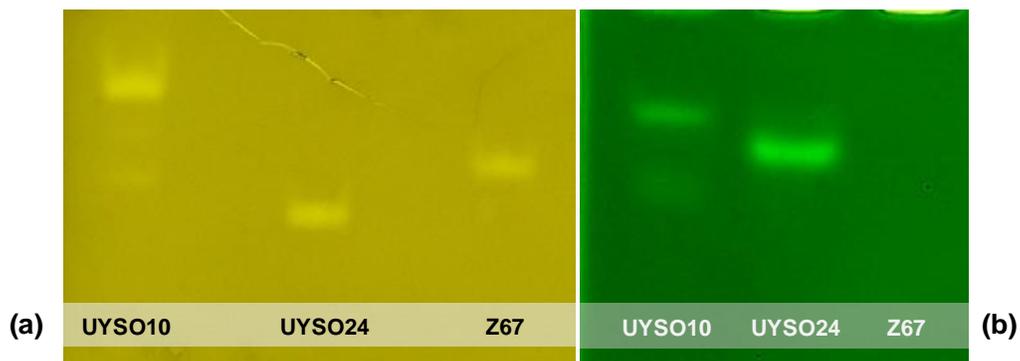


Figura 2. Vista de las actividades: (a) superóxido dismutasa y (b) catalasa, mediante geles de poliacrilamida nativos. Las cepas evaluadas fueron: UYSO10, UYSO24 y la cepa de referencia Z67.

2. 1. 3 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA ENZIMA ACC DESAMINASA

Para evaluar la presencia de la enzima ACC desaminasa se realizaron dos aproximaciones. La primera se basa en que la enzima cliva la molécula de ACC dando como productos α -cetobutirato y amonio y de esta forma se puede utilizar el amonio formado como fuente de N, lo cual fue evaluado mediante curvas de crecimiento. Utilizando esta aproximación, no se observó crecimiento bacteriano de las cepas UYSO10 y UYSO24 cuando se crecieron en medio conteniendo ACC como única fuente de N (Figura 3). Sin embargo, se detectó crecimiento bacteriano y por tanto indirectamente actividad de la enzima en las cepas utilizadas como control (*H. seropedicae* Z67 y *P. putida* KT2440). En particular, la cepa Z67 mostró un pico de crecimiento a las 22 h, mientras que la cepa KT2440 creció a partir de las 40 h (Figura 3).

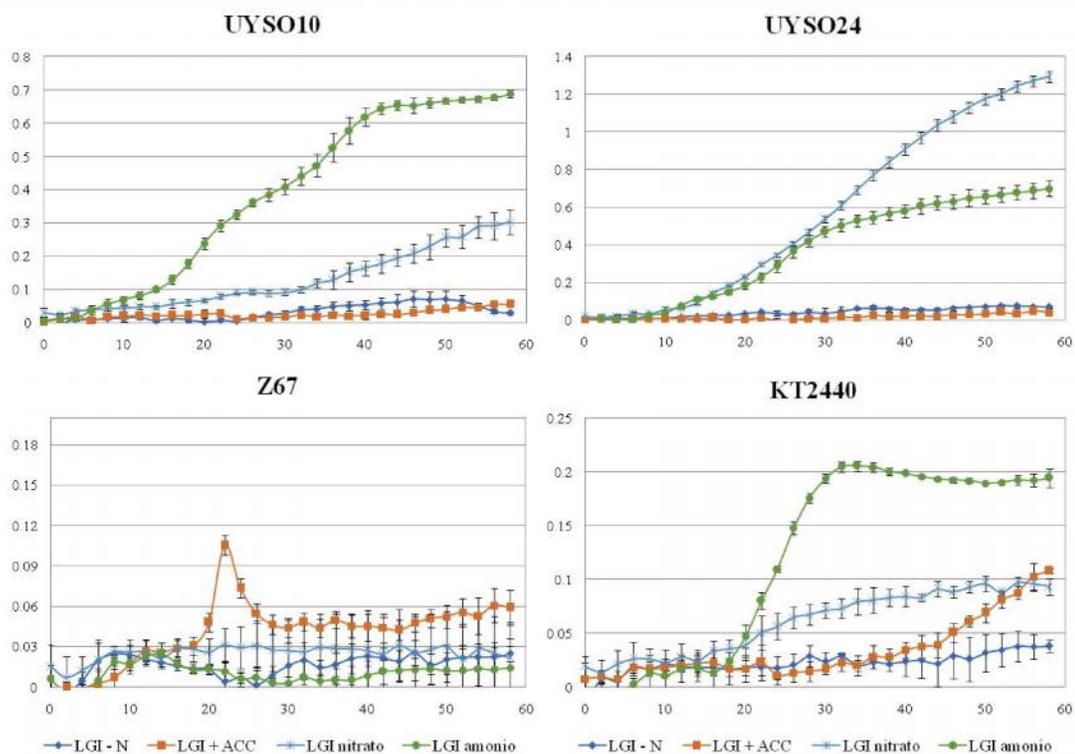


Figura 3. Curvas de crecimiento de las cepas UYSO10, UYSO24, Z67 y KT2440 en medios de cultivo LGI suplementado con diferentes fuentes de N.

La segunda estrategia consistió en amplificar mediante PCR el gen que codifica para la enzima ACC desaminasa (*acdS*), evaluándose variaciones en la temperatura de hibridación de los cebadores. Los resultados mostraron la presencia de múltiples bandas tanto en las cepas UYSO10 y UYSO24, así como en las cepas utilizadas como control (Figura 4). Asimismo, en las cepas utilizadas como control no se identificó con

claridad un amplicón con el tamaño esperado. A partir del gel obtenido se escindieron y secuenciaron aquellos productos de las cepas en estudio, que mostraron un tamaño similar al esperado según la bibliografía, así como algunos más intensos. Mediante esta aproximación se pudo confirmar la presencia del gen *acdS* en la cepa UYSO24 (Tabla 2). Por lo tanto, los resultados mostraron que la cepa UYSO24 presenta el gen *acdS*, sin embargo, no se pudo detectar esta actividad enzimática en las condiciones ensayadas.

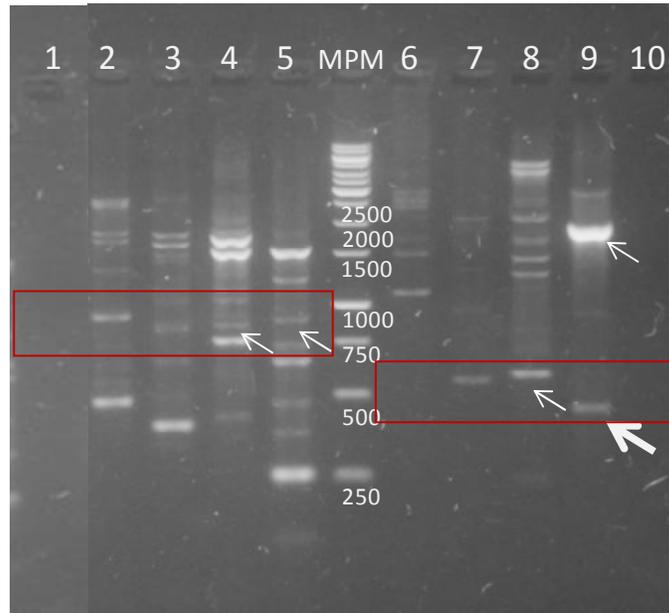


Figura 4. Gel de agarosa mostrando el producto de amplificación del gen *acdS*, utilizando los cebadores AccF-AccR (carriles 1 al 5) y F1937-F1939 (carriles 6 al 10). **Carriles: 1 y 10-** control negativo sin ADN, **2 y 6-** cepa Z67, **3 y 7-** cepa KT2440, **4 y 8-** cepa UYSO10 y **5 y 9-** cepa UYSO24. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado fue Generuler 1 Kb de Thermo Fisher Scientific. Tamaño de los amplicones esperados: 996 pb para los cebadores AccF y AccR y 516 pb para los cebadores F1937-F1939. En rectángulos rojos se indica la zona donde se esperaba obtener el amplicón. Las flechas blancas indican las bandas recortadas del gel y enviadas para su secuenciación, mientras que la flecha de mayor tamaño indica la banda que por secuenciación corresponde al gen *acdS*.

2. 1. 4 DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD BACTERIANA

Mediante MET y utilizando la técnica de tinción negativa, se confirmó la presencia de flagelos en las cepas UYSO10 y UYSO24 (Tabla 2, Figura 5). En particular se identificaron entre 5-6 flagelos en la cepa UYSO10.

En referencia a los ensayos de placa, la cepa UYSO10 mostró ser capaz de moverse en forma de *swimming* y *twitching*, mientras que la cepa UYSO24 no mostró ninguno de este tipo de moviidades bajo las condiciones evaluadas (Tabla 2, Figura 6). Curiosamente, luego de 72 h pi la cepa UYSO24 comenzó a desplazarse en el ensayo de *swimming*, aunque dicho movimiento no logro cubrir la placa de Petri como la cepa UYSO10 (Figura 6).

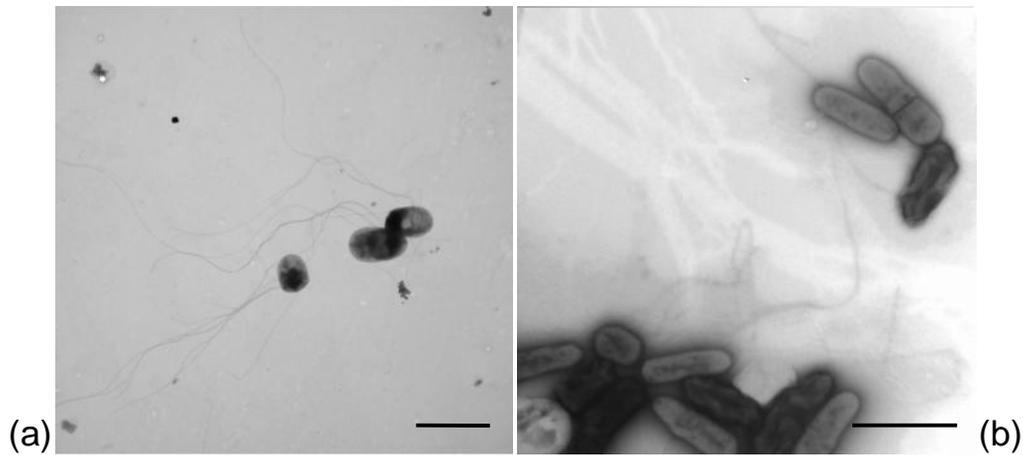


Figura 5. Micrografía electrónica de suspensiones bacterianas de las cepas a- UYSO10 (barra = 2 µm) y b- UYSO24 (barra = 2 µm), contrastadas con tinción negativa.

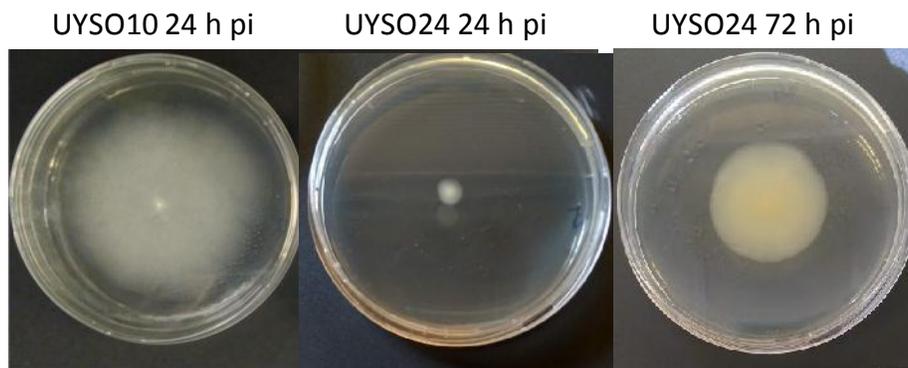


Figura 6. Vista de las placas donde se evaluó la capacidad de moverse en forma de *swimming*, en las cepas UYSO10 (a) y UYSO24 (b y c). La observación se realizó a las 24 h (a y b) y 72 h (c) pi.

2. 1. 5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Los resultados mostraron que las cepas UYSO10 y UYSO24 no fueron capaces de formar biopelículas en el medio de cultivo TY, a las 48 h. Sin embargo, se detectó la formación de biopelículas a las 96 h por la cepa UYSO24 (Tabla 2, Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de la producción de biopelículas.

	Control	UYSO10	UYSO24	UYSO14
TY^a/48 h	1,61 ± 0,31	1,77 ± 0,20	1,71 ± 0,37	3,65 ± 0,36
TY/96 h	0,25 ± 0,06	0,24 ± 0,02	1,40 ± 0,23	1,70 ± 0,31
MS+^b/96 h	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,03	2,05 ± 0,47	0,46 ± 0,09

^aMedio de cultivo TY incubado a diferentes tiempos; ^b medio de cultivo MS suplementado con exudados.

2. 1. 6 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO

En este caso, los resultados mostraron que ninguna de las cepas evaluadas acumuló lípidos en las condiciones ensayadas (Tabla 2, Figura 7).

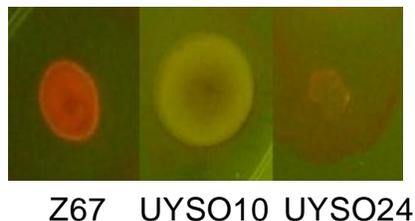


Figura 7. Vista del ensayo en placa realizado para la detección de PHB y/o acumulación de lípidos. Se evaluaron las cepas UYSO10 y UYSO24 y como control positivo se utilizó la cepa Z67.

2. 2. IDENTIFICACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS EN LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 POSIBLEMENTE INVOLUCRADAS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

A partir de la evaluación de una variante del medio de cultivo para la detección de sideróforos (CAS), se identificó como positiva la cepa UYSO10 en las condiciones ensayadas (Figura 8a).

Por último, se observó que la cepa UYSO10 también fue capaz de solubilizar potasio (Figura 8b).

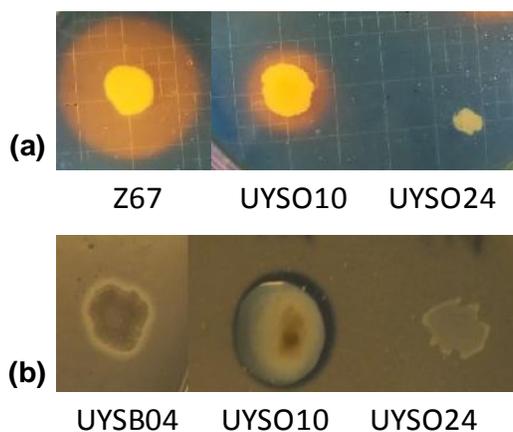


Figura 8. Vista de los ensayos en placa para la detección de productores de sideróforos **(a)** y solubilizadores de potasio **(b)**. UYSO10: cepa *Kosakonia* sp. UYSO10, UYSO24 *Rhizobium* sp. UYSO24, Z67: cepa *H. seropedicae* Z67 (control positivo) y UYSB04: *Bacillus* sp. UYSB04 (control positivo).

2.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 DE CRECER EN DIFERENTES FUENTES DE C, N Y EN DISTINTOS PH

Por un lado, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer mediante curvas de crecimiento en: 1- apoplasto (simulando los tejidos internos) y 2- medio de cultivo MS suplementado con exudados radiculares (simulando la rizósfera).

Los resultados mostraron que ambas cepas fueron capaces de crecer tanto en la suspensión de apoplasto pura obtenida a partir de la centrifugación de tallos de cañas de azúcar var. LCP cosechados en campo, así como en la suspensión diluida en medio MS (Figura 9, Tabla 4 y 5). En estas condiciones, la cepa UYSO10 mostró una fase de adaptación menor a la cepa UYSO24 (6-8 h vs 14-16 h) (Figura 9).

Por otra parte, en ambas cepas el crecimiento bacteriano en presencia de exudados radiculares cosechados a partir de plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP, fue lento alcanzando la fase estacionaria con un menor incremento en la biomasa, con poblaciones de 10^8 células/ml (Figura 9, Tabla 4 y 5). No obstante, dicho crecimiento fue mejor, en comparación con el medio de cultivo MS suplementado o no con N (Figura 9). Es de destacar que todas las curvas realizadas en medio MS mostraron una fase de adaptación larga, siendo mayores los tiempos de esta fase nuevamente para la cepa UYSO24 (8-12 h vs 28-32 h).

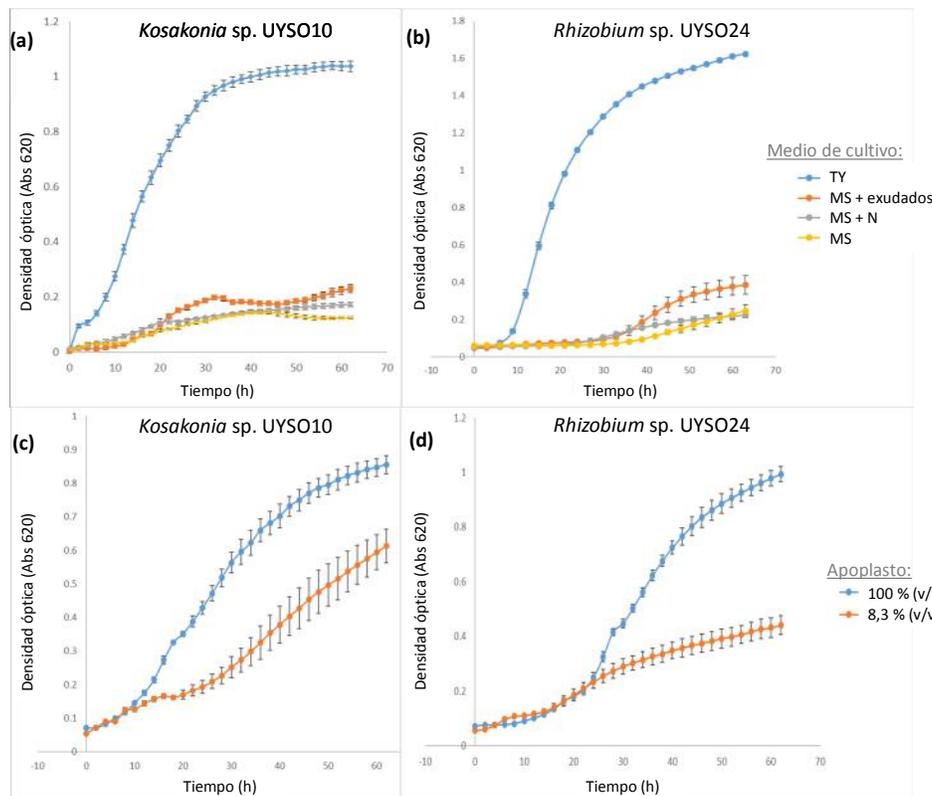


Figura 9. Curvas de crecimiento de las cepas UYSO10 (a y c) y UYSO24 (b y d), en los medios de cultivo TY, MS, MS + N y MS + exudados (a y b), apoplasto puro y MS + apoplasto (c y d).

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de las cepas UYSO10 y UYSO24, en los medios de cultivo TY, MS, MS + N, MS + exudados, apoplasto puro y MS + apoplasto.

	TY	MS	MS + N	MS + exudados	Apoplasto puro (100 % (v/v))	Apoplasto diluido (8, 3 % (v/v))
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10						
Velocidad máxima (h ⁻¹)	0,16	0,062	0,078	0,17	0,10	0,04
Tiempo de generación máximo (h)	4,25	11,17	8,86	4,05	6,88	15,8
Cosecha máxima (células) ^a	1,0 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁸	5,4 x 10 ⁸
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24						
Velocidad máxima (h ⁻¹)	0,24	0,052	0,058	0,085	0,13	0,065
Tiempo de generación máximo (h)	2,84	13,27	11,96	8,14	5,40	10,54
Cosecha máxima (células) ^a	1,6 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸	9,2 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁸

Al evaluarse si las cepas en estudio son capaces de utilizar como fuente de C polímeros vegetales, los resultados confirmaron la capacidad de degradar CMC por ambas cepas. A su vez, se complementó una caracterización previa sobre la capacidad de crecer en distintas fuentes de C y N [94], confirmando ambas cepas poseen una gran versatilidad para el uso de las mismas (Tabla 5).

Por último, se observó que ambas cepas pueden crecer en el rango de pH entre 5 y 8.

Tabla 5. Capacidad de las cepas UYSO10 y UYSO24 de crecer en diferentes fuentes de C y N.

	UYSO10	UYSO24	Referencia
Fuentes de C			
<i>Azúcares</i>			
Sacarosa (5,100 y 200 g/l)	+	+	[94]
Fructosa	+	+	Este trabajo
Acnr ^a (5,100 y 200 g/l)	+	+	[94]
Glucosa	+	+	[94]
Lactosa	-	-	Este trabajo
Manitol	+	+	[94]
<i>Ácidos orgánicos</i>			
Ácido málico	+	+	[94]
Ácido pirúvico	+	+	Este trabajo
Citrato	+	+	Este trabajo
Cis-aconitato	-	-	Este trabajo
<i>Productos y subproductos de la producción de etanol</i>			
Glicerol comercial	+	+	[94]
Glicerina de ALUR	+	+	Este trabajo
Vinaza	-	-	Este trabajo
Etanol	+	-	Este trabajo
<i>Componentes vegetales</i>			
Apoplasto de caña de azúcar ^b	+	+	Este trabajo
CMC	+	+	Este trabajo
Avicel	-	-	Este trabajo
Celobiosa	-	-	Este trabajo
Fuentes de N			
<i>Principales formas inorgánica de N</i>			
Cloruro de amonio	+	+	[94]
Sulfato de amonio	+	+	[94]
Nitrato de potasio	+	+	[94]
<i>N orgánico: aminoácidos con N</i>			
L-tirosina	+	+	[94]
L-asparagina	+	+	[94]
L-ácidoglutámico	+	+	[94]
<i>Otras moléculas orgánicas</i>			
Urea	+	+	Este trabajo
<i>Componente vegetal</i>			
Exudados radiculares	+	+	Este trabajo
Apoplasto de caña de azúcar ^b	+	+	Este trabajo

^aAzúcar de caña no refinada, obtenida en ALUR; ^bEl apoplasto fue evaluado como fuente de C y N.

2. 4 LOCALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 EN LOS TEJIDOS INTERNOS DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR VAR. LCP

En las siguientes secciones se describirán los resultados de la puesta a punto del empleo de antisueros específicos generados contra las cepas UYSO10 y UYSO24 y su uso en microscopía, así como la técnica de PCR cuantitativa para la identificación y cuantificación de los aislamientos durante la interacción con la planta en el tiempo.

2. 4. 1 ESPECIFICIDAD DE LOS ANTISUEROS CEPA ESPECÍFICOS PRODUCIDOS

La reacción cruzada de los antisueros producidos fue evaluada en ensayos de ELISA (Tabla 6). A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas que mostraron mayor reacción cruzada. Las mismas fueron empleadas para purificar los antisueros, los cuales fueron nuevamente evaluados en un ensayo de ELISA. Los resultados mostraron que luego de la purificación de los antisueros, las reacciones inespecíficas disminuyeron (Tabla 5). Asimismo, la especificidad de los antisueros se corroboró por MO secciones semi-finas donde estaban incluidas las cepas: *Kosakonia* sp. UYSO10, *Rhizobium* sp. UYSO24, *Rhanelia* sp. UYSO22 y *Acinetobacter* sp. UYSO03, empleándose como control, aquellas secciones que no presentaron marcado de oro (datos no mostrados). A partir de las imágenes obtenidas se observó que el antisuero reconoce específicamente las bacterias que fueron empleadas como antígeno y no se observa señal de fondo (Figuras 11d y 12).

Tabla 6. Estudio de la especificidad de los antisueros producidos contra las cepas UYSO10 y UYSO24, mediante ELISA.

Cepa	Reacción (%)			
	Anti - UYSO10		Anti - UYSO24	
	Sin purificar	Purificado	Sin purificar	Purificado
Aislamientos nativos				
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO01	8.9	15.6	86.3*	28
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	5.8	7.5	-	13.2
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10	100	100	18.5	30.3
<i>Pantoea</i> sp. UYSO13	33.8*	11.6	26.5	29.6
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO14	10	23.7	19*	19.7
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	12.4	13.2	38.2*	22.4
<i>Rahnella</i> sp. UYSO22	16.5*	11.5	-	32.8
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24	13.8	3.9	100	100
Cepas referencia				
<i>G. diazotrophicus</i> Pal5	-	14.7	23.8	16.2
<i>H. seropedicae</i> Z67	11.0	16	45.6*	2
<i>Rhizobium</i> sp. UYPR7. 63	-	-	19.2	-
<i>S. meliloti</i> 242	-	10	98.2*	8.3

*' Cepas empleadas para realizar la purificación de los antisueros.

2. 4. 2 COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑAS DE AZÚCAR VAR. LCP POR LA CEPAYYSO24

Mediante MEB se observó a las 4 h pi, escasas células aisladas y pequeños agregados en la cofia de las raíces. A partir de las 12 h pi se observó una profusa colonización sobre las raíces, en forma de agregados, así como formando biopelículas, principalmente en la zona de los pelos radiculares (Figura 10a) y en tejidos meristemáticos en la cofia y en la zona de emergencia de las raíces laterales (Figura 10b, c). Por otro lado, la superficie de la base del tallo fue colonizada tempranamente (4 h pi), por células individuales que se adhirieron de forma no polar (datos no mostrados). Mientras que a las 12h pi, se observaron bacterias formando pequeñas biopelículas (Figura 10d).

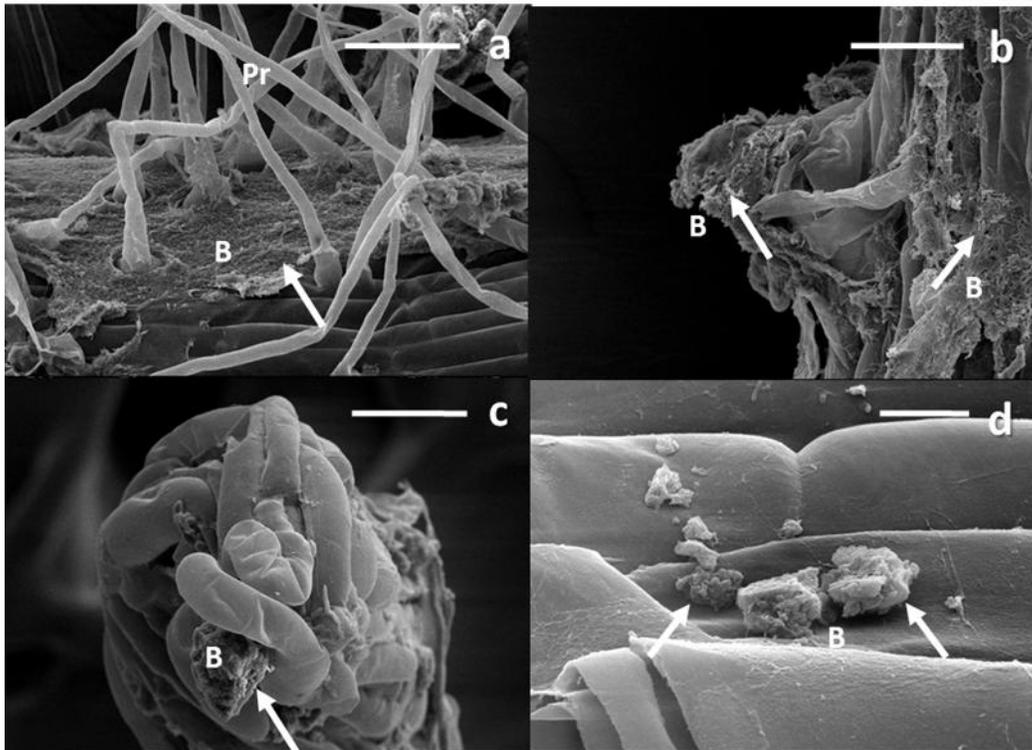


Figura 10. Micrografías de MEB mostrando la colonización por la cepa UYSO24, de la superficie de plantas de caña de azúcar micropropagadas a las 24 h pi. **a-** Biopelícula en forma de capa en la zona de la raíz con pelos radiculares (barra = 50 μ m). Formación de una biopelícula en la zona de **b-** emergencia de raíces secundarias (barra = 50 μ m) y **c-** en la cofia (barra = 50 μ m). **d-** Formación de agregados en la superficie del tejido aéreo a las 12 h pi (barra = 10 μ m). Las **flechas** blancas indican bacterias. **B-** biopelícula, **Pr-** pelo radicular.

La presencia de *Rhizobium* sp. UYSO24 dentro de los tejidos de la planta fue baja, discreta y raramente observada colonizando los espacios intercelulares (Figura 11a–d). A su vez, la colonización de los vasos de xilema fue detectada a partir de las 12 h pi, principalmente en el tallo, y por células individuales o pequeños agregados (Figura 11e, f). Por otro lado, no se observaron bacterias en la superficie de los estomas y cavidades subestomáticas. Asimismo, si bien se observó una reacción de la planta

entre los espacios intercelulares en el córtex de la raíz y en algunos tejidos vasculares, la misma no necesariamente se encuentra asociada a la presencia bacteriana.

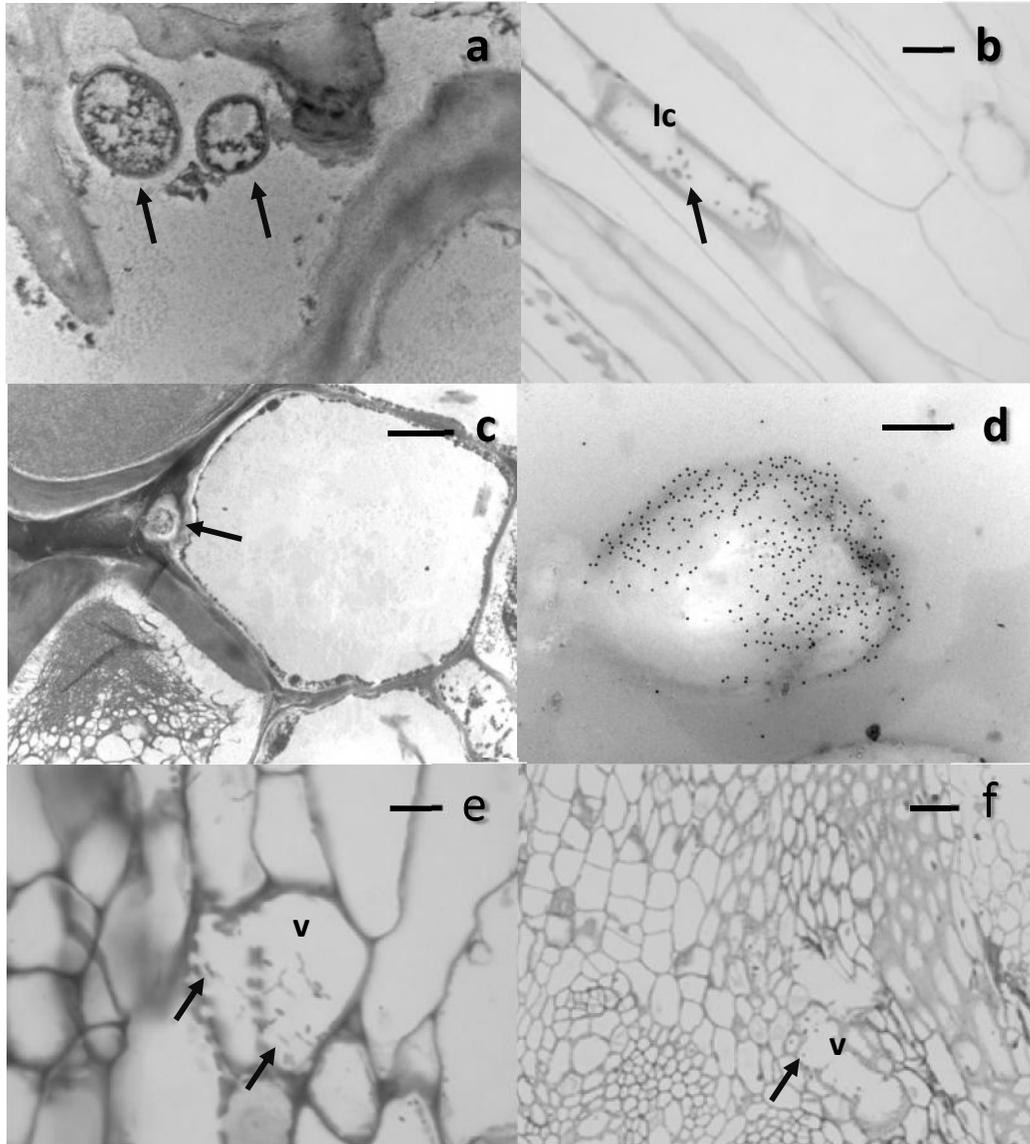


Figura 11. Micrografías de MO y MET de secciones transversales de tejido aéreo mostrando la colonización interna de los tejidos de cañas de azúcar micropropagadas por la cepa UYSO24. a, b y c- colonización de los espacios intercelulares del tallo a las 12 h pi (a) (barra =1 μ m), 24 h pi (b) (barra = 10 μ m) y 48 h pi (c) (barra = 2 μ m). **d**- célula en el espacio intercelular del tallo que se encuentra inmunomarcada con el antisuero contra *Rhizobium* sp. UYSO24 (barra = 500 nm). **e**, **f**- colonización del tejido vascular del tallo a las 12 h pi (e) (barra =10 μ m) y 48 h pi (f) (barra = 25 μ m). Las bacterias son indicadas con **flechas** negras. **lc**- espacio intercelular. **v**- tejido vascular.

2. 4. 3 COLONIZACIÓN DE CAÑAS DE AZÚCAR VAR. LCP POR LA CEPA UYSO10

Previamente, se describió el proceso de colonización e infección de los tejidos internos de plantas de caña de azúcar en el tiempo por la cepa UYSO10 [93]. En el presente trabajo se corroboró la presencia de la cepa UYSO10 dentro de los tejidos de la planta, empleando el antisuero específico producido y purificado para dicha cepa (Figura 12 y 13).

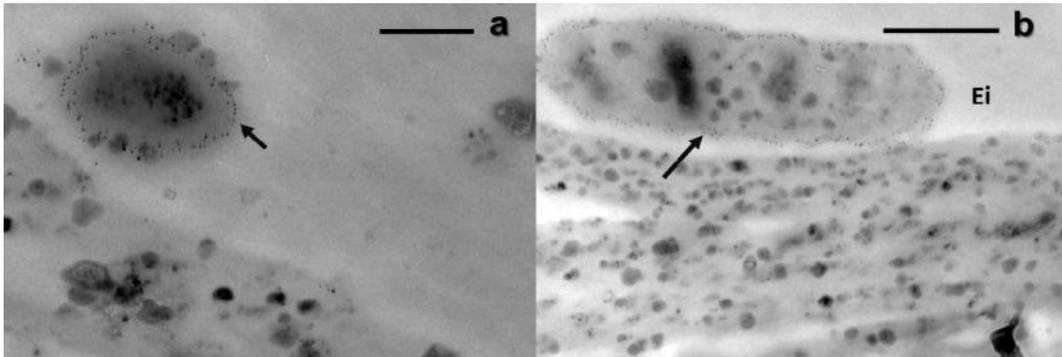


Figura 12. Micrografías de MET de secciones transversales de tallos de caña de azúcar mostrando bacterias marcadas por inmuno-localización con oro, utilizando el antisuero contra la cepa UYSO10. Se observa la colonización del espacio intercelular a las **a**- 24 h pi (barra = 100 nm) y **b**- 48 h pi (barra = 200 nm). Las **flechas** negras señalan las partículas de oro asociadas al anticuerpo secundario. **Ei**- espacio intercelular.

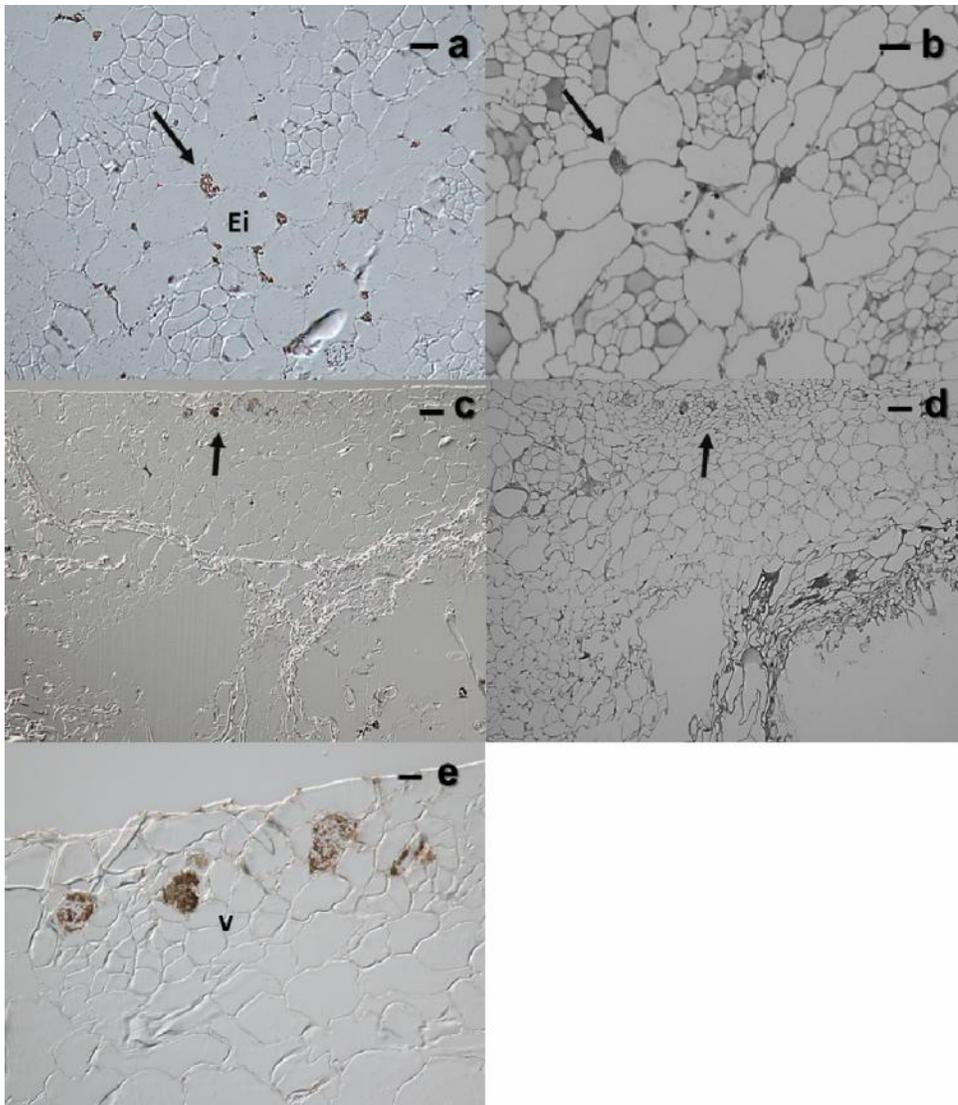


Figura 13. Micrografías de MO de secciones transversales de tallos de caña de azúcar colonizadas por la cepa UYSO10. Se observa la colonización del espacio intercelular (**a y b**) y de los haces vasculares (**c, d y e**), por la cepa UYSO10 en la base del tallo. **a, c y e**- secciones marcadas con el antisuero contra la cepa UYSO10, inmuno-localizadas con oro y la señal amplificada con plata. **b y d**- mismas secciones teñidas con azul de toluidina. Barras: **a y b** = 30 μm , **c y d** = 40 μm y **e**- 25 μm (amplificación de c). **Ei**- espacio intercelular. **v**- tejido vascular.

2. 4. 4 PUESTA A PUNTO DE LA DETECCIÓN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO POR PCR CUANTITATIVA

Los resultados confirmaron la especificidad de los cebadores *in vivo* utilizando como molde cepas cercanas filogenéticamente, así como cepas aisladas de plantas de caña de azúcar de colecciones del laboratorio (Figura 14). Si bien la mayoría de las cepas evaluadas mostraron amplificación (aumento de la fluorescencia), dicha amplificación se realizó en ciclos tardíos en comparación con la cepa específica.

En relación con la eficiencia de la PCR, para los cebadores de la cepa UYSO10, la más baja obtenida fue de 90,2 %, mientras que para los cebadores de la cepa UYSO24, la misma fue de 91,2; con valores de r^2 de 0,993 y 0,997 y pendientes de $-3,581$ y $-3,553$ respectivamente.

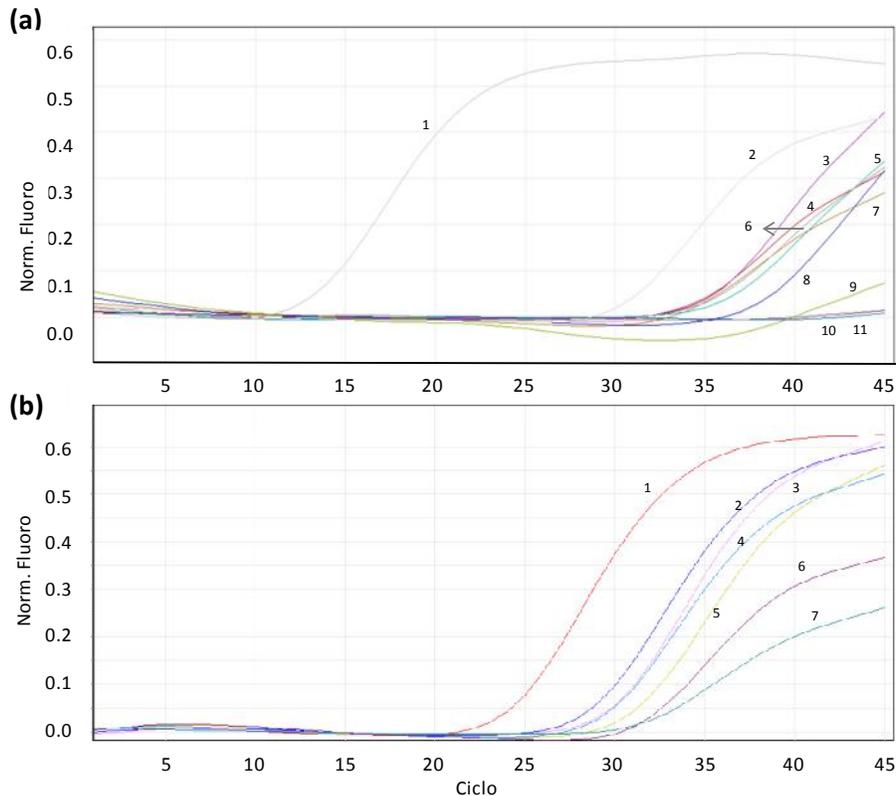


Figura 14. Análisis de la especificidad *in vivo* de los cebadores utilizados para las cepas UYSO10 y UYSO24, en los experimentos PCR cuantitativa. **(a)** Corrida de PCR utilizando los **cebadores específicos para UYSO10**: 1- *Kosakonia* sp. UYSO10, 2- *Acinetobacter* sp. UYSO03, 3- *Enterobacter* sp. UYSO09, 4- *Enterobacter* sp. UYSO08, 5- *Pantoea* sp. UYSO13, 6- *Rhizobium* sp. UYSO24, 7- *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, 8- *Pseudomonas* sp. UYSO21, 9- *Agrobacterium* sp. UYSO04, 10- *Pseudomonas* sp. UYSO01 y 11- control sin ADN. **(b)** Corrida de PCR utilizando los **cebadores específicos para UYSO24**: 1- *Rhizobium* sp. UYSO24, 2- *Pantoea* sp. UYSO13, 3- *Pseudomonas* sp. UYSO01, 4- *Kosakonia* sp. UYSO10, 5- *Xanthomonas* sp. UYSO35, 6- *Agrobacterium* sp. UYSO04 y 7- control sin ADN.

2. 4. 5 CUANTIFICACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑAS DE AZÚCAR VAR. LCP POR LA CEPA UYSO24

El recuento de la cepa UYSO24 en los tejidos internos de la planta se realizó de manera secuencial mediante recuento en placa (1,12 y 24 h pi), y mediante PCR cuantitativa (48 h y 6 días pi). Los resultados detectaron la presencia de la cepa en estudio a partir de 12 h pi en la raíz. A partir de ese momento la población endofítica de la raíz fue aumentando hasta alcanzar un máximo de 10^7 ufc/g de tejido fresco a las 24 h pi y disminuyó a los 6 d pi hasta una población de 10^6 equivalentes genómicos/g de tejido fresco (Figura 12). Por otro lado, la población endofítica en el tejido aéreo fue detectada también a partir de las 12 h pi, observándose a continuación un incremento

de la población alcanzando un máximo de 10^6 - 10^7 ufc/g a las 24 h pi. A los 6 días pi, la población aérea se mantuvo (Figura 15). Posteriormente, se verificaron los resultados inicialmente obtenidos utilizando el tamaño del genoma de una cepa filogenéticamente cercana, con el tamaño del genoma de la cepa UYSO24 (Beracochea en preparación).

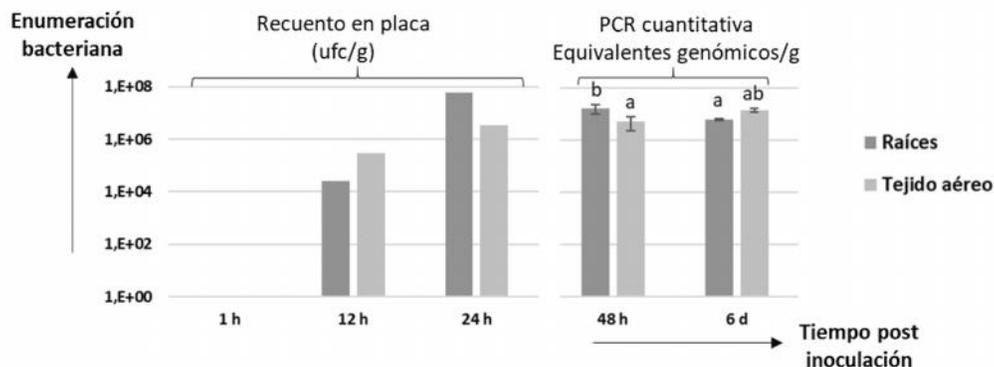


Figura 15. Cuantificación de la población endofítica de la cepa UYSO24 en raíces y tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas.

2. 4. 6 CUANTIFICACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE CAÑAS DE AZÚCAR VAR. LCP POR LA CEPA UYSO10

Asimismo, se realizó también la cuantificación de la cepa UYSO10 en los tejidos internos de la planta de manera secuencial, mediante recuento en placa (1, 12 y 24 h pi) y mediante PCR cuantitativa (48 h y 6 días pi). En este caso, la población en las raíces fue del orden de 10^6 ufc/g de tejido fresco a las 12 h y se mantuvo a partir de las 24 h en 10^7 ufc/g o nº de copias/g de tejido fresco (Figura 15). En el tejido aéreo se detectaron a las 12 h pi poblaciones de 10^5 ufc/g de tejido fresco, alcanzando a partir de las 48 h pi poblaciones de 10^6 - 10^7 equivalentes genómicos/g de tejido fresco (Figura 16). Posteriormente, utilizando el tamaño del genoma de la cepa UYSO10 (Beracochea en preparación), se verificaron los resultados obtenidos.

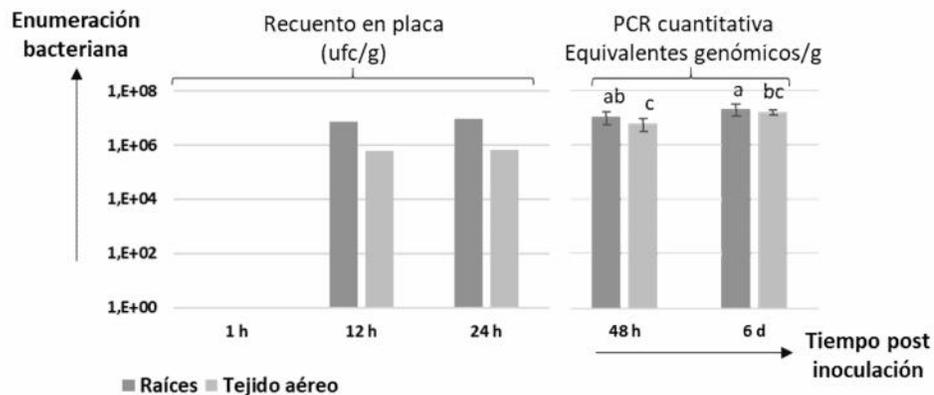


Figura 16. Cuantificación de la población endofítica de la cepa UYSO10 en raíces y tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas.

2. 4. 7 TRATAMIENTOS CONTROL Y REFERENCIA

En paralelo y mediante MEB y MO, no se detectaron bacterias colonizando la superficie, ni el interior de las plantas no inoculadas (control negativo) (datos no mostrados). A su vez, a partir de ADN extraído de las mismas plantas no se obtuvo amplificación mediante PCR cuantitativa, empleando los cebadores específicos para las cepas UYSO10 y UYSO24.

Por otro lado, solamente en los estudios de colonización de la superficie de cañas de azúcar, se emplearon como referencia dos tratamientos: 1- cañas de azúcar inoculadas con la cepa modelo endófito y PCV de caña de azúcar: *G. diazotrophicus* Pal5 y 2: cañas de azúcar inoculadas con la cepa no PCV, aislada de caña de azúcar: *Pseudomonas* sp. UYSO14. En ambos casos se evaluó solamente la colonización a las 24 h pi. En el caso de la cepa *G. diazotrophicus* Pal5, se observó la colonización de la cofia por células individuales y pequeños agregados (Figura 17a). Por otro lado, para el caso de la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO14, se observó la presencia de células individuales en la superficie de la zona de los pelos radiculares de la raíz y en el tejido aéreo (Figura 17b).

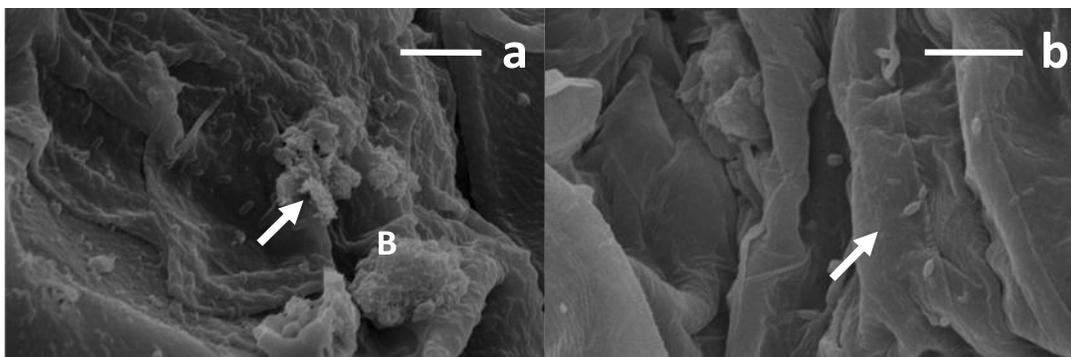


Figura 17. Micrografía mediante MEB mostrando la colonización de la superficie de raíces de cañas de azúcar micropropagadas por las cepas utilizadas como referencia a las 24 h pi. **a-** *G. diazotrophicus* Pal5 colonizando la punta de la raíz (barra = 5 μ m). **b-** *Pseudomonas* sp. UYSO14 colonizando con células individuales el tejido aéreo de plantas de caña de azúcar (barra = 10 μ m). Las **flechas** blancas indican las bacterias. **B**-biopelículas.

3. DISCUSIÓN

3. 1 LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 PRESENTAN CARACTERÍSTICAS QUE PROBABLEMENTE INCIDEN EN LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN RADICULAR

Las bacterias endófitas, son bacterias del suelo que colonizan el rizoplasma (epifíticas) y posteriormente los tejidos de la planta, o eventualmenteson aquellas que se encuentran presentes en el material de propagación de la planta. La interacción con la planta constituye un proceso dinámico, que comienza con un reconocimiento inicial de señales moleculares, seguido del movimiento de la bacteria en dirección a la planta hospedera, su adhesión a la superficie vegetal y posterior penetración y multiplicación dentro del hospedero [75]. Por lo tanto, una colonización endofítica exitosa involucra a su vez, un hospedero compatible.

Las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 fueron aisladas de variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay y descritas como promotoras del crecimiento vegetal las mismas [93, 107]. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la interacción entre las cepas endófitas UYSO10 y UYSO24 con plantas de caña de azúcar, ambas cepas fueron caracterizadas *in vitro* buscando características asociadas a la interacción con la planta e *in vivo*, en interacción con la misma. A continuación, la discusión se organizó considerando secuencialmente los pasos de la colonización, desde la colonización de la superficie a la interna y considerando la información posteriormente obtenida a partir de los genomas de ambas cepas en estudio.

Atracción y movimiento hacia la rizósfera

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de flagelos en ambas cepas, así como la capacidad de moverse tipo *swimming*. El movimiento tipo *swimming* requiere la presencia de flagelos, e implica el movimiento individual de la bacteria en una orientación creciente o decreciente de uno o varios solutos. Este movimiento le permite a la bacteria responder frente a diversos estímulos ambientales como pueden ser la presencia de compuestos químico atrayentes en los exudados radiculares, colonizando posteriormente los espacios dela rizósfera o el rizoplasma [130]. Asimismo, se ha reportado que el flagelo es necesario para el anclaje de las bacterias en la superficie radicular [131].

Análisis bioinformáticos preliminares de dichos genomas permitieron determinar la presencia de los genes estructurales del flagelo, así como los genes asociados al motor y al movimiento por quimiotaxis (Beracochea en preparación).

Particularmente la cepa UYSO10 mostró también la capacidad de realizar *twitching*. Este tipo de movimiento es descrito como un movimiento intermitente de sacudidas cortas, dependiente de la retracción del pili, e independiente de flagelo [130]. En este sentido se identificaron en el genoma de la cepa UYSO10 los genes de biosíntesis del pili tipo IV, así como el gen *pilT* asociado a la retracción del pili y al movimiento tipo *twitching* (Beracochea en preparación). Este tipo de estructura es importante en la interacción planta-endófito, en ese sentido, análisis en cepas de *Azoarcus* sp. BH72 mutantes en el pili tipo IV, mostraron que dicho pili es necesario para la formación de colonias en la superficie de la raíz, así como en la invasión de los tejidos internos de las raíces [58, 132].

Como se mencionó, uno de los mecanismos asociado a la capacidad de las bacterias de moverse, es el de quimiotaxis. En ese sentido, ambas bacterias mostraron ser capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de C y N, característica importante en el proceso de colonización rizosférico el cual es un ambiente rico en exudados radiculares. En este estudio no se realizaron ensayos de quimiotaxis con compuestos particulares presentes en los exudados de raíces de caña, ya que se desconoce la composición de los mismos. Sin embargo, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en medio de cultivo de planta MS, suplementados con exudados de caña de azúcar, como fuente de N y posiblemente C, mediante curvas de crecimiento. Los resultados mostraron la presencia de una larga fase de adaptación en todas las condiciones evaluadas; así como un leve incremento de la población bacteriana al final del experimento, en el tratamiento en el cuallas cepas se crecieron en presencia de exudados. Estos resultados sugieren que: 1- las poblaciones de ambas cepas se encuentran estresadas en el medio de cultivo evaluado (MS 1/10 sin N); y 2- la presencia de exudados no logra superar del todo la condición de estrés observada. Sin embargo, en esta observación pueden estar influyendo otros factores como (i)- la relación inóculo bacteriano/exudados radiculares y (ii)- los niveles de estrés de la planta asociados a estar creciendo en un medio de cultivo diluido, pudiendo de esta forma afectar la composición y abundancia de los exudados. Es importante destacar que el medio MS sin fuente de N y diluido se encuentra ampliamente reportado [77, 123] y es el usado en esta tesis en los experimentos de interacción planta-bacteria *in vitro*. Dicha modificación del medio de cultivo original busca promover la interacción planta-bacteria [123].

Colonización de la rizósfera

Una vez que las bacterias endófitas se acercan al rizoplano y alcanzan una adaptación nutricional, son capaces de colonizar la superficie radicular formando colonias en forma de agregados o biopelículas. En este proceso se han reportado como involucrados a los flagelos, el pili tipo IV, la producción de exopolisacáridos (EPS), así

como los sistemas de comunicación tipo *quorum sensing* [57, 75]. En nuestro caso, los resultados mostraron que la cepa UYSO24 forma biopelículas en ensayos *in vitro* y también en ensayos de interacción con plantas de caña de azúcar (*in vivo*). Mediante análisis bioinformáticos fue posible identificaren el genoma de la cepa UYSO24 los genes: «*Biofilm regulator*» BssR, BssS y «*Protein YjgK, linked to biofilm formation*», así como el operón *exo* responsable de la síntesis de exopolisacáridos, los cuales son componentes importantes de las biopelículas (Beracochea en preparación).

Por otro lado, si bien se observó que la cepa UYSO10 coloniza la superficie de raíces de caña de azúcar en forma de biopelículas [93], no se observó la formación de biopelículas en los ensayos realizados *in vitro* en placa de ELISA, bajo las condiciones ensayadas.

Ingreso y colonización de los tejidos de las plantas

Colonizada la superficie de las raíces, las bacterias endófitas pueden ingresar y colonizar los tejidos internos de la planta. Diversas características bacterianas han sido reportadas como involucradas en este proceso incluyendo: el movimiento tipo *twitching*, la presencia de enzimas degradadoras de la pared celular (extracelulares), así como enzimas asociadas a mecanismos de detoxificación [50,75]. Las enzimas degradadoras de la pared celular juegan un rol clave en las interacciones planta-patógeno y leguminosa-rizobio, así como en el biocontrol de patógenos [46,133]. En las cepas en estudio, se detectó actividad endoglucanasas y particularmente en el caso de la cepa UYSO24 también lacasas. Esto fue confirmado mediante búsquedas bioinformáticas en donde se detectaron en ambas cepas genes que codifican para este tipo de celulasas. Sería muy interesante profundizar en el estudio de su rol en la interacción planta-bacteria ya que podrían estar involucradas en una colonización activa de las plantas como en la apertura de los espacios entre las células de los tejidos internos. Por ejemplo, en la cepa *Azoarcus* sp. BH72, se ha reportado que la endoglucanasa EglA es clave para infectar las raíces de planta de arroz [134]. Este tipo de enzimas ha sido reportada en diversas bacterias endófitas o asociadas a plantas, incluyendo *Herbaspirillum* spp. donde se desconoce su rol en la interacción [135].

Como respuesta de defensa general frente a la colonización bacteriana, las plantas producen especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*). Esto ha sido reportado en diferentes tipos de interacciones planta-bacteria incluyendo endófitos [136]. Para detoxificar estas moléculas, las bacterias producen enzimas antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa. En ambas cepas en estudio se detectaron *in vitro* la presencia de ambas actividades enzimáticas, así como las secuencias codificantes para este tipo de enzimas en sus genomas.

Por otro lado, las plantas presentan varios mecanismos de defensa frente a la colonización bacteriana, incluyendo la regulación de algunas de las hormonas vegetales [137]. En este sentido, la acción de la enzima bacteriana ACC desaminasa ha sido reportada como involucrada en la disminución de la concentración de etileno, provocando la elongación de las raíces y la disminución de la respuesta de defensa en algunas plantas [36]. Por este motivo, se ha postulado que la presencia de esta enzima es una característica importante para la vida endofítica [50]. En nuestro estudio se detectó en la cepa UYSO24 el gen que codifica para la enzima ACC desaminasa, resultado que fue corroborado mediante análisis bioinformáticos del genoma. Curiosamente, si bien se detectó la presencia del gen, no se observó actividad *in vitro* en las condiciones ensayadas.

En el caso de la cepa UYSO10 y mediante las aproximaciones experimentales realizadas, no se detectó el gen ACC desaminasa, ni su actividad. La ausencia de esta característica se verificó mediante análisis bioinformáticos del genoma de la cepa.

Por último, ambas cepas mostraron ser capaces de crecer en presencia de apoplasto de caña de azúcar como fuente de C y N. Es interesante resaltar que dicho crecimiento es similar al crecimiento en el medio de cultivo rico TY, sugiriendo que en estas condiciones las cepas no sufren de estrés nutricional. Estas observaciones indican que el apoplasto posee fuentes de C y N utilizables por las bacterias, lo que permitiría su sobrevivencia y multiplicación en el interior de la planta. Esto tiene sentido teniendo en cuenta que ambas bacterias fueron aisladas de los tallos de caña de azúcar. A su vez, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer utilizando algunas de las principales fuentes de C reportadas en el apoplasto de la caña de azúcar, incluyendo los ácidos orgánicos citrato y malato y azúcares como sacarosa, fructosa y glucosa [138]. Los resultados mostraron que ambas cepas son capaces de crecer en todas las fuentes de C ensayadas.

En general, las características detectadas en este capítulo han sido reportadas en otras bacterias endofitas como involucradas en la interacción planta-bacteria por lo que se podría especular también que las mismas puedan estar también asociadas a la interacción entre las cepas y su planta hospedera. Sin embargo, para demostrarlo se deben realizar nuevos experimentos en los cuales se evalúen por separado el efecto de cada una de ellas sobre la colonización radicular.

3. 2 LAS CEPAS UYSO10 Y UYSO24 SON ENDÓFITOS VERDADEROS

La colonización de la superficie radicular por la cepa UYSO24 fue similar a lo descrito para otras bacterias endofitas [18, 20,135]. En particular, la cepa UYSO24 mostró como

principales sitios de colonización radicular los tejidos meristemáticos ubicados en los sitios de emergencia de las raíces laterales y en la cofia, así como la zona de los pelos radicales de las raíces. Una característica muy relevante es que esta cepa, a diferencia de la cepa UYSO10, colonizó las raíces formando grandes extensiones de biopelículas laminares.

Por otro lado, mediante microscopía y empleando anticuerpos específicos, se pudo determinar que las cepas UYSO10 y UYSO24 colonizan los tejidos internos de las plantas, por lo tanto, se las definió como “endófitos verdaderos”.

Por otra parte, a diferencia de la cepa UYSO10, la colonización de los tejidos internos por la cepa UYSO24 fue baja y discreta, observándose que la ruta de infección involucra la colonización de los espacios intercelulares y posteriormente el tejido vascular por células individuales o por pequeños agregados. Sin embargo, en contraposición con estas observaciones, la cuantificación de la población endofítica sugiere una gran colonización de los tejidos internos por parte de esta cepa. Una posible explicación para estas observaciones contradictorias proviene de la naturaleza de la interacción endofítica. En este sentido, dado que las bacterias no se encuentran uniformemente distribuidas en los tejidos, por más que se haga un gran esfuerzo de muestreo en observar numerosos cortes por microscopía, es difícil encontrar bacterias aún con altas densidades poblacionales. De la misma forma, si consideramos a la cepa UYSO24 como un colonizador de la superficie de la raíz, la mayoría de las micrografías muestran poblaciones variables en tamaño, desde micrografías donde no se detectaron bacterias a micrografías con presencia de grandes agregados. Estas características peculiares podrían explicar esta paradoja.

El género *Rhizobium* ha sido ampliamente reportado en asociaciones benéficas planta-bacteria, principalmente en la asociación leguminosa-rizobio. Sin embargo, en los últimos años se han reportado varias cepas no nodulantes pertenecientes a este género aisladas a partir de tejidos esterilizados en su superficie, siendo reportadas a su vez como PCV de arroz, sorgo, maíz, trigo y tomate [139–143].

Finalmente, con relación a la colonización de plantas de caña de azúcar var. LCP por las cepas usadas como referencia, se observó que *G. diazotrophicus* Pal5 colonizó la superficie radicular de forma similar a la reportada en otros cultivares [108, 123, 126, 127], pero en menor cantidad. Probablemente este fenómeno se deba a que la var. LCP no se asocia específicamente a esta cepa. Por otro lado, a diferencia de las cepas Pal5, UYSO10 y UYSO24, la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO14 colonizó la superficie de las raíces de plantas de caña de azúcar como células simples, sin formar agregados ni biopelículas. Ésta baja colonización de la superficie puede estar asociada a la disminución en su capacidad de formar biopelículas en presencia de exudados (Tabla 3), así como a la incapacidad de promover el crecimiento de las plantas de caña de azúcar [107].

CAPITULO III: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LAS CEPAS *KOSAKONIA* SP. UYSO10 Y *RHIZOBIUM* SP. UYSO24 A LA PRESENCIA DE EXUDADOS RADICULARES DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

OBJETIVO ESPECÍFICO

Describir la respuesta de las cepas UYSO10 y UYSO24 a los exudados radiculares de plantas de caña de azúcar.

ESTRATEGIA

En este capítulo se abordó el estudio de una de las etapas iniciales de la interacción planta-bacteria, particularmente, la respuesta bacteriana a la presencia de los exudados radiculares. Como estrategia general se empleó un abordaje proteómico comparándose cuantitativamente el proteoma de las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 expuestas o no a los exudados radiculares. Para la comparación de los proteomas se emplearon dos estrategias: una dependiente de gel utilizando la técnica de *Difference In Gel Electrophoresis* (DIGE) y otra independiente de gel (tipo *shotgun*), utilizando la técnica denano *Liquid Chromatography* (LC) -*TandemMass Spectrometry* (MS/MS) con conteo de espectros.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1. 1 CEPAS BACTERIANAS Y PLANTAS

En este estudio se utilizaron las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24; así como plantas micropropagadas de caña de azúcar de la var. LCP (Capítulo II_1. 1).

1. 2 ENSAYO BIOLÓGICO

En el Capítulo II de esta tesis se demostró que ambas cepas bacterianas en estudio fueron incapaces de crecer en medio de cultivo MS 1/10 sin N, pero si en el medio con exudados radiculares. Por dicho motivo, para evaluar el efecto de los exudados radiculares sobre las cepas, se decidió realizar un ensayo de exposición a los exudados (Figura 1).

Para esto, por un lado, las cepas bacterianas fueron crecidas en 20 ml de medio de cultivo TY líquido por 24 h. Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas y suspendidas en medio de cultivo MS 1/10 sin N, para luego ser incubadas con agitación por 16-20 h a 30 °C (adaptación) en el mismo medio.

Por otro lado, y en paralelo, se cultivaron plantas de caña de azúcar micropropagadas en frascos conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS 1/10 sin N durante 3-4 días momento en el cual fueron retiradas (Capítulo II_1. 2. 5) [93,123]. De esta manera se obtuvo medio MS 1/10 sin N conteniendo los exudados radiculares.

A continuación, se inocularon 5×10^{10} células “adaptadas” al medio de cultivo MS 1/10 sin N, con y sin exudados radiculares ($1,25 \times 10^9$ células/ml), incubándose en agitación durante 6 h a 30 °C. Por último, las células se cosecharon por centrifugación a 6.000 g durante 10 min a 4 °C y selavaron una vez con buffer fosfato. Dichas células fueron el material de partida para la extracción de proteínas totales.

En este ensayo se realizaron cuatro réplicas biológicas por tratamiento.

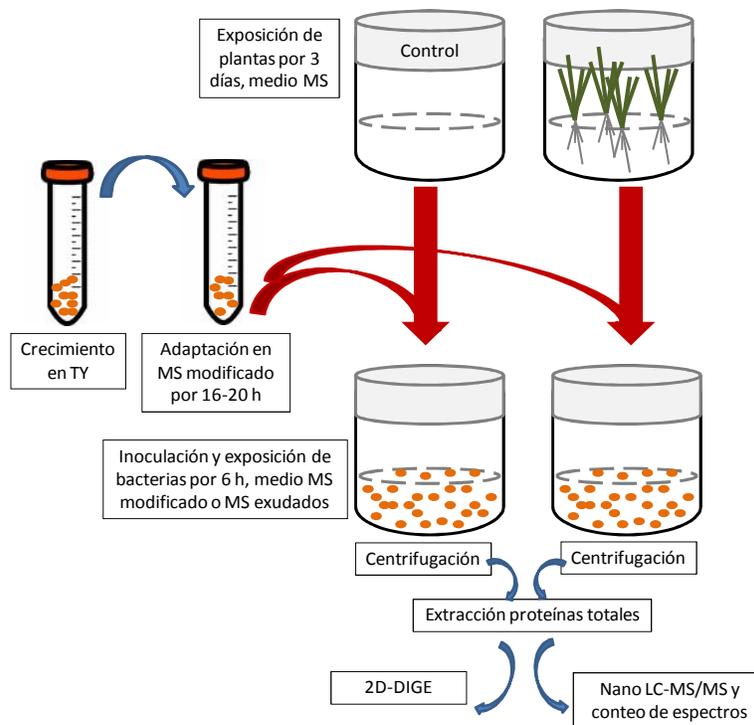


Figura 1. Estrategia experimental utilizada para estudiar la respuesta bacteriana a los exudados radiculares.

1. 3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES BACTERIANAS

Las proteínas totales se extrajeron por suspensión del pellet obtenido en el punto 1. 2 en buffer de extracción (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % (p/v) y dithiothreitol (DTT) 10 mM), con agitación durante 30 min a 4 °C. A continuación, las células fueron sonicadas 3 veces durante 15 s y agitadas nuevamente durante 30 min a 4 °C. Finalmente, con el fin de remover cualquier impureza, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 g durante 20 min a 4 °C, guardándose el sobrenadante.

1. 4 CUANTIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

La concentración proteica se cuantificó utilizando el método de Bradford [144]. Para esto a 1-2 µl de cada muestra se le adicionó 200 µl de reactivo Bradford (Anexo A), midiéndose la absorbancia a 595 nm (Abs_{595nm}). La cuantificación de proteínas se calculó en base a una curva de calibración preparada con diluciones seriadas de una solución patrón de sero albúmina bovina (BSA) (0-10 µg/µl).

La calidad de las muestras obtenidas se evaluó por SDS-PAGE en un gel de acrilamida 12 %. Previo a sembrar las muestras en el gel, a 20 µg de cada muestra, se le agregó *buffer* de la muestra 1 X (Tris 0,25 M, SDS 8 % (p/v), glicerol 40 % (v/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v), β-mercaptoetanol 1 % (v/v)) y se calentaron durante 10 min

a 95-100 °C. La corrida electroforética se realizó a 85 V. Al finalizar la electroforesis, los geles se fijaron con etanol: ácido acético: agua en una relación (5:1:4), durante 30 min y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie G-250 en etanol (sulfato de amonio 8 %, ácido fosfórico 0,8 %, Azul de Coomassie G-250 0,08 %, etanol 20 %), durante toda la noche. El exceso de colorante se eliminó con sucesivos lavados con agua destilada.

1. 5 ANÁLISIS PROTEÓMICO POR DIGE

La técnica de DIGE permite comparar al menos 2 condiciones biológicas de forma cuantitativa (Figura 2) [145,146]. Brevemente, la misma implica el marcado de las proteínas de las condiciones a comparar con dos fluoróforos distintos. Las muestras marcadas se analizan juntamente con un estándar interno, *pool* formado por la misma cantidad de cada una de las muestras a analizar, marcado con un tercer fluoróforo. Posteriormente, todas las muestras se corren juntas en un mismo gel 2D SDS-PAGE y finalizada la corrida, se adquieren las imágenes a analizar, con un scanner de fluorescencia. Utilizando un software específico se comparan las imágenes adquiridas, identificándose aquellas proteínas con diferencias estadísticas en su abundancia entre los tratamientos. Finalmente, las proteínas de interés son escindidas del gel e identificadas por espectrometría de masas.



Figura 2. Estrategia general de la técnica de DIGE seguida en este estudio.

1. 5. 1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA DIGE

A las muestras proteicas obtenidas en el punto 1.3 se les realizó un procedimiento de limpieza. Para esto, a 200 µg de proteínas de cada muestra se le adicionaron 300 µl de ácido tricloroacético 10 % (v/v), incubándose con agitación durante 15 min en hielo. Posteriormente se les adicionaron 300 µl de deoxicolato 0,2 % (p/v), centrifugándose a

15.000g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue descartado con cuidado, mientras que el pellet fue suspendido en 40 µl de deoxicolato 0,2 % (p/v) e incubado nuevamente durante 5 min en hielo. A continuación, las muestras fueron centrifugadas en las mismas condiciones mencionadas y el sobrenadante descartado nuevamente. Al pellet obtenido se le agregó 25 µl de agua y se agitó en vortex. Inmediatamente a la suspensión obtenida se le agregó 1 ml de acetona pre-enfriada a -20 °C, incubándose toda la noche a -20 °C. Al otro día, las suspensiones fueron centrifugadas a 15.000 g durante 10 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante con cuidado y dejándose secar el pellet a temperatura ambiente por no más de 5 min. Posteriormente el pellet fue suspendido en 40-50 µl de buffer de solubilización (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPs 4 % (p/v), pH 8.5), agitándose durante 1 h en frío. Finalmente, con el fin de eliminar cualquier residuo, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 g durante 15 min a 4 °C, conservándose el sobrenadante.

Las muestras proteicas obtenidas fueron nuevamente cuantificadas por Bradford y por densitometría en geles de poliacrilamida. Para ello se sembraron las muestras en un gel SDS-PAGE, junto con 4 diluciones del marcador de peso molecular: *Low molecular weight calibration* (Amersham). Al finalizar la corrida electroforética, las imágenes fueron adquiridas en un scanner UMAX Power-Look 1120 y analizadas usando el Software LabScan 5.0 (GE Healthcare). A partir de las imágenes obtenidas y por densitometría se calculó la concentración de proteínas totales de las muestras.

1. 5. 2 EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD MUESTRA-FLUORÓFOROS

Para esto, a 10 µg de una de las réplicas biológicas de cada tratamiento se les realizó un marcado mínimo por separado con cada uno de los 3 fluoróforos (Cy2, Cy3 y Cy5), del kit AmershamCyDye DIGE Fluor (GE Healthcare), según la recomendación del fabricante. Las muestras marcadas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE y los geles obtenidos escaneados en el Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). En las imágenes obtenidas, se evaluó la ausencia de diferencias en el marcado entre las muestras de cada tratamiento.

1. 5. 3 MARCADO DE LAS MUESTRAS

A partir de cada una de las réplicas biológicas, se marcaron 50 µg de proteínas con 400 pmoles de los fluoróforos Cy3 y Cy5, de forma que cada tratamiento tuviera 2 réplicas biológicas marcadas con cada fluoróforo (Tabla 1 y 2). En paralelo se preparó el estándar interno que incluyó 25 µg de cada muestra (de cada réplica y de cada tratamiento), la cual fue marcada con el fluoróforo Cy2. La reacción de marcado se realizó en la oscuridad durante 30 min en hielo, deteniéndose mediante la incubación con lisina 10 mM. Una vez marcadas todas las réplicas y el estándar interno, las mismas se agruparon según el diseño mostrado (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Diseño experimental del marcado de las muestras para DIGE, cepa UYSO10.

Gel	Nº de tira	Marcado con Cy3	Marcado con Cy5
1	46873	- exudados, réplica 3	+ exudados, réplica 3
2	46874	+ exudados, réplica 1	- exudados, réplica 2
3	46875	- exudados, réplica 4	+ exudados, réplica 2
4	46876	+ exudados, réplica 4	- exudados, réplica 1

Tabla 2. Diseño experimental del marcado de las muestras para DIGE, cepa UYSO24.

Gel	Nº de tira	Marcado con Cy3	Marcado con Cy5
1	46880	- exudados, réplica 3	+ exudados, réplica 3
2	46879	+ exudados, réplica 1	- exudados, réplica 2
3	46878	- exudados, réplica 1	+ exudados, réplica 2
4	46877	+ exudados, réplica 4	- exudados, réplica 4

1. 5. 4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR 2D SDS-PAGE

Geles de una dimensión (tiras) de 24cm de largo con un rango de pH 3-10NL (ImmobilineDrystrip GE Healthcare), fueron hidratados en un IPGbox (GE Healthcare), utilizando buffer de hidratación (urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 2% (p/v), DTT 10mM e IPG-buffer (GE Healthcare)1,2% (v/v)), según recomendación del fabricante. En el buffer de hidratación se incluyeron las muestras marcadas y agrupadas, las cuales se incorporaron pasivamente a las tiras (Tabla 1 y 2). Al día siguiente se realizó la corrida de la primera dimensión en el equipo IPGphor III (GE Healthcare). El perfil de voltaje empleado fue: 1- una fase constante de 500 V durante 1 h, 2- un incremento lineal hasta 1.000 V a una velocidad de 800 V/h, 3- un incremento hasta 10.000 V a una velocidad de 16.500 V/h, y 3- una fase final constante de 10.000 V hasta alcanzar un total en la corrida de 52.500 V transferidos a cada tira. Una vez finalizada la corrida, los puentes disulfuros se redujeron por incubación de las tiras en 15 ml de buffer de equilibrio (urea 6 M, SDS 2 % (p/v), glicerol 30 % (v/v), Tris-HCl 50 mM pH 8, 6), suplementado con DTT 1 % (p/v), durante 15 min. Posteriormente se alquilaron las cisteínas incubándose las tiras en 15 ml buffer de equilibrio, suplementado con iodoacetamida 4,7 % (p/v), durante 15 min. La reacción se inactivó por inmersión de la tira en buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %).

La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE poliacrilamida 12 %, utilizando la cuba de electroforesis Ettan DALT sixElectrophoresisSystem (GE Healthcare), equipada con la unidad de enfriamiento Multitemp III de (GE Healthcare) y termostaticada a 20 °C. La corriente fue 2 W por gel durante 45 min y luego se incrementó a 17 W por gel durante 4-5 h.

1. 5. 5 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

Luego de la electroforesis, los geles fueron escaneados utilizando un escáner Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare), con el software ImageQuant TL v8. 1 (GE Healthcare). Posteriormente las imágenes obtenidas se exportaron al programa DeCyder 2D DifferentialAnalysis Software 7. 2 (GE Healthcare) para su análisis. A continuación, todos los *spots* de cada gel por separado fueron detectados y cuantificados, normalizándose con el estándar interno (módulo *Difference In gel Analysis*). Luego se realizó el pareamiento de los geles comparándose la expresión de cada *spot* entre los geles (módulo *BiologicalVariationAnalysis*). Finalmente, se seleccionaron para su identificación aquellos *spots* que presentaron una tasa de cambio mayor a 1,5 y que fueran significativos al aplicar la prueba de *Student* con un *p*-valor de 0,05.

1. 5. 6 ANÁLISIS DE LOS SPOTS DE INTERÉS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Luego de escanear los geles, los mismos fueron fijados y teñidos con azul de CoomassieG-250 como se describió en el punto 1.4. Debido a que no se obtuvo una imagen definida de todos los *spots*, y a la imposibilidad de relacionarlos con la imagen obtenida con la técnica de DIGE, se decidió realizar geles preparativos para escindir los *spots* de interés. Para ello, se realizaron nuevas corridas en geles de 2D SDS-PAGE utilizando en este caso 500 µg de proteína por gel. A continuación, los *spots* reconocidos como diferenciales fueron ubicados en el gel y escindidos utilizando un bisturí estéril en cámara de flujo laminar.

Los *spots* fueron procesados y analizados por espectrometría de masas en un equipo MALDI-TOF/TOF, en la Unidad Mixta de Bioquímica y Proteómica Analíticas, del IPMont-IIBCE. Los espectros obtenidos fueron comparados, utilizando el servidor de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), con la base de datos de los genomas de las cepas ensayadas (Beracochea 2018, en preparación). Para ello, los proteomas de la cepa UYSO10 y de UYSO24 se descargaron del programa *Rapid AnnotationusingSubsystemTechnology* (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/>). Los parámetros de búsqueda en el Mascot fueron: i- con los proteomas de las cepas UYSO10 y UYSO24; ii- saltos de cortes de tripsina permitidos:1; iii- modificaciones variable: oxidación de metionina y modificación fija: carbamidometilación de cisteínas; iv- tolerancia de masa de péptidos: 0,08 Da y tolerancia MS/MS: 0,3-0,5 Da. Los valores de *m/z* utilizados corresponden a los valores monoisotópicos. Se consideró positiva la identificación de una proteína cuando el *Mascot protein score* fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) y al menos una fragmentación fue asignada con un *Mascot peptide ion score* significativo ($p < 0,05$).

Las proteínas identificadas fueron clasificadas según los grupos funcionales de la *ClustersofOrthologousGroups* (COGs), utilizando la base de datos de EggNOG 4.5.1 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>) [147]; y según su ubicación subcelular,

utilizando los servidores PSORTb 3.0.2 (<http://www.psorb.org/psorb/>) [148] y Cello v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) [149]. Con la finalidad de descifrar el rol biológico de las proteínas identificadas como hipotéticas, se evaluó la homología de las secuencias, así como la presencia de dominios y sus funciones, empleando las herramientas y páginas: RAST, Psi-Blastdel NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [150], InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) [151] y UniProt (<http://www.uniprot.org/>) [152].

1. 6 ANÁLISIS PROTEÓMICO POR NANO LC-MS/MS Y CONTEO DE ESPECTROS

En la estrategia proteómica de *shotgun* las muestras se corren primero en un gel SDS-PAGE a partir del cual, y con el único fin disminuir la complejidad de las muestras, se fraccionan los carriles (Figura 3). A partir de los mismos, las proteínas son digeridas con tripsina y los péptidos extraídos. Posteriormente y nuevamente con el fin de disminuir la complejidad de cada muestra, los péptidos provenientes de cada sección del gel son fraccionados en un nano LC acoplado a un espectrómetro de masas. A continuación, los espectros de fragmentación obtenidos son asignados a una cierta proteína mediante un software, empleando como referencia la base de datos del genoma del organismo analizado. La comparación del número de espectros asignados a una proteína en las distintas condiciones permite realizar cuantificaciones relativas de los niveles de la proteína [153].



Figura 3. Estrategia general de la aproximación del tipo *shotgun* empleada en este estudio.

1. 6. 1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA *SHOTGUN*

A partir de cada extracto proteico obtenido en el punto 1.3, se cargaron 14,7 µg de proteína en un gel de poliacrilamida NUPAGE pre-hecho con un gradiente no lineal 4-12 % (LifeTechnology). El mismo se corrió bajo una corriente constante de 160 V, durante 1 h 15 min. Posteriormente, el gel se fijó y tiñó con Azul de Coomassie G-250 como se describió en el punto 1.4, cortándose cada carril en 6 fragmentos. Dichos fragmentos fueron en primera instancia desteñidos con una solución de acetonitrilo (ACN) 100 %: bicarbonato de amonio 0,2 M (1:1) con agitación, durante 1 h a 30 °C. A continuación, las muestras se incubaron para su reducción en DTT 10 mM con agitación, durante 1 h a 56 °C. Luego de equilibrar la temperatura de las muestras con la ambiental, las mismas fueron incubadas para su alquilación en una solución de iodoacetamida 55 mM con agitación, durante 45 min. Posteriormente se lavaron con bicarbonato de amonio 0,2 M pH 8, durante 15 min; para luego ser deshidratadas mediante dos incubaciones con ACN 100 % en agitación, durante 10 min. Finalmente, el ACN fue retirado y los fragmentos de gel secados completamente con el tubo abierto, a temperatura ambiente.

Las muestras así procesadas, fueron digeridas con tripsina (aproximadamente 1 µg tripsina/2,5 µg de proteína), durante toda la noche, a 37 °C. Al otro día, los péptidos fueron extraídos mediante la incubación de los geles en 100 µl de fase B (ACN 60 %, ácido fórmico 0,1 %), con agitación durante 1 h a 30 °C; repitiéndose el mismo procedimiento una vez más. Las suspensiones obtenidas se secaron en *Speedvac* e inmediatamente los pellets obtenidos fueron suspendidos en 12 µl de fase A (ácido fórmico 0,1 %), sonicándose 3 veces durante 15 s. Finalmente, con el fin de eliminar posibles residuos, las muestras fueron centrifugadas a 16.000 g durante 20 min a 4 °C, conservándose 10 µl del sobrenadante.

1. 6. 2 ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA

Las muestras obtenidas en el punto anterior se inyectaron en un easy-nLC 1000 (Proxeon-Thermo Fisher Scientific), acoplado a un espectrómetro de masa *Linear Trap Quadrupole* (LTQ) Velos (Thermo Fisher Scientific), equipado con una trampa iónica lineal. Para la separación por nano LC se utilizó una pre-columna *Acclaim PepMap™* 100, *Nanoviper C18* de 75 µm x 20 mm (tamaño de la partícula 3 µm) (Thermo Fisher Scientific), y una columna *PepMap™* RSLC C18 50 µm x 15 cm (tamaño de la partícula 2 µm) (Thermo Fisher Scientific). La elución de los péptidos se realizó con un flujo constante de 250 nl/min, utilizando el siguiente gradiente: fase B de 0 a 50 % durante 100 min, fase B de 50 a 100 % durante 10 min y fase B 100 % durante 10 minutos. La adquisición de los espectros se realizó en el modo dependiente de los datos, el cual consiste en la realización de un escaneo completo de los espectros seguido de una fragmentación MS/MS para los 10 espectros con la relación masa/carga (m/z) más

intensos. A su vez se utilizó una lista de exclusión dinámica, donde si el valor de m/z de un espectro se repetía por 30 s, se le aplicaba una exclusión de 30 s de duración.

1. 6. 3 ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LOS ESPECTROS OBTENIDOS

Para los análisis informáticos se utilizó el programa *PatternLabfor Proteomicsv 4.0* (<http://www.patternlabforproteomics.org/>) [154]. Para esto, en primera instancia y a partir del proteoma de la cepa UYSO10 obtenido con la herramienta RAST, se generó una nueva base de datos del tipo *target reverse*, la cual incluyó los 127 contaminantes más comunes (ej. queratina, BSA, etc.). A continuación, la identificación de los péptidos en la muestra se realizó por comparación de los datos obtenidos en el espectrómetro de masas, con la base de datos generada. En este procedimiento se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: i- tolerancia de masa del precursor: 800 ppm, ii- enzima: tripsina con especificidad completa, aceptando como máximo 2 cortes salteados por la enzima, iii- modificación fija: carbamidometilación de las cisteínas y variable: oxidación de metioninas y iv- dos modificaciones variables como máximo por péptido. Posteriormente, la identificación de proteínas se realizó utilizando los siguientes criterios: i- una tasa de 3 % falsos positivos a nivel de espectros y 2 % a nivel de péptidos, ii- 1 % a nivel de proteínas y iii- un mínimo de dos secuencias peptídicas asignadas por proteína identificada.

Las proteínas identificadas en cada condición se compararon utilizando los módulos: i- «Diagrama de Venn» para proteínas únicas, utilizando como criterio que se encuentren presentes en al menos 3 de 4 réplicas del tratamiento, pero en 0 o 1 del otro tratamiento y ii- «TFold» para proteínas de expresión diferencial mediante el conteo de espectros, considerando aquellas proteínas presentes en al menos 4 réplicas con un *p*-valor 0,05.

2. RESULTADOS

2. 1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

La extracción proteica se realizó a partir de las células cosechadas de los diferentes tratamientos a ser analizados. En primera instancia y con la finalidad de determinar si las muestras presentaban variaciones entre los tratamientos, las mismas se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 4). A partir de la visualización del gel, no se observaron diferencias en los perfiles obtenidos para cada cepa entre ambos tratamientos. Posteriormente, se calculó a partir del gel, la concentración de cada una de las muestras por densitometría (Tabla 3).

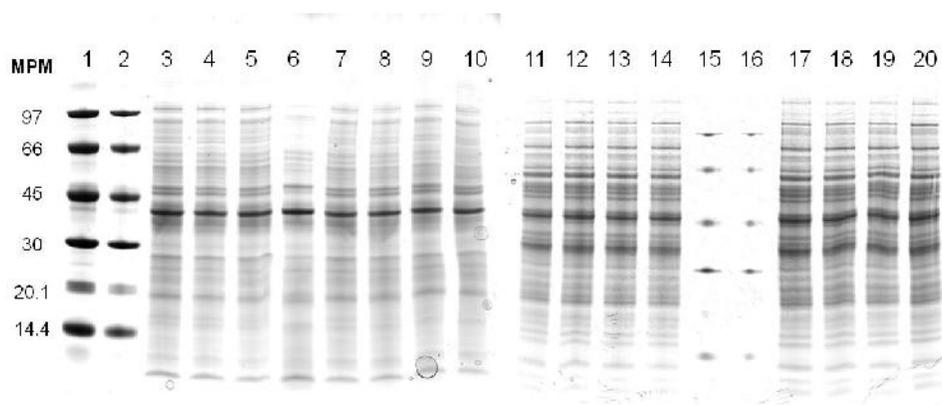


Figura 4. Visualización por SDS-PAGE de los perfiles de los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24, teñidos con Azul de Coomassie. **Carriles:** **1-** MPM: LMW General Electric, 5 µl de la solución stock; **2-** MPM 2,5 µl; **3 al 6-** Réplicas biológicas de los extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecidas en ausencia de exudados radiculares; **7 al 10-** Extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecidas en presencia de exudados radiculares; **11 al 14-** Réplicas biológicas de los extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecidas en ausencia de exudados radiculares; **15-** MPM 0,5 µl; **16-** MPM 0,25 µl; **17-20-** Extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecidas en presencia de exudados radiculares.

Tabla 3. Concentración de proteínas totales en los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24 determinada por densitometría.

Cepa	Tratamiento	Concentración proteica (µg/µl)			
		Réplicas biológicas			
		1	2	3	4
UYSO10	- exudados	8,0	5,6	6,7	4,9
	+ exudados	6,5	6,4	6,7	5,9
UYSO24	- exudados	6,2	7,8	7,5	7,0
	+ exudados	10,5	8,6	8,1	9,1

Asimismo, se evaluó la ausencia de interferencias entre las muestras marcadas y los fluoróforos a utilizar en la técnica de DIGE. Para ello se seleccionó de cada tratamiento una de las réplicas biológicas, marcándose una submuestra de 10 µg de proteínas con 80 ng de cada uno de los fluoróforos por separado, la cual se analizó por SDS-PAGE (Figura 5). Los resultados obtenidos mostraron que no existe interacción entre el fluoróforo y las muestras ya que se observó el mismo perfil proteico para cada replica ensayada con bandas de similar intensidad.

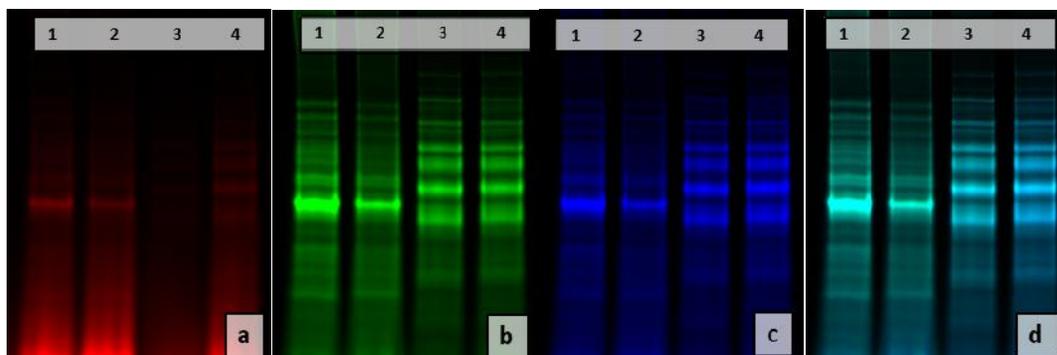


Figura 5. Visualización mediante SDS-PAGE de los perfiles de los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24 marcados con los fluoróforos Cy2 **(a)**, Cy3 **(b)** y Cy5 **(c)**. En **(d)** se observan los tres canales superpuestos. **Carriles:** 1-Extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en ausencia de exudados radiculares, réplica biológica 1 (rep-1); 2-Extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en presencia de exudados radiculares, rep-3; 3-Extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en ausencia de exudados radiculares, rep-2 y 4-Extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en presencia de exudados radiculares, rep-1. **Observaciones:** en la muestra 3 marcada con Cy2 hubo un error de pipeteado.

2. 2 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LA CEPA UYSO10 A LOS EXUDADOS RADICULARES, MEDIANTE DIGE

En las imágenes de los geles, del ensayo realizado, se puede observar la presencia de “trenes” horizontales de proteínas que representan las proteoformas o isoformas truncas, fosforiladas y/o acetiladas de cada proteína, efecto observado al aplicar este tipo de técnica (Figura 6). A partir de las imágenes obtenidas se detectaron 1950 *spots* aproximadamente, de los cuales 59 *spots* (3 %) mostraron expresión diferencial. De éstos, 34 (1,74 %) *spots* fueron sobreexpresados y 25 (1,28 %) subexpresados diferencialmente en presencia de exudados. De los 59 *spots*, 34 fueron localizados en el gel teñido con Azul de Coomassie y escindidos para su posterior identificación por MALDI-TOF/TOF. De ese subconjunto, 16 fueron identificados (Tabla 4). La confiabilidad de la identificación de las proteínas fue validada al compararse la masa y el punto isoelectrico predicho teóricamente de las proteínas identificadas, con el observado experimentalmente. A su vez, es importante resaltar que el haber

identificado proteínas con diferentes localizaciones subcelulares corrobora que la extracción de proteínas totales fue correcta.

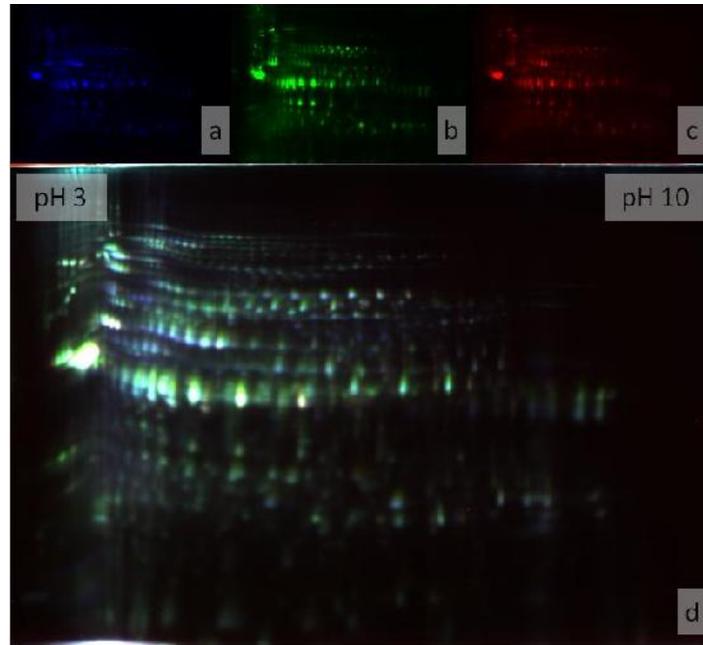


Figura 6. Análisis por DIGE de los extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en presencia y ausencia de exudados radiculares. Se muestran imágenes obtenidas para los fluoróforos Cy2 (a), Cy5 (b) y Cy3 (c), así como la superposición de los canales (d).

Globalmente, las proteínas sobreexpresadas en presencia de los exudados radiculares están asociadas con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. Mientras que las proteínas subexpresadas están relacionadas con la biogénesis de la membrana, la transducción de señales, el metabolismo de carbohidratos y la adaptación al estrés.

Dentro de las proteínas subexpresadas en presencia de exudados, se identificaron dos proteínas hipotéticas, correspondientes a la expresión de los genes *UYSO10_2343* y *UYSO10_447*. Utilizando las herramientas Psi-BLAST e InterPro, se comprobó que ambas proteínas se encuentran muy conservadas entre varias especies; particularmente, la proteína *UYSO10_447* presenta el dominio conservado DUF2589, cuya función se desconoce. Ambos casos presentaron como proteína homóloga más cercana, a proteínas hipotéticas del género *Kosakonia* (número de acceso WP_090120805, WP_043955345 respectivamente).

Tabla 4. Identidad y características generales de los *spots* con expresión diferencial por DIGE, en el proteoma de la cepa UYSO10 crecida en presencia de exudados radiculares.

Tasa de cambio	Prueba de Student (p-valor)	Gen en UYSO10	Mascot score ^a	Cobertura de la secuencia	Nº de peptidos asignados	Masa (kDa)	Punto isoeléctrico	Proteína identificada ^b	Categoría COG ^c	Ubicación celular ^d	Nombre spot
Sobreexpresado en presencia de exudados radiculares											
2,51	0,01	2424	89	14%	6	52.2	5,06	<i>Aspartate ammonia-lyase</i> (EC 4.3.1.1)	E	C	10_S1
2,21	0,00037	4917	243	17%	5	46.3	6,28	<i>Urea ABC transporter, substrate binding protein</i> Urta	E	P	10_S2
1,89	0,022	1163	324	47%	11	25.0	4,27	<i>Uncharacterized protein conserved in bacteria</i>	S	E	10_S3
1,7	0,028	744	91	14%	4	45.9	7,08	<i>Glucose-1-phosphatase</i> (EC 3.1.3.10)	S	P	10_S4
1,55	0,012	4917	233	24%	9	46.3	6,28	<i>Urea ABC transporter, substrate binding protein</i> Urta	E	P	10_S5
1,55	0,042	744	75	9%	3	45.9	7,08	<i>Glucose-1-phosphatase</i> (EC 3.1.3.10)	S	P	10_S6
1,45	0,04	1898	65	21%	7	41.1	5,08	<i>Phosphoglycerate kinase</i> (EC 2.7.2.3)	G	C	10_S7
1,45	0,045	4917	102	11%	4	46.3	6,28	<i>Urea ABC transporter, substrate binding protein</i> Urta	E	P	10_S8
Subexpresado en presencia de exudados radiculares											
1,77	0,0079	2343	47	7%	1	24.6	4,35	FIG00955836: <i>hypothetical protein</i>	J	E	10_S9
1,69	0,0063	2100	171	24%	7	32.7	8,99	<i>Maltose operon periplasmic protein</i> MalM	G	P	10_S10
1,58	0,0075	255	277	41%	14	37.3	6,12	<i>Outer membrane protein A precursor</i>	M	ME	10_S11
1,49	0,019	4794	96	14%	8	63.4	5,78	<i>Trehalase</i> (EC 3.2.1.28)	T	P	10_S12
1,37	0,025	255	549	54%	16	37.3	6,12	<i>Outer membrane protein A precursor</i>	M	ME	10_S13
1,37	0,039	2429	164	25%	12	57.3	4,85	<i>Heat shock protein 60 family chaperone</i> GroEL	O	C	10_S14
1,37	0,039	447	84	22%	5	23.2	5,06	FIG00975563: <i>hypothetical protein</i>	S	P*	10_S15
1,3	0,016	3837	454	65%	22	30.8	6,58	<i>Ribose ABC transporter system, periplasmic ribose-binding protein</i> Rbs (TC 3.A.1.2.1)	G	P	10_S16

^aTodos los *score* de Mascot reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). ^bLa anotación de las proteínas se obtuvo utilizando como base de datos el genoma de la cepa UYSO10. ^cCategorías COG: J- traducción; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; M- estructura y biogénesis de la membrana externa; T- transducción de señales; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; S- sin predicción funcional. ^dLos resultados mostrados corresponden a PSORTb, y cuando no hubo predicción o la misma no se correspondió, se reporta el resultado obtenido por Cello indicado con un “*”. ME- Membrana externa, C- citoplásmica, P- Periplasmática, E- Extracelular.

2. 3 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LA CEPA UYSO24 A LOS EXUDADOS RADICULARES, MEDIANTE DIGE

A partir del análisis de las imágenes obtenidas (Figura 7), se detectaron 2000 *spots* aproximadamente, de los cuales 36 (1,8 %) mostró expresión diferencial. De los 36 *spots*, 17 (0,85 %) fueron sobreexpresados y 19 (0,95 %) subexpresados diferencialmente en presencia de exudados. De los *spots* con expresión diferencial, 22 fueron detectados en el gel, escindidos y analizados por MALDI-TOF/TOF, de los cuales 16 fueron identificados (Tabla 5).

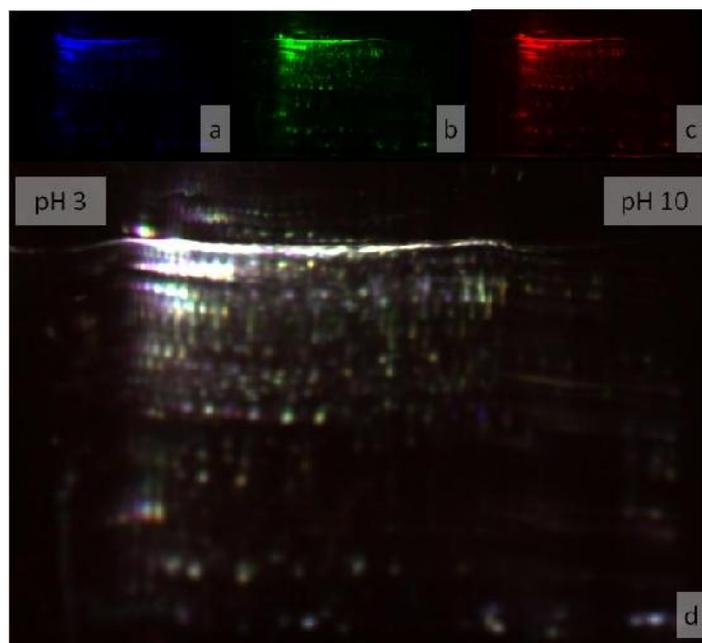


Figura 7. Análisis por DIGE de los extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en presencia y ausencia de exudados radiculares. Se muestran imágenes obtenidas para los fluoróforos Cy2 (a), Cy5 (b) y Cy3 (c), así como la superposición de los canales (d).

Globalmente, las proteínas sobreexpresadas en presencia de los exudados radiculares están asociadas a cambios en el metabolismo de carbohidratos, así como a la producción y conversión de energía (Tabla 5). Por otro lado, las proteínas subexpresadas están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, nucleótidos e iones inorgánicos y la adaptación al estrés.

En este caso, en el conjunto de *spots* expresados diferencialmente se identificaron 5 proteínas hipotéticas, de las cuales 3 fueron sobreexpresadas y 2 subexpresadas en presencia de exudados. Dentro de las proteínas hipotéticas sobreexpresadas se encuentra la proteína UYSO24_332 que presenta el dominio conservado de función desconocida DUF2076. Ésta presenta como proteína homóloga más cercana una proteína hipotética de *Agrobacterium vitis* (cobertura del 92 % y una identidad del 70 %) (WP_070164144). Por su parte, la proteína hipotética UYSO24_1785 presenta como proteína homóloga más cercana una peptidasa de la familia S9 de *Rhizobium oryzae* (57 % cobertura y 65 % identidad) (WP_085422657). En la misma, se detectó en los primeros aminoácidos (1-31), una secuencia de exportación del tipo *twin-arginine translocation* (TAT). La vía TAT permite exportar proteínas con su conformación 3D a través de la membrana citoplasmática. Por último, la proteína hipotética UYSO24_6560, se encuentra conservada en varias especies y presenta el dominio conservado de función desconocida DUF1508. En este caso, la proteína homóloga más cercana pertenece al género *Rhizobium etli* (WP_074062417) (100 % de cobertura y 89 % de identidad).

Por otro lado, dentro de las proteínas subexpresadas en presencia de exudados se encuentran las proteínas hipotéticas UYSO24_6405 y UYSO24_2803. La proteína hipotética UYSO24_6405 presenta como homólogo más cercano a la proteína hipotética de *Rhizobium* sp. CF080 (cobertura del 100 % y un 88 % de identidad) (WP_007764049). Esta proteína posee un dominio conservado perteneciente a la superfamilia SspB2 y por tanto se clasifica como una *Stringent starvation protein b*. Por su parte, la proteína UYSO24_2803 es una proteína conservada cuyo homólogo más cercano es “*NYN domain-containing protein* de *Rhizobium*” (100 % de cobertura y 96 % de identidad) (WP_085422834).

Tabla 5. Identidad y características generales de los *spots* con expresión diferencial por DIGE en el proteoma de la cepa UYSO24, crecida en presencia de exudados radiculares.

Tasa de cambio	Prueba de student (p-valor)	Gen en UYSO24	Mascot score ^a	Cobertura de secuencia	Nº de peptidos asignados	Masa (kDa)	Punto isoelectrico	Proteína identificada ^b	Categoría COG ^c	Ubicación celular ^d	Nombre del spot
Sobreexpresadas en presencia de exudados radiculares											
4,1	0,024	946	204	31%	4	20.5	6,77	<i>Ribosome recycling factor</i>	J	C	24_S1
3,47	0,006	6423	411	35%	10	38.9	9,14	<i>Acetolactate synthase small subunit</i> (EC 2.2.1.6)	E	C	24_S2
2,82	0,026	5730	160	55%	9	21.6	5,52	<i>4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase</i> (EC 4.1.3.16)/ <i>2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase</i> (EC 4.1.2.14)	G	C/P*	24_S3
2,37	0,05	959	115	27%	10	47.8	6,27	<i>Citrate synthase</i> (EC 2.3.3.1)	C	C	24_S4
1,96	0,033	332	265	66%	7	10.5	5,48	FIG00985696: <i>Hypothetical protein</i>	S	C*	24_S5
1,9	0,0091	3112	117	10%	3	23.5	10,15	MII0513 <i>protein</i> (<i>Invasion protein B</i>)	S	P*	24_S6
1,76	0,04	1785	61	11%	2	28.9	10,55	FIG00365005: <i>Hypothetical protein</i>	E	P*	24_S7
1,58	0,022	6560	155	40%	3	6.8	9	FIG00985042: <i>Hypothetical protein</i>	S	I	24_S8
Subexpresadas en presencia de exudados radiculares											
3,11	0,047	7706	68	18%	4	25.1	5,11	<i>Inositol transport system sugar-binding protein</i>	G	I	24_S9
2,42	0,038	7313	213	37%	9	23.3	5,45	<i>Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnG</i> (EC 2.7.8.37)	P	I	24_S10
2,27	0,044	619	158	24%	4	20.8	5,25	<i>Translation elongation factor P</i>	J	C*	24_S11
2,27	0,044	2683	154	25%	3	15.4	5,27	<i>Nucleoside diphosphate kinase</i> (EC 2.7.4.6)	F	E/C*	24_S11
2,18	0,041	7706	105	40%	7	25.1	5,11	<i>Inositol transport system sugar-binding protein</i>	G	I	24_S12
2,05	0,049	6405	156	22%	3	18.9	4,94	FIG01011804: <i>Hypothetical protein</i>	S	C	24_S13
1,97	0,012	5634	302	38%	5	17.9	5,54	16 kDa <i>heat shock protein A</i>	O	C	24_S14
1,84	0,022	2803	230	45%	8	21.7	5,35	FIG00344505: <i>Hypothetical protein</i>	S	C	24_S15
1,8	0,029	5737	61	8%	3	44.1	7,83	<i>Methionine ABC transporter substrate-binding protein</i>	P	MC	24_S16

^aTodos los *score* de Mascot reportados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). ^bLa anotación de las proteínas se obtuvo utilizando como base de datos el genoma de la cepa UYSO24. ^cCategorías COG: J- traducción; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; P-transporte y metabolismo de iones inorgánicos; C-producción y conversión de energía; G-transporte y metabolismo de carbohidratos; E-transporte y metabolismo de aminoácidos; F-transporte y metabolismo de nucleótidos; S-sin predicción funcional. ^dLos resultados mostrados corresponden a PSORTb, y cuando no hubo predicción o la misma no se correspondió, se reporta el resultado obtenido por Cello indicado con un “*”. MC- Membrana citoplásmica, C- citoplásmica, P- Periplasmática, E- Extracelular, I- Indeterminada.

2. 4 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LA CEPA UYSO10 A LOS EXUDADOS RADICULARES, POR NANO LC-MS/MS

Posteriormente al análisis realizado mediante la técnica de DIGE, se aplicó una estrategia del tipo *shotgun* con el fin de complementar y ampliar los resultados obtenidos. A partir de las repeticiones biológicas procesadas de la cepa UYSO10, se identificaron por un lado 623, 830, 820 y 681 proteínas en las muestras provenientes de bacterias expuestas al medio MS 1/10 sin N con exudados. Por el otro, se identificaron 992, 1020, 927 y 890 proteínas a partir de bacterias que fueron expuestas al medio MS en ausencia de exudados. Utilizando el programa *Pattern Lab* y aplicando la herramienta Buziospara el análisis de componentes principales, se puede observar que las réplicas biológicas se separan en el eje x, agrupándose según el tratamiento (presencia/ausencia de exudados) (Figura 8). Finalmente se consideraron en el análisis 897 proteínas, las cuales constituyen un 15 % de las secuencias codificantes identificadas por el programa RAST.

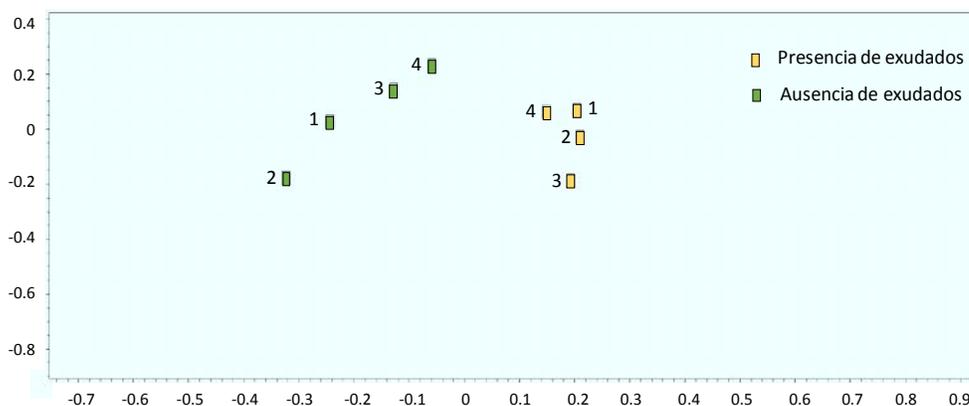


Figura 8. Análisis de principales componentes de las réplicas biológicas del proteoma de la cepa UYSO10 creciendo en presencia y ausencia de exudados.

Para el análisis de los resultados, se consideraron como proteínas expresadas **exclusivamente** en una condición, a aquellas proteínas presentes en al menos 3 de 4 réplicas biológicas y que estuviesen como máximo en 1 réplica de la otra condición. Con este criterio se identificaron 4 proteínas exclusivas en presencia de exudados y 59 en ausencia de exudados (Tablas 6 y 7).

Por otro lado, se compararon las abundancias relativas para aquellas proteínas presentes en ambos tratamientos mediante el módulo *TC Fold*. Este módulo clasifica las proteínas considerando la tasa de cambio y la significancia estadística de cada una (Figura 9). Del total de proteínas consideradas en el análisis, 835 fueron identificadas en ambas condiciones. De éstas, 125 (2,1 % del proteoma total) satisfacen los criterios considerados para las proteínas de expresión diferencial. Sin embargo, de las 125 proteínas, 75 poseen baja abundancia por lo que es necesaria su verificación experimental. En la Tabla 8 se listan las proteínas con **expresión diferencial** que no requieren verificación experimental (50 proteínas, 0,8 %). En total en presencia de exudados se sobreexpresaron 14 proteínas (0,2 %) y se reprimieron 36 proteínas (0,6 %) (Tabla 6).

Por lo tanto, si se consideran tanto las proteínas de expresión única como las que poseen expresión diferencial, observamos que en presencia de exudados se estimula la expresión 0,3 % del proteoma total y se reprime la expresión de un 1,6 % del mismo (Tabla 6), correspondiente al 2,0 y 10,6 % del proteoma expresado, respectivamente.

Tabla 6. Número de proteínas **únicas** y **sobreexpresadas**, en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas o no a exudados radiculares.

	Expresión única	Sobreexpresadas	Nº total
+ exudados	4	14	18 (0,3 %*)
- exudados	59	36	95 (1,6 %)

*Los porcentajes de proteínas expresadas se calcularon en base al número de secuencias codificantes presentes en el genoma de la cepa UYSO10.

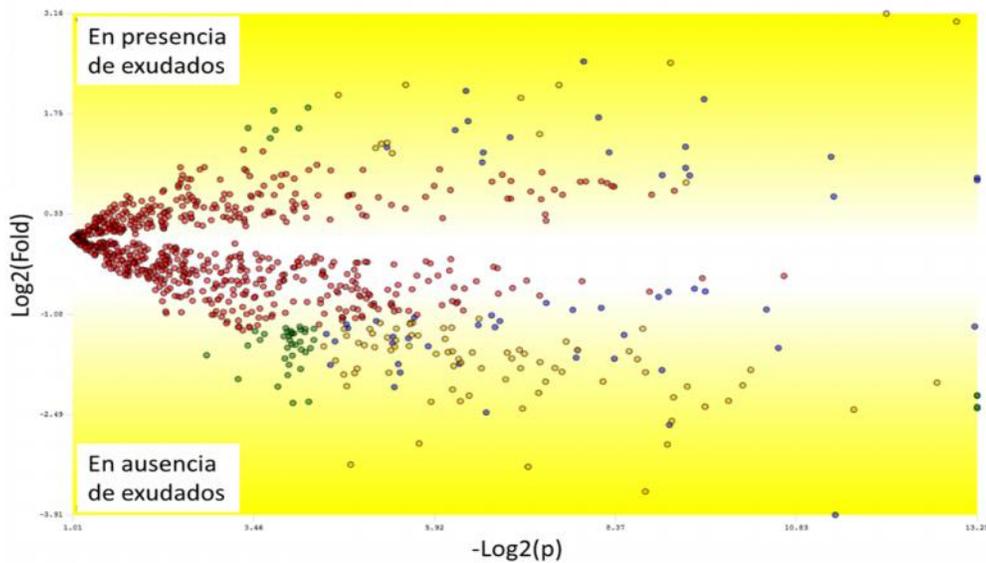


Figura 9. Diagrama de volcán mostrando las proteínas **expresadas diferencialmente** en presencia y ausencia de exudados. En el diagrama se grafica la tasa de cambio versus la significancia estadística para cada proteína. **Puntos azules y naranjas:** corresponden a proteínas que satisfacen los dos criterios, el estadístico y la tasa de cambio. En particular, las proteínas marcadas en naranja se encuentran en muy baja abundancia (bajo número de espectros), por lo cual se requiere verificación experimental. **Puntos rojos:** proteínas que no satisfacen el criterio de tasa de cambio y se detectan con el mismo nivel en ambas condiciones. **Puntos verdes:** proteínas que satisfacen el criterio de tasa de cambio, pero probablemente por azar (no satisfacen el criterio estadístico).

Mediante el uso de las herramientas PSORTB y Cello, las proteínas que mostraron un cambio de expresión (únicas o diferenciales), se clasificaron en 55 citoplasmáticas, 14 periplasmáticas, 7 de membrana externa, 19 de membrana citoplasmática, 3 como extracelulares, 3 no mostraron predicción y 11 con distinta ubicación celular (Tablas 7 y 8). Los resultados mostraron también que las principales categorías funcionales COG que cambiaron su expresión fueron transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, biogénesis y estructura de la membrana, así como la producción y conversión de energía.

En particular las proteínas que aumentaron su expresión en presencia de los exudados radiculares están asociadas a cambios en el transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, a la movilidad y quimiotaxis, a la estructura y biogénesis de la envoltura celular, al plegamiento de proteínas y funciones relacionadas; así como a la producción y conversión de energía (Figura 10).

Tabla 7. Proteínas identificadas **exclusivamente** en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas o no a exudados radiculares, detectadas mediante la aproximación *shotgun*.

Gen en UYSO10	Proteína identificada ^a	Categoría COG ^b	Nº de réplicas	Señal total ^c	Ubicación celular ^d
Únicas en presencia de exudados					
2442	<i>Fumarate reductase iron-sulfur protein</i> (EC 1.3.5.4)	C	3	24	MC/P*
56	<i>RNA polymerase-binding transcription factor</i> DksA	E	3	25	C
2100	<i>Maltose operon periplasmic protein</i> MalM	G	4	22	P
1163	<i>Uncharacterized protein conserved in bacteria</i>	S	4	23	E
Únicas en ausencia de exudados					
5340	<i>Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NAD(P)+]</i> (EC 1.2.1.16)	C	3	48	MC/C*
5747	<i>Fumarate hydratase class II</i> (EC 4.2.1.2)	C	4	35	C
4596	<i>D-lactate dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.28)	C	3	27	MC/C*
4580	<i>Bifunctional protein: zinc-containing alcohol dehydrogenase; quinone oxidoreductase (NADPH:quinone reductase)</i> (EC 1.1.1.-); <i>Similar to arginate lyase</i>	C	3	20	C
3904	<i>Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II</i> (EC 1.10.3.-)	C	4	18	MC
5423	<i>Methionine synthase II (cobalamin-independent)</i>	E	3	41	C
3618	<i>Dipeptide transport ATP-binding protein</i> DppD (TC 3.A.1.5.2)	E	4	24	MC/C*
161	<i>4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase</i> (EC 1.17.1.8)	E	4	21	C
2303	<i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i> (EC 1.5.1.20)	E	3	19	C
2115	<i>Aspartokinase</i> (EC 2.7.2.4)	E	3	19	C
3620	<i>Dipeptide transport system permease protein</i> DppB (TC 3.A.1.5.2)	E	3	17	MC
355	<i>Putrescine transport ATP-binding protein</i> PotG (TC 3.A.1.11.2)	E	3	16	MC
3298	<i>Glutamate Aspartate transport system permease protein</i> GltJ (TC 3.A.1.3.4)	E	3	16	MC
2522	<i>IMP cyclohydrolase</i> (EC 3.5.4.10) / <i>Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase</i> (EC 2.1.2.3)	F	3	31	C
2685	<i>Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> (EC 2.4.2.22)	F	3	25	C
4631	<i>1-phosphofructokinase</i> (EC 2.7.1.56)	G	4	82	C
3469	<i>Limit dextrin alpha-1,6-maltotetraose-hydrolase</i> (EC 3.2.1.196)	G	4	60	C
449	<i>Dihydroxyacetone kinase, ATP-dependent</i> (EC 2.7.1.29)	G	4	45	C*

2008	<i>Ribose ABC transport system, ATP-binding protein RbsA</i> (TC 3.A.1.2.1)	G	3	20	MC
1532	<i>Fructokinase</i> (EC 2.7.1.4)	G	3	17	MC/C*
2678	<i>Acyl-CoA dehydrogenase</i>	I	4	45	MC
5347	<i>Ribonuclease G</i>	J	3	29	C
1868	<i>Peptide chain release factor 2</i>	J	3	19	C
2173	<i>TsaC/YrdC paralog</i>	J	3	16	C
2843	<i>Fruktokinase</i>	K	3	31	C
5260	<i>Penicillin-binding protein activator LpoA</i>	L	3	22	I
2086	<i>Replicative DNA helicase (DnaB)</i> (EC 3.6.4.12)	L	3	16	C
2529	<i>NADH pyrophosphatase</i> (EC 3.6.1.22)	L	3	9	C
635	<i>Transcription-repair coupling factor</i>	L	3	29	C
4980	<i>2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase</i> (EC 2.5.1.55)	M	3	31	C
1280	<i>Translation elongation factor LepA</i>	M	4	21	MC/C*
4484	<i>Protein YeeZ</i>	M	3	21	C
3868	<i>Outer membrane porin for chitooligosaccharides ChiP</i>	M	3	20	ME*
1588	<i>Membrane-bound lytic murein transglycosylase B</i>	M	3	20	MC/P*
3300	<i>Apolipoprotein N-acyltransferase</i> (EC 2.3.1.-)	M	3	17	MC
522	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	N	3	72	MC
4774	<i>TsaB protein, required for threonylcarbamoyladenosine (t(6)A) formation in tRNA</i>	O	3	13	C*
2560	<i>Trk potassium uptake system protein TrkA</i>	P	3	31	MC/C*
1646	<i>Nitrate ABC transporter, permease protein</i>	P	3	30	MC
2793	<i>Periplasmic hemin-binding protein</i>	P	3	13	MC
2127	<i>Isocitrate dehydrogenase phosphatase</i> (EC 2.7.11.5)/ <i>kinase</i> (EC 3.1.3.-)	T	4	22	C
2547	<i>Protein translocase subunit SecE</i>	U	4	25	MC
5504	<i>Beta-lactamase</i> (EC 3.5.2.6)	V	4	21	P/ME*
5921	<i>hypothetical protein</i>	V	3	19	C
295	<i>Lipid A export permease/ATP-binding protein MsbA</i>	V	3	15	MC
263	<i>Bis-ABC ATPase Uup</i>	R	4	36	C
3801	<i>Chromate reductase</i> (EC 1.6.5.2)	R	3	36	C
3213	<i>5-methylthioribose kinase</i> (EC 2.7.1.100)	R	3	25	C
2026	<i>Acetate permease ActP (cation/acetate symporter)</i>	R	4	24	MC
4881	<i>Hydrolase, alpha/beta fold family</i>	R	4	22	P*

3832	<i>ATPase RavA</i>	R	3	16	C
1048	<i>Multimeric flavodoxin WrbA</i>	R	3	14	E
1727	<i>Hypothetical protein</i>	S	3	50	E
3716	<i>Uncharacterized protein YicH</i>	S	3	31	P
5515	<i>hypothetical protein</i>	S	3	18	MC/ME*
3571	<i>hypothetical protein</i>	S	3	17	P
4059	FIG00626109: <i>hypothetical protein</i>	S	3	16	P
222	<i>2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline (OHCU) decarboxylase (EC 4.1.1.97)</i>	S	3	14	I
5346	<i>Uncharacterized protein YhdP</i>	S	3	13	I

^aLa anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda utilizando la base de datos del genoma de la cepa UYSO10. ^bCategorías COG: J- traducción; L- replicación, recombinación y reparación; K- transcripción; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; M- estructura y biogénesis de la pared celular y de la membrana externa; N- secreción, movilidad y quimiotaxis; T-transducción de señales; P-transporte y metabolismo de iones inorgánicos; C-producción y conversión de energía; G-transporte y metabolismo de carbohidratos; E-transporte y metabolismo de aminoácidos; F-transporte y metabolismo de nucleótidos; U- tráfico intracelular y secreción; V- mecanismo de defensa; I-metabolismo lipídico; R-predicción funcional general; S-sin predicción funcional. ^cLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa. ^dLos resultados mostrados corresponden a PSORTb, y cuando no hubo predicción o la misma no se correspondió, se reporta el resultado obtenido por Cello indicado con un “*”. ME- Membrana externa, MC- Membrana citoplásmica, C- citoplásmica, P- Periplasmática, E- Extracelular, I- Indeterminada.

Tabla 8. Proteínas con **expresión diferencial** en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas a exudados radiculares, identificadas mediante la aproximación *shotgun*.

Tasa de cambio	p-valor	Gen en UYSO10	Proteína identificada ^a	Categoría COG ^b	Localización ^c
Sobreexpresadas en presencia de exudados					
1,50	0,0004	2911	<i>Cell division trigger factor (EC 5.2.1.8)</i>	O	C
1,75	0,00001	16	<i>Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase alpha chain (EC 6.4.1.2)</i>	I	C
1,79	0,00008	3822	<i>ATP synthase FO sector subunit b (EC 3.6.3.14)</i>	C	MC
2,09	0,0106	4687	<i>Chemotaxis response - phosphatase CheZ</i>	N	C
2,20	0,0004	3899	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] alpha chain (EC 6.2.1.5)</i>	C	C
2,30	0,0105	278	<i>Outer membrane porin OmpF</i>	M	ME
2,30	0,0032	3260	<i>Alkyl hydroperoxide reductase protein C (EC 1.11.1.15)</i>	O	C
2,42	0,0259	2428	<i>Heat shock protein 60 family co-chaperone GroES</i>	O	C

2,67	0,0081	2424	<i>Aspartate ammonia-lyase</i> (EC 4.3.1.1)	E	C
2,86	0,0136	3262	<i>Universal stress protein G</i>	T	C
3,12	0,0121	24	<i>Outer membrane chaperone Skp (OmpH) precursor / Outer membrane protein H precursor</i>	M	P
3,24	0,0035	2584	<i>LSU ribosomal protein L16p (L10e)</i>	J	C
3,87	0,0013	500	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase, type I</i> (EC 3.1.3.11)	G	C
4,20	0,0123	5208	<i>Aerotaxis sensor receptor protein</i>	N	MC
Subexpresadas en presencia de exudados					
6,22	0,0018	5332	<i>Outer membrane stress sensor protease DegQ, serine protease</i>	O	P
5,51	0,0102	1372	<i>Enoyl-CoA hydratase</i> (EC 4.2.1.17) / <i>Delta (3)-cis-delta (2)-trans-enoyl-CoA isomerase</i> (EC 5.3.3.8) / <i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.35) / <i>3-hydroxybutyryl-CoA epimerase</i> (EC 5.1.2.3)	I	C
5,29	0,00001	3952	<i>Excinuclease ABC subunit B</i>	L	C
4,30	0,0241	2289	<i>Outer membrane vitamin B12 receptor BtuB</i>	H	ME
3,73	0,0229	4914	<i>Allophanate hydrolase</i> (EC 3.5.1.54)	E	C
3,64	0,0019	4290	<i>Flagellar M-ring protein FliF</i>	N	MC/ME*
3,46	0,0441	4915	<i>Urea carboxylase</i> (EC 6.3.4.6)	E	C
3,43	0,0233	1167	<i>Uncharacterized protein YdcJ</i>	S	C
3,43	0,0131	718	<i>Ferrous iron transport periplasmic protein EfeO, contains peptidase-M75 domain and (frequently) cupredoxin-like domain</i>	P	P
3,26	0,0030	4985	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	N	MC
3,23	0,0044	3467	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i> (EC 2.7.7.27)	G	C
3,00	0,0043	2217	<i>Periplasmic Murein Peptide-Binding Protein MppA</i>	E	P
2,93	0,0006	5673	<i>ABC transporter periplasmic-binding protein YdcS</i>	E	P
2,89	0,0175	4794	<i>Trehalase</i> (EC 3.2.1.28) @ <i>Periplasmic trehalase</i> (EC 3.2.1.28)	G	P
2,80	0,0246	5787	<i>N-ethylmaleimide reductase</i> (EC 1. -. -. -)	C	C
2,75	0,0422	4917	<i>Urea ABC transporter, substrate binding protein UrtA</i>	E	P*
2,67	0,0211	447	FIG00975563: <i>hypothetical protein</i>	S	P*
2,63	0,0244	5325	<i>Glutamate synthase [NADPH] small chain</i> (EC 1.4.1.13)	E	C
2,58	0,0028	4750	<i>Tail-specific protease precursor</i> (EC 3.4.21.102)	M	MC
2,42	0,0374	2114	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i> (EC 5.3.1.9)	G	C
2,39	0,0094	4632	<i>Bifunctional PTS system fructose-specific transporter subunit IIA/HPr protein</i>	G	C

2,38	0,0001	3087	<i>domain of unknown function DUF1745</i>	S	C
2,35	0,0109	3911	<i>Tol-Pal system beta propeller repeat protein TolB</i>	U	P
2,33	0,0378	4683	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein IV (dipeptide chemoreceptor protein)</i>	N	MC
2,26	0,0278	2916	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PpiD (EC 5.2.1.8)</i>	O	P
2,26	0,0089	5756	<i>Adenosine deaminase (EC 3.5.4.4)</i>	F	C
2,18	0,0200	624	<i>Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NAD] (EC 1.2.1.24); Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] (EC 1.2.1.79)</i>	C	C
2,14	0,0097	5417	<i>Dipeptidyl carboxypeptidase Dcp (EC 3.4.15.5)</i>	E	C
2,02	0,0045	140	<i>LPS-assembly protein LptD</i>	M	ME
2,02	0,0007	3088	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	N	MC
1,98	0,0034	4230	<i>Outer membrane porin OmpC</i>	M	ME
1,89	0,0058	4850	<i>Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)</i>	C	C
1,78	0,0020	25	<i>Outer membrane protein assembly factor YaeT</i>	M	ME
1,70	0,0018	3084	<i>response regulator receiver modulated metal dependent phosphohydrolase</i>	T	C
1,69	0,0013	3577	<i>Oligopeptidase A (EC 3.4.24.70)</i>	E	C
1,65	0,0014	4133	<i>Long-chain fatty acid transport protein</i>	I	ME

^aLa anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda utilizando la base de datos de la cepa UYSO10. ^bCategorías COG: J-traducción; L- replicación, recombinación y reparación; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N- secreción, movilidad y quimiotaxis; T- transducción de señales; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; C- producción y conversión de energía; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; F- transporte y metabolismo de nucleótidos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; U- tráfico intracelular y secreción; S- sin predicción funcional. ^cLos resultados mostrados corresponden a PSORTb, y cuando nohubo predicción o la misma no se correspondió, se reporta el resultado obtenido por Cello indicado con un “*”. ME- Membrana externa, MC- Membrana citoplásmica, C- citoplásmica, P- Periplasmática.

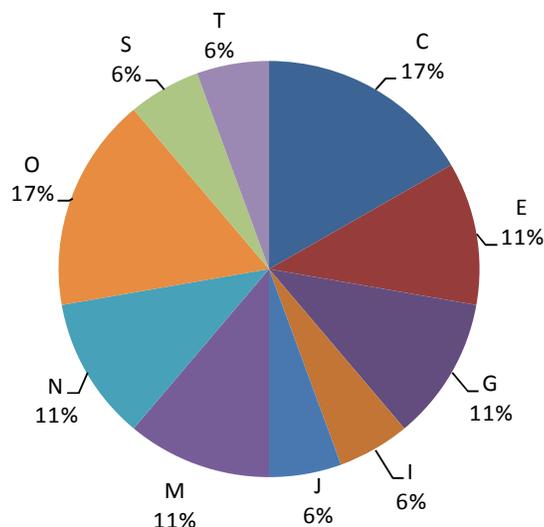


Figura 10. Clasificación en categorías funcionales COG de las proteínas presentes únicamente o sobreexpresadas en presencia de exudados (n=18). J- traducción; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; M- biogénesis y estructura de la membrana externa; N- secreción, movilidad y quimiotaxis; T- transducción de señales; C- producción y conversión de energía; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; I- metabolismo lipídico; S- sin predicción funcional.

En relación con las proteínas detectadas de función hipotética, en presencia de exudados se encuentra sobreexpresada la proteína UYSO10_1163. Esta proteína clasificada como extracelular presenta el dominio 2076 de función desconocida, pero que posiblemente posea un sensor de unión a ligando. Por otro lado, dentro de las proteínas reprimidas en presencia de exudados encontramos, una proteína citoplasmática con homología con una *histidine kinasa*, la cual presenta un dominio FIST que se cree une ligandos pequeños (UYSO10_3087) y dos proteínas con el dominio AsmA (UYSO10_3716 y UYSO10_5346), el cual ha sido sugerido como involucrado en el ensamblaje de OMPs en *E. coli*, pudiendo tener un rol en la biogénesis de LPS. A su vez se observaron reprimidas las siguientes proteínas con función desconocida: una proteína periplasmática perteneciente a la superfamilia YncE (UYSO10_4059); una proteína extracelular (UYSO10_1727), la proteína YdcJ (UYSO10_1167) que presenta un dominio de función desconocida DUF1338 y una proteína con el dominio de función desconocida DUF2589 (UYSO10_447). Cabe mencionar que las proteínas UYSO10_3571 y UYSO10_5515, son muy interesantes porque no tienen ortólogos ni homólogos.

3. DISCUSIÓN

3. 1 LOS EXUDADOS RADICULARES SON LA PRIMERA SEÑAL EN LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

Las plantas son capaces de liberar (exudar), a través de sus raíces hasta un 20 % de sus productos fotosintéticos al suelo [47, 155]. Los exudados radiculares consisten principalmente en azúcares complejos, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas extracelulares, fenoles, vitaminas y macromoléculas nitrogenadas (purinas y nucleósidos) [156]. Se asume que los compuestos presentes en los exudados radiculares sirven como fuente de C y N para las bacterias del suelo [155]. Estas fuentes de C externas al suelo influyen la estructura, diversidad y funcionalidad de la comunidad rizosférica [47].

A su vez, algunos de los compuestos exudados incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos (succinato, fumarato y malato) y compuestos aromáticos (luteonina, catecoles, acetosiringona, entre otros), inducen una quimiotaxis dependiente de flagelo en las bacterias del suelo hacia las raíces [47, 156]. Particularmente, se ha reportado la liberación de exudados en la zona de los pelos radiculares, en la zona apical, así como en los sitios de emergencia de raíces secundarias (ramificaciones) [47], siendo éstos mismos sitios los preferidos para la colonización por las bacterias rizosféricas e ingreso por las bacterias endófitas [75].

Una gran variedad de factores ambientales como la presencia de estrés biótico y abiótico (ej. la falta de algún nutriente), así como la estructura del suelo, puede modular el proceso de exudación tanto cuantitativa como cualitativamente [47, 157]. Asimismo, no se descarta que la exudación de ciertas moléculas específicas dependa en parte, del reconocimiento de señales moleculares secretadas por las bacterias en respuesta a las señales secretadas previamente por las plantas [158, 159]. En este sentido, se considera que la señalización molecular entre las bacterias y las plantas (potenciales hospederos), juega un rol fundamental en el establecimiento de interacciones benéficas y patogénicas. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes en las interacciones planta-bacteria endófitas, se encuentran poco comprendidas [47, 51].

En el capítulo II, se determinó que las cepas UYSO10 y UYSO24 utilizan una amplia variedad de fuentes de N y C, incluso las presentes en los exudados. También se describió en ambas cepas la presencia de flagelos y del movimiento tipo *swimming* que les permite a las bacterias desplazarse en función de una señal quimiotáctica. Asimismo, en ensayos de co-cultivo, se observó que las cepas en estudio colonizan las plantas de caña de azúcar micropropagadas en las zonas de mayor liberación de exudados, sugiriendo la existencia de alguna señalización entre las partes [93]

(Capítulo I). Por lo tanto, como una primera caracterización, en este capítulo se evaluó la respuesta bacteriana a la presencia de exudados radiculares en el mismo medio de cultivo donde se han realizado previamente los ensayos de interacción planta-bacteria: MS 1/10 sin N. Dicho medio de cultivo posee una baja concentración de fuente de C (sacarosa 2 g/l) y no posee fuente de N, de forma de favorecer la interacción planta-bacteria [123]. Teniendo estas características del medio en cuenta, así como los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento, podemos a priori asumir que el crecimiento en el medio MS 1/10 sin N constituye una situación de estrés para las bacterias.

3. 2 APLICACIÓN DE UNA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA GLOBAL AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

Con el desarrollo de las herramientas ómicas, se comenzaron a aplicar aproximaciones globales al estudio de la interacción planta-bacteria buscando analizar la expresión génica diferencial con el fin de caracterizar nuevos genes vinculados a la interacción planta-bacteria [77, 159–162]. En el presente trabajo se utilizaron 2 estrategias proteómicas para abordar una de las primeras etapas de la interacción: la respuesta bacteriana a los exudados radiculares.

Las proteínas están involucradas en casi todos los aspectos fisiológicos de la vida celular y en oposición al genoma que es estático, se comportan de forma dinámica, dependiendo de la célula y de su ambiente. Sin embargo, el análisis del proteoma es más difícil de descifrar y es considerado un orden de magnitud más complejo que el genoma, debido principalmente a las numerosas modificaciones o variaciones postraduccionales que las proteínas pueden presentar.

La mayoría de los estudios ómicos y en particular proteómicos han sido realizados en modelos de interacción planta-patógeno o planta-simbionte, principalmente en la interacción leguminosa-rizobio [6]. En contraposición, pocos trabajos han aplicado estas técnicas a la interacción planta-bacteria endófito [6,77, 163]. En su mayoría las aproximaciones realizadas han utilizado técnicas dependientes de gel (2D SDS-PAGE y DIGE), para abordar el estudio de la respuesta bacteriana a la asociación con la planta. Sin embargo, se han identificado muy pocas proteínas de la planta específicamente expresadas en la interacción con la bacteria. Probablemente este hecho se deba a la mayor complejidad del proteoma vegetal. Finalmente, otra característica de este tipo de aproximaciones es que difícilmente pueden aplicarse en sistemas reales, por lo tanto, se utilizan modelos de laboratorio.

Particularmente en este trabajo, el material de partida fueron extractos proteicos bacterianos obtenidos a partir de un sistema *gnotobiótico*. Nuestra aproximación presentó fortalezas y limitantes, las cuales fueron consideradas en el posterior análisis de cada experimento. Como fortalezas podemos considerar: (i) el uso de un modelo

planta-bacteria caracterizado previamente en el laboratorio, (ii) el uso del mismo medio de cultivo utilizado en otros estudios de interacción planta-bacteria. En contraposición, en la mayoría de los trabajos similares se realizó una dilución de los exudados radiculares en un medio de cultivo de crecimiento bacteriano [159, 163–165]. (iii) el uso de una cepa perteneciente al género *Rhizobium*, el cual ha sido poco estudiado como endófito a la fecha y (iv) de una cepa del género *Kosakonia*, el cual ha sido descrito recientemente y presenta varias cepas con características PCV. Si bien se han aplicado aproximaciones transcriptómicas y proteómicas utilizando la cepa *K. radicincitans* DSM16656^T, en su totalidad estos estudios han sido analizados desde el punto de vista de la planta y particularmente en interacción con la planta modelo *A. thaliana* [27, 98, 166].

Por otro lado, nuestra aproximación experimental posee principalmente las siguientes limitantes: (i) la exposición bacteriana a la presencia o no de exudados en condiciones de agitación. Esto se debe a que en la naturaleza la interacción planta-bacteria no se da en movimiento, el cual puede inhibir la formación de biopelículas, así como alterar los niveles de oxígeno afectando por ejemplo la FBN. En nuestro caso se decidió realizar el experimento en estas condiciones con el fin de que la exposición a los exudados se realice homogéneamente. (ii) el número de bacterias expuestas a la presencia de exudados radiculares es mayor a los ensayos previos descritos en los experimentos de colonización realizados en nuestro laboratorio [93] (Capítulo II), debido a que en estas condiciones las cepas se reproducen poco. Éste hecho puede eventualmente “diluir” la relación bacteria-exudado y por tanto influenciar en la capacidad de respuesta bacteriana. Sin embargo, en la casi totalidad de las aproximaciones realizadas por otros autores, el efecto de “dilución” está presente [159, 163,164].

3. 2. 1 USO DE LAS TÉCNICAS DIGE Y NANO LC-MS/MS EN NUESTROS MODELOS DE ESTUDIO

Al aplicar la técnica de DIGE se observó la presencia de “trenes” de proteínas en el gel, efecto que ha sido ampliamente reportado por otros autores en estudios similares [167–170].

Particularmente, a partir del *spot* 24_S10 se identificaron 2 proteínas. Éste hecho puede deberse a la difusión o proximidad de otras proteínas y ha sido reportado por otros autores en trabajos similares [167]. En estos casos no se pudo confirmar cuál fue la proteína que presentó una expresión diferencial, por lo cual el *spot* no fue considerado en el análisis.

Por otro lado, en este trabajo se aplicaron 2 estrategias diferentes para analizar el proteoma de la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares. Es importante resaltar que para la aplicación de ambas técnicas se partió de los mismos

extractos proteicos. Los resultados mostraron que todas las proteínas identificadas aplicando la estrategia de DIGE, fueron identificadas (como proteínas sobreexpresadas, subexpresadas o constitutivas), utilizando nano LC-MS/MS. Sin embargo, no todas las proteínas mostraron la misma tendencia de expresión en ambas aproximaciones (Tabla 9). Estas diferencias pueden deberse a que ambas técnicas analizan el proteoma de forma diferente. Por un lado, la técnica de DIGE separa las proteínas y también sus isoformas, pudiendo eventualmente identificar las modificaciones postraduccionales, sin embargo, esta técnica es poco sensible para proteínas de baja concentración. Por el otro lado, utilizando la técnica de nano LC-MS/MS se cuantifican las poblaciones totales de cada proteína (conformadas por todas las isoformas) y es sensible a identificar proteínas expresadas en menor concentración. Finalmente cabe comentar que la estrategia de DIGE tiende a subestimar la tasa de cambio observada para las proteínas debido a la señal de fondo presente en los geles.

Tabla 9. Comparación de los resultados obtenidos aplicando la técnica de DIGE y nano LC-MS/MS con conteo de espectros para la cepa UYSO10.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	Análisis por DIGE		Análisis por LC MS/MS y conteo de espectros		
		Tasa de cambio	p-valor	Expresión	Tasa de cambio	p-valor
		Sobreexpresadas en presencia de exudados				
2424	<i>Aspartate ammonia-lyase</i>	2,51	0,01	Sobreexpresada	2,66	0,0082
4917	<i>Urea ABC transporter, substrate binding protein UrtA</i>	2,21	0,00037	Subexpresada	2,75	0,042
1163	<i>Uncharacterized protein conserved in bacteria</i>	1,89	0,022	Única en presencia de exudados		
744	<i>Glucose-1-phosphatase</i>	1,7	0,028	No presenta diferencias en su expresión		
1898	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	1,45	0,04	No presenta diferencias en su expresión		
		Subexpresadas en presencia de exudados				
2343	FIG00955836: <i>hypothetical protein</i>	1,77	0,0079	No presenta diferencias en su expresión		
2100	<i>Maltose operon periplasmic protein MalM</i>	1,69	0,0063	Única en presencia de exudados		
255	<i>Outermembraneprotein A precursor</i>	1,58	0,0075	No presenta diferencias en su expresión		
4794	<i>Trehalase</i>	1,49	0,019	Subexpresada	2,88	0,017
2429	<i>Heat shock protein 60 family chaperone GroEL</i>	1,37	0,039	No presenta diferencias en su expresión		
447	FIG00975563: <i>hypothetical protein</i>	1,37	0,039	Subexpresada	2,66	0,021
3837	<i>Ribose ABC transporter system, periplasmic ribose-binding protein Rbs</i>	1,3	0,016	No presenta diferencias en su expresión		

3. 3 RESPUESTA DE LA CEPA UYSO10 A LA PRESENCIA DE EXUDADOS RADICULARES DE CAÑA DE AZÚCAR

En este análisis se integran los resultados obtenidos como resultado de la aproximación proteómica del tipo 2D-DIGE y *shotgun* para la cepa UYSO10 expuesta a los exudados radiculares de plantas de caña de azúcar micropropagadas.

3. 3. 1 TRANSPORTE Y METABOLISMO DE NUTRIENTES

Teniendo en cuenta que la cepa en estudio es una bacteria endófito, capaz de colonizar los tejidos internos de las plantas de caña de azúcar rápidamente [93] (Capítulo II), se espera que en los primeros pasos de la interacción sea capaz de captar y metabolizar los compuestos exudados por la planta ya sea como fuente nutricional o como señales.

Metabolismo del C

El análisis proteómico determinó que en ambas condiciones la cepa UYSO10 expresa de forma constitutiva proteínas asociadas al transporte y metabolización de glucosa, probablemente proveniente de la degradación de la sacarosa del medio de cultivo, así como manosa, manitol, xilosa, arabinosa, galactosa, otros azúcares sin identificar, maltosa/maltodextrin, pirimidina y alosa (Figura 11). El origen de estos transportadores no es claro, al menos en la condición sin exudados, debido a que la única fuente de C presente en el medio de cultivo es la sacarosa. Se podría especular que la expresión de dichas proteínas puede deberse a que: i) la bacteria en condiciones de estrés exprese otros transportadores en búsqueda de nuevas fuentes de C, o ii) la existencia de fuentes de C a partir de la degradación de células muertas. Esta opción es posible si se interpreta que la falta de crecimiento en estas condiciones no implica el estado estacionario de cada célula, sino que existe un recambio (crecimiento y muerte celular).

Es interesante resaltar que, en presencia de exudados, no se observa la sobreexpresión de otros transportadores que pudieran indicar el uso de una fuente de carbono diferencial presente en los mismos. Sin embargo, esta observación podría explicarse teniendo en cuenta la larga fase lag mostrada por las bacterias al crecer en este medio de cultivo (Capítulo II), o la presencia en los exudados de glucosa, o alguna de las otras fuentes de C para las cuales hay transportadores expresados (sin que lleguen a saturarlos).

Por otro lado, en ausencia de exudados, se sobreexpresan proteínas asociadas al transporte y metabolización de la fructosa, así como proteínas asociadas al transporte de acetato, ribosa y oligosacáridos (Figura 11). Una posible explicación es que en esta situación la bacteria se encuentra en una situación de estrés nutricional e intenta

encontró la enzima expresada en ninguna de las condiciones. Los asteriscos marcan que la enzima se expresó únicamente en presencia (verde) o ausencia (rojo) de exudados. Cuando una misma vía se encuentra señalada con más de una indicación, se refiere a que se observaron proteínas o subunidades con diferente tendencia. Finalmente, en recuadros grises se indica una posible función de los cambios proteicos evidenciados.

En relación con el metabolismo de los carbohidratos y su respiración, en ambas condiciones se observan expresadas de forma constitutiva las enzimas de la vía de la glucólisis, así como las enzimas que permiten la conversión de piruvato en acetil-CoA, las enzimas del ciclo de Krebs y la de las vías del ciclo del glioxilato (Figura 11 y 12). La expresión de estas vías sugiere que la bacteria en condición sin exudados posee una expresión basal del metabolismo de carbohidratos, probablemente porque se encuentra en una fase de latencia (no crece). Sin embargo, en presencia de exudados se sobreexpresan algunas enzimas, sugiriendo que la célula se encuentra activa y metabolizando carbohidratos con el fin de obtener energía y poder reductor, así como intermediarios para la biosíntesis de nuevas moléculas.

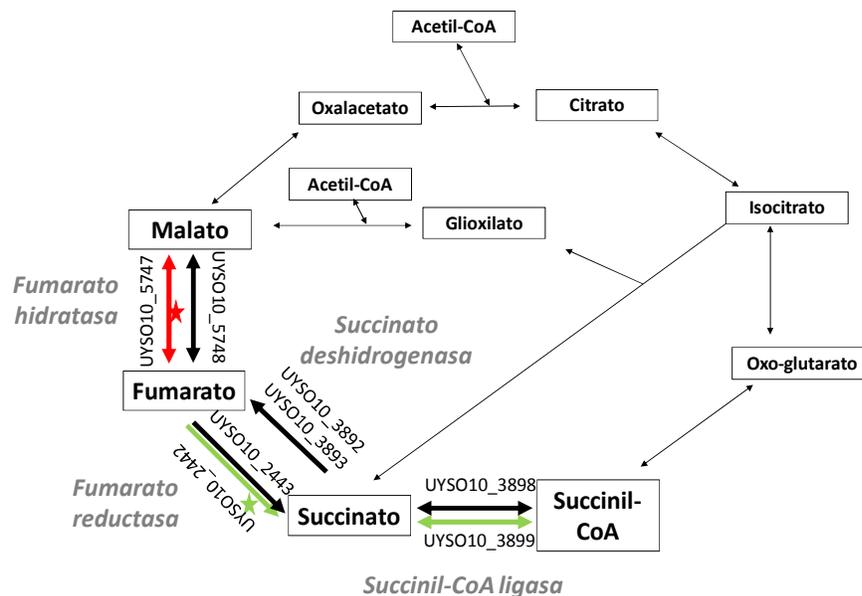


Figura 12. Representación esquemática de las enzimas y sus subunidades que cambian su expresión en el Ciclo de Krebs, identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares. Las vías marcadas con negro se encuentran expresadas de forma constitutiva, las verdes sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas. Los asteriscos marcan que la enzima se expresó únicamente en presencia (verde) o ausencia (rojo) de exudados. En los casos en que una enzima está representada por más de una flecha, se representa el análisis de cada una de las subunidades de la enzima.

En particular en el ciclo de Krebs se observaron algunos pasos con enzimas que presentaron un cambio de expresión en las condiciones evaluadas (Figura 12), sugiriendo que en presencia de exudados la cepa UYSO10 está acumulando principalmente succinato y succinil-CoA, los cuales probablemente sean utilizados como intermediarios para la síntesis de nuevas moléculas. En particular, en *G. diazotrophicus* crecida en co-cultivo con caña de azúcar se observó la expresión exclusiva de la enzima Succinil-CoA ligasa [168]. Los autores hipotetizaron que el acumulo de succinato en la célula podría asociarse a la producción de EPS y ciertos succino-glicanos, los cuales han sido reportados como participantes en el establecimiento de asociaciones bacteria-planta. Es posible, que este sea también el caso de la cepa UYSO10, la cual, a partir del censado de los exudados radiculares, produzca EPS y se prepare para la interacción con la planta. En estas condiciones también se observa la sobreexpresión de la primera enzima en la vía de biosíntesis de los ácidos grasos (Figura 11). La estimulación de esta vía podría también estar relacionada con un cambio en la membrana celular y por ende repercutir en una posible interacción con la planta.

En relación con el metabolismo energético, entre las proteínas sobreexpresadas en presencia de exudados, se observó la F1F0 ATPasa, enzima que utiliza el gradiente protón motriz generado para producir ATP. Esta enzima también se ha reportado sobreexpresada en *G. diazotrophicus* y en *Burkholderia* sp. Q208 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar [77, 162]. El aumento de esta enzima en presencia de exudados, junto con un aumento en el metabolismo de carbohidratos, sugiere una mayor producción de ATP en la célula, probablemente porque las células se encuentran creciendo (lentamente) y están activas.

Los resultados también mostraron la expresión constitutiva de la gluconeogénesis, junto con la sobreexpresión de dos de sus enzimas en presencia de exudados (Figura 11). Esta observación, junto con la represión de la síntesis de componentes estructurales como glucógeno, celulosa y sus derivados, sugiere que la cepa UYSO10 en presencia de exudados puede estar sintetizando trehalosa (Figura 11). Dado que la síntesis y almacenamiento de este disacárido puede asociarse a situaciones de estrés osmótico [172], es probable que la cepa UYSO10 detecte la presencia de la planta a partir de sus exudados preparándose para el cambio osmótico.

Metabolismo del N

A pesar de que la cepa UYSO10 es diazótrofa, no se detectó la presencia de la enzima nitrogenasa, ni en la condición con ausencia de exudados, donde no había fuente de N; ni en presencia de exudados donde posiblemente exista algún compuesto nitrogenado

exudado. Probablemente, la falta de expresión de la enzima se deba a la presencia de oxígeno en ambas condiciones, el cual es un inhibidor de su síntesis [38].

En términos generales, el análisis proteómico muestra que en presencia de exudados se reprimen proteínas vinculadas a la captación de diferentes fuentes nitrogenadas, sugiriendo que en estas condiciones la bacteria emplea preferentemente compuestos fácilmente asimilables y disponibles en los exudados (Figura 13). Este hecho concuerda con el crecimiento observado cuando se emplearon los exudados radiculares como fuente de N para la cepa UYSO10 (Capítulo II). En ese sentido, recientemente se demostró que las plantas de trigo exudan un gran número de compuestos con N orgánico, incluyendo aminoácidos, aminas y poliaminas, compuestos de amonio cuaternario, nucleobases y nucleosidos [173].

Por su parte, los transportadores de diferentes compuestos nitrogenados reprimidos en presencia de exudados están involucrados con el transporte de poliaminas del tipo putrescina, nitrato, glutamato, dipéptidos, urea, incluyendo dos enzimas necesarias para su degradación; así como enzimas involucradas en la degradación del ácido 4-aminobutanoico. La represión de dichos transportadores concuerda con estudios previos en *E. coli*, la cual al ser crecida con fuentes de N de fácil asimilación reprime los transportadores mencionados [174]. Particularmente en el caso del transportador de urea, mediante la metodología de nano LC-MS/MS, se pudo determinar que las concentraciones globales del transportador disminuyeron en presencia de exudados. Sin embargo, mediante la técnica de DIGE se observó el aumento significativo de tres de sus isoformas. La aparición de nuevas isoformas y por tanto de una modificación postraducciona, puede indicar que la proteína podría jugar un rol en la interacción. Esto también fue observado en *H. seropedicae* co-cultivada con plantas de trigo, desconociéndose específicamente su función [161] (De Souza *com. pers*).

Por otra parte, el aspartato parecería estar asociado a la fuente de N presente en los exudados. Esta observación surge de la sobreexpresión de la enzima aspartato amonio liasa y de la represión de un transportador anti-sentido de glutamato/aspartato (Figura 13). Asimismo, esto concuerda con reportes que indican que el ácido aspártico es uno de los cuatro ácidos orgánicos más abundantes presentes en el apoplasto de plantas de caña de azúcar [175], por lo que parece lógico que pueda ser una de las moléculas exudadas por la planta. Más aún, previamente se demostró que la cepa UYSO10 puede usar asparagina como fuente de N [94].

Por último, los resultados parecen indicar que en ambas situaciones la bacteria está asimilando alguna fuente de nitrato el cual es convertido en amonio, para luego ser incorporado a formas orgánicas mediante las enzimas de expresión constitutiva glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) (Figura 13). Particularmente, en bacterias crecidas en presencia de exudados se observó una disminución en la

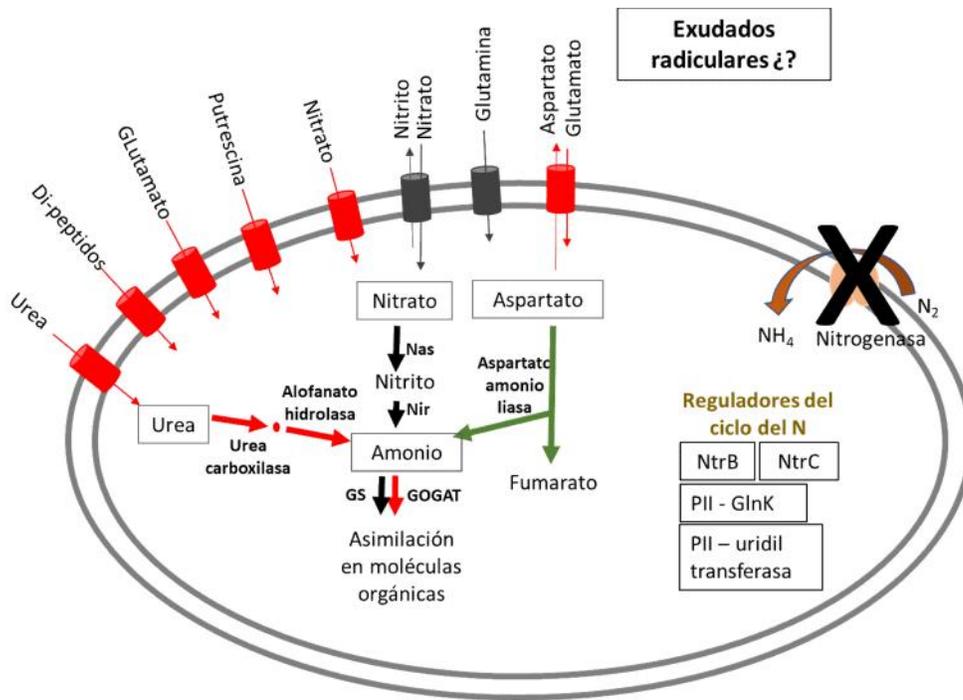


Figura 13. Análisis esquemático de las posibles fuentes de N y su metabolización, identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares. Las proteínas y vías marcadas con negro se encuentran expresadas de forma constitutiva, las verdes sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas.

expresión de una de las subunidades de la GOGAT (UYSO10_5325). Dicha enzima se encuentra vinculada a la asimilación de amonio como a la biosíntesis de glutamina, glutamato y asparagina. La disminución de la GOGAT fue también observada en *H. seropedicae* SmR1 crecida en presencia de extractos de caña de azúcar [165]. En dicho trabajo los autores hipotetizan, teniendo en cuenta otros trabajos, que la expresión de dicha enzima no está regulada por amonio sino reprimida por el glutamato presente en el extracto de caña de azúcar utilizado. Si bien se demostró la presencia de ácido glutámico en el líquido apoplástico de caña de azúcar [175], ésta no parece ser la situación de la cepa UYSO10 debido a que en presencia de exudados los transportadores de glutamato se encuentran reprimidos. Por otra parte, se ha reportado que en *R. etli* la actividad de la enzima GOGAT es mayor en vida libre que en simbiosis y que al realizar una mutante en el gen se observa un aumento en la secreción de amonio [176]. Estos antecedentes juntamente con los resultados hacen interesante la evaluación de la actividad de la enzima GOGAT en condiciones de FBN, así como la evaluación de la capacidad de la cepa UYSO10 de excretar amonio.

Otros nutrientes

Los resultados también mostraron que, en presencia de exudados se reprimen transportadores relacionados con K, hemina y un sistema de baja afinidad por Fe^{2+} . Asimismo, en estas condiciones se reprimen la expresión de proteínas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos tales como metionina, lisina y treonina y con el reciclaje de metionina. En particular la enzima MetE involucrada en la biosíntesis de metionina, también se observó reprimida cuando la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 fue crecida en presencia de exudados radiculares de remolacha [159]. En relación con todos estos nutrientes, los resultados sugieren que en los exudados deben existir compuestos fácilmente asimilables que satisfacen las demandas nutricionales.

3. 3. 2 MOVILIDAD Y QUIMIOTAXIS

Los resultados obtenidos sugieren que, en presencia de los exudados radiculares, la bacteria se encuentra en una situación más favorable donde podría asentar una población y no requiere de buscar mejores condiciones mediante su movimiento. Esta observación se desprende del hecho que en presencia de exudados se sobreexpresa la proteína de estrés universal G, asociada en *E. coli* con la formación de autoagregados y la disminución de la movilidad por *swimming* [177]; así como la proteína CheZ, cuya función es reprimir la quimiotaxis (Figura 14). A su vez, en dichas condiciones se reprimen la proteína estructural del flagelo FliF y cuatro *methyl-accepting chemotaxis proteins* (MCP).

La represión de genes vinculados a la síntesis del flagelo en bacterias asociadas a plantas ha sido postulada como una estrategia para disminuir las defensas de la planta, debido a que la flagelina es un MAMP [159, 162–164]. Sin embargo, la inhibición del flagelo no es universal, por ejemplo, en *H. seropedicae* SmR1 creciendo en presencia de extractos de caña de azúcar, se observó la sobreexpresión de la flagelina [165]. En este caso, los autores sugieren que existe una fina regulación en la síntesis del flagelo en la interacción planta-bacteria, debido a que el flagelo también ha sido asociado a la colonización vegetal y a la formación de biopelículas. En nuestro modelo, la inhibición del flagelo podría sugerir que la bacteria intenta evadir las defensas vegetales.

Por último, en presencia de exudados, se identificó sobreexpresado el receptor sensorial de la aerotaxis (AerC), el cual ha sido previamente vinculado a la interacción planta-bacteria [178, 179]. La aerotaxis implica que, frente a cambios en el metabolismo energético, la bacteria comienza a desplazarse hasta alcanzar condiciones más favorables. En particular se demostró en *A. brasilense* que niveles bajos de N aumentan la expresión del receptor AerC, el cual se asoció con la búsqueda de condiciones de microaerofilia necesarias para la FBN [179]. Éste podría ser también el caso de la cepa UYSO10, que se encuentre procurando las condiciones necesarias para realizar la FBN.

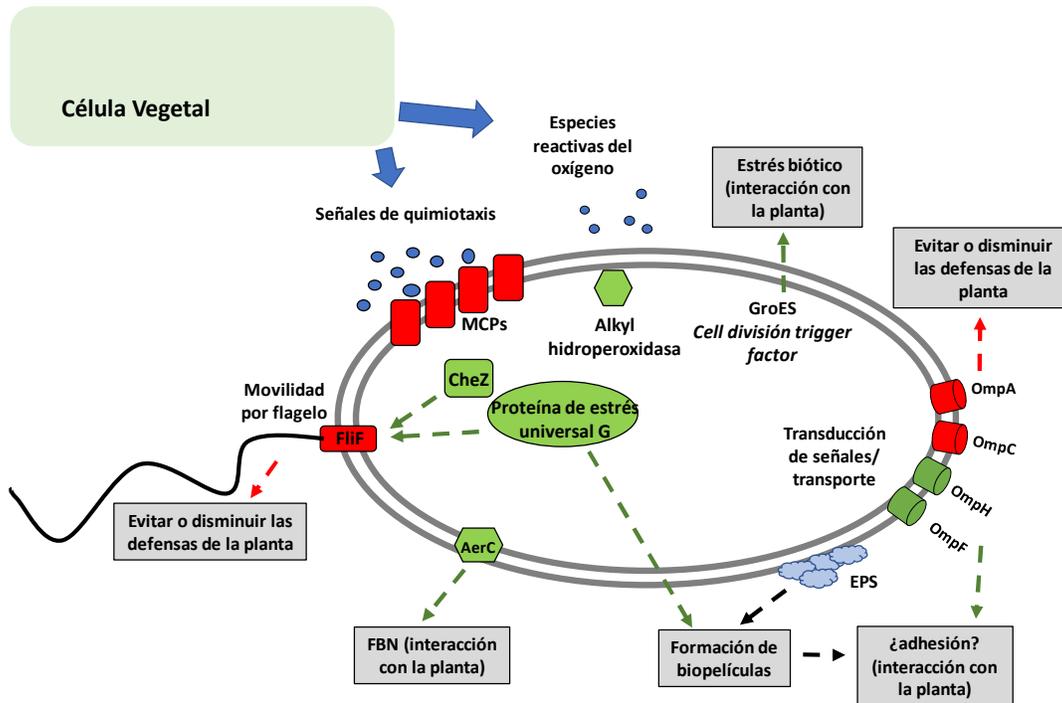


Figura 14. Ilustración de las proteínas identificadas y asociadas a la envoltura celular, transducción de señales, movilidad y adhesión en la cepa UYSO10 en presencia de exudados radiculares. Las proteínas marcadas con verde se encuentran sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas. Finalmente, en recuadros grises se indica una posible función de los cambios proteicos evidenciados.

3. 3. 3 ENVOLTURA CELULAR

Las proteínas de membrana juegan una función importante en procesos tales como la transducción de señales, el transporte de productos y sustancias, así como en la interacción celular entre otros.

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa UYSO10 presentó grandes cambios en la expresión de proteínas asociadas a la biogénesis y estructura de la envoltura celular, sugiriendo una fuerte reorganización de esta y por tanto la adaptación a la presencia de exudados radiculares (Figura 14). Posiblemente, algunos de estos cambios se asocian a una potencial interacción compatible con la planta percibida por la bacteria, los cuales han sido reportados en otras BPCV creciendo en co-cultivo con plantas [160, 161].

En presencia de exudados se identificaron sobreexpresados el canal OmpF y la chaperona OmpH. La primera ha sido identificada como una de las proteínas sobreexpresada con mayor tasa de cambio en *P. putida* cultivada en presencia de exudados de plantas de canola, sugiriéndose que está involucrada en el transporte de la molécula de ACC, o la adhesión de la bacteria a la pared celular [163]. Teniendo en cuenta que la cepa UYSO10 no posee la enzima ACC desaminasa (Capítulo II), sería interesante evaluar si OmpF esta involucrada en la adhesión a la superficie vegetal.

En cuanto a OmpH, la misma pertenece a la familia inmunogénica de porinas que permiten el pasaje de pequeñas moléculas a través de la membrana, actuando también como receptor y chaperona manteniendo la solubilidad de otras proteínas de membrana [77]. Esta proteína fue identificada sobreexpresada en la cepa *G. diazotrophicus* en co-cultivo con caña de azúcar sugiriéndose su posible rol tanto estructural como regulatorio [77].

Por otro lado, varias proteínas estructurales (OmpC, OmpA, SecE y TolB), así como asociadas a la biogénesis de la membrana (YaeT, MsbA, LpoA y proteínas asociadas a la síntesis y transporte de LPS), se encuentran reprimidas en presencia de exudados. Muchas de ellas han sido descritas como antígenos inmunogénicos por lo que su represión podría estar vinculada a evitar la activación del sistema inmune de la planta y así lograr una interacción compatible [180].

3. 3. 4 CHAPERONAS Y FUNCIONES RELACIONADAS AL ESTRÉS

Se puede considerar que tanto la interacción con el hospedero (en este caso la exposición a exudados radiculares), o la falta de nutrientes (ausencia de los exudados radiculares), constituyen fuentes de estrés bióticas y abióticas respectivamente. Por este motivo es esperable que diferentes chaperonas y proteínas vinculadas al estrés sean expresadas en cada una de las condiciones evaluadas.

En presencia de exudados se vieron sobreexpresadas dos chaperonas vinculadas al plegado de proteínas, la *Heat shock protein* GroES y la *Cell división trigger factor* (Figura 14). Particularmente GroES, suele actuar junto con la chaperona GroEL. Esta última proteína fue detectada de manera constitutiva mediante nano LC-MS/MS, mientras que en la aproximación por DIGE, se detectó significativamente disminuida en presencia de exudados. Estas observaciones sugieren que los niveles globales no cambiaron, pero sí algunas de sus isoformas. Se ha reportado para el caso de *G. diazotrophicus*, las sobreexpresiones de GroEL y GroES cuando la bacteria se crece en co-cultivo con plantas de caña de azúcar, siendo interpretado como necesarias para la condición de estrés que significa la infección de la planta [77, 168]. Asimismo, la expresión de GroEL se ha asociado en *S. meliloti* a la regulación de los genes nod [181]. Teniendo en cuenta éstos antecedentes y los resultados obtenidos, se puede especular que estas chaperonas pueden estar involucradas en una respuesta específica a la adaptación y sobrevivencia bacteriana en las condiciones de estrés biótico que supone la interacción con la planta.

También en presencia de exudados, se identificaron como reprimidas las chaperonas vinculadas al estrés: DegQ, PpiD, RavA y una aldehído deshidrogenasa. Las mismas han sido reportadas como involucradas en procesos tales como la degradación de agregados de proteínas de membrana externa plegadas erróneamente y la

metabolización de aldehídos, por lo que se podría especular que las mismas estén asociadas a la situación de estrés nutricional existente, cuando la bacteria se expone al medio MS.

Por otro lado, la respuesta general al estrés también involucra la protección frente al daño oxidativo [75]. En ese sentido, en presencia de exudados se identificó sobreexpresada una *Alkyl hydroperoxide reductase protein C* (AhpC), la cual es una oxidorreductasa involucrada en la homeostasis celular y redox (Figura 14). La sobreexpresión de esta enzima fue también observada en la cepa endófito *Burkholderia phytofirmans* creciendo endofíticamente en plantas de papa [182]. Asimismo, la expresión de diversas enzimas antioxidantes ha sido observada en cepas endófitas en condiciones de co-cultivo con sus plantas hospederas [77, 136, 168], por lo que AhpC podría actuar también en estas condiciones.

3. 4 RESPUESTA DE LA CEPA UYSO24 A LOS EXUDADOS RADICULARES DE CAÑA DE AZÚCAR

En este análisis se integran los resultados obtenidos mediante la aproximación proteómica del tipo 2D-DIGE para la cepa UYSO24 expuesta a los exudados radiculares de cañas de azúcar micropropagadas. En el caso de la cepa UYSO24 no se realizó una aproximación del tipo *shotgun*.

3. 4. 1 TRANSPORTE Y METABOLISMO DE NUTRIENTES

Los resultados obtenidos sugieren que en presencia de exudados la cepa UYSO24 adapta su proteoma para el empleo de compuestos como fuente de C y N, posiblemente presentes en los exudados. En estas condiciones la cepa está activa ya que sobreexpresó una aldolasa, la cual participa en la conversión de azúcares en energía, así como la enzima citrato sintasa del Ciclo de Krebs. Como se mencionó previamente, el Ciclo de Krebs también está activo en la cepa UYSO10 (punto 3. 3. 1), al igual que en *G. diazotrophicus* creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar donde la misma proteína mencionada también se identificó sobreexpresada [162].

Por otro lado, en presencia de exudados se reprimió la expresión de los transportadores de metionina e inositol. Una explicación a la presencia del transportador de inositol expresado en ausencia de exudados (medio MS 1/10 sin N), podría ser debido a que la cepa esté empleando como fuente de C, mio-inositol presente en el medio de cultivo.

3. 4. 2 CHAPERONAS Y FUNCIONES RELACIONADAS AL ESTRÉS

En presencia de exudados se reprimieron dos proteínas asociadas a condiciones de estrés, SspB y la proteína de shock térmico A. Las proteínas clasificadas como shock térmico responden a distintos estímulos como el frío, la luz UV, entre otros. Muchas proteínas de este grupo poseen funciones de chaperona, estabilizando las nuevas proteínas y asegurando su correcto ensamblado. Con respecto a SspB, su síntesis se estimula en situación de estrés nutricional, lo cual concuerda con la observación de que la cepa UYSO24 no crece en estas condiciones (Capítulo II). La represión de estas proteínas sugiere que la condición de crecimiento de la cepa UYSO24 en ausencia de exudados constituye una situación de estrés, probablemente nutricional.

3. 4. 3 INTERACCIÓN CON LA PLANTA

Una de las proteínas inducidas con mayor tasa de cambio en presencia de exudados fue la subunidad menor de la acetolactato sintasa. Esta enzima es la primera en la biosíntesis de leucina, valina e isoleucina, la cual, bajo condiciones limitantes de oxígeno, cataliza el primer paso para la conversión de 2 piruvatos a acetoina y 2,3-butanodiol [183]. La inducción de esta enzima se ha reportado en BPCV como *B. amyloliquefaciens* FZB42 en presencia de exudados [170]. Particularmente en las cepas *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a, se ha demostrado que la producción de acetoina y 2,3 butanodiol induce la resistencia sistémica inducida [184], postulándose también que dichos compuestos podrían modular el desarrollo radicular [33]. Asimismo, en *G. diazotrophicus*, se observó que los genes para la síntesis del 2,3 butanodiol, son expresados en presencia de sacarosa [185]. Teniendo en cuenta estos reportes, se podría especular que la producción de acetoina y 2,3 butanodiol por la cepa UYSO24, esté involucrada en alguno de los mecanismos por los cuales esta cepa promueve el crecimiento de plantas de caña de azúcar y que su inducción se realice en etapas tempranas de la interacción.

Por otro lado, en presencia de exudados se sobreexpresó la proteína asociada a la invasión, locus B (*ia/B*). Esta proteína ha sido bien caracterizada en el patógeno humano *Bartonella bacilliformis*, donde se le ha asignado un rol directo en el parasitismo de los eritrocitos, específicamente asociado a la capacidad de adhesión a los mismos [186]. Asimismo, se observó que la expresión del gen *ia/B* respondía a señales ambientales como la temperatura, pH y estrés oxidativo [187]. Posteriormente, el gen *ia/B* se ha detectado en otros Rhizobiales además de *Bartonella*, incluyendo varios géneros de rizobios [172,188], sin embargo, no se han realizado estudios funcionales en bacterias benéficas. Por lo antedicho, sería interesante estudiar el rol de esta proteína en la adhesión a las células vegetales y en la interacción planta-bacteria.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA CEPA *KOSAKONIA* SP. UYSO10 CRECIDA EN CO- CULTIVO CON PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Describir el proteoma de la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

ESTRATEGIA:

En este capítulo se buscó estudiar la siguiente etapa en la interacción entre plantas de caña de azúcar con la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10. La estrategia propuesta fue analizar el proteoma de la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con la planta hospedera en un sistema gnotobiótico, mediante una estrategia del tipo *shotgun*.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1. 1 CEPA BACTERIANA Y PLANTAS

En este capítulo se empleó la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 y plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP.

1. 2 ENSAYO BIOLÓGICO

Plantas micropropagadas en etapa de enraizamiento de la var. LCP fueron transferidas a frascos conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS 1/10 sin N y bolitas de polipropileno como soporte (4 plantas por frasco). Al tercer día los frascos que no mostraron contaminación visible fueron inoculados con 1×10^7 células “adaptadas” (Capítulo III_1. 2)/planta de la cepa UYSO10. A las 48 h pi, se cosecharon las bacterias que no se adhirieron a la planta y se encontraban en el medio de cultivo (planctónicas) (Figura 1). Las mismas, se cosecharon por centrifugación del medio de cultivo líquido a 6.000 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente y previo a la extracción proteica, las células fueron lavadas varias veces con buffer fosfato.

Para este ensayo se realizaron 4 réplicas biológicas de cada tratamiento. Debido a la baja cantidad de bacterias recuperadas por frasco, se consideró cada réplica biológica como el *pool* de las bacterias obtenidas a partir de 6 frascos (24 plantas).

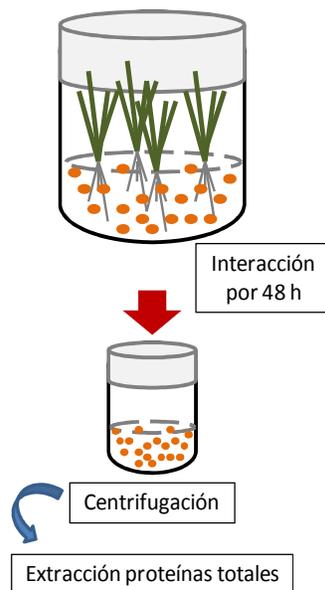


Figura 1. Estrategia experimental utilizada para estudiar el proteoma de la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

1. 3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES BACTERIANAS

La extracción de las proteínas bacterianas, así como la cuantificación y visualización de los extractos se realizó de la misma forma descrita anteriormente (Capítulo III_1. 3 y 1. 4).

A su vez, en paralelo, se cuantificó las poblaciones de la cepa UYSO10 planctónicas a partir de las cuales se realizó la extracción de proteínas totales. La cuantificación se realizó mediante recuento de ufc utilizando el método de la gota. Para ello en placas conteniendo medio rico LB Amp_{100µM}, se plaqueron por triplicado 20 µl de las diluciones -1 hasta -6.

1. 4 ANÁLISIS PROTEÓMICO POR NANO LC-MS/MS Y CONTEO DE ESPECTROS

La preparación de las muestras, así como el análisis por espectrometría de masas, el posterior uso del programa PatternLab y análisis de las proteínas identificadas se realizó como fue descrito en el Capítulo III_1. 6.

1. 5 OTRAS DETERMINACIONES

Luego de las 48 h de la interacción planta-bacteria, se realizaron medidas de la concentración de amonio, nitratos, nitritos y pH en el medio de cultivo MS 1/10 sin N. La medida de amonio se realizó utilizando el electrodo selectivo de iones amonio (Thermo Scientific Orion), siguiendo las instrucciones del fabricante (límite de detección 0,01 mM). Por otro lado, la concentración de nitratos y nitritos se determinó utilizando tiras reactivas Quantofix (detección 10-500 mg/l nitrato y 1-80 mg/l nitrito). Finalmente, se realizaron medidas de pH a partir del medio de cultivo filtrado, utilizando un pH-metro marca Oakton siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las caracterizaciones se realizaron por triplicado.

2. RESULTADOS

2. 1 PROTEOMA DE LA CEPA UYSO10 EN CO-CULTIVO CON PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

Con el objetivo de cuantificar las poblaciones bacterianas a partir de las cuales se realizó la extracción proteica, se realizó un ensayo de recuento en placa de las bacterias planctónicas. A partir de los resultados se calculó que la población planctónica media es de $1,6 \times 10^6$ ufc/muestra (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de las poblaciones planctónicas de la cepa UYSO10 en el experimento de interacción con plantas de caña de azúcar.

Réplica	Enumeración bacteriana (ufc/muestra)
1	$9,5 \times 10^5$
2	$1,6 \times 10^6$
3	$1,3 \times 10^6$
4	$2,8 \times 10^6$

A partir de las extracciones proteicas obtenidas y procesadas por espectrometría de masas se identificaron 643, 604, 635 y 576 proteínas en cada una de las réplicas biológicas. A su vez, se evaluó en las muestras la presencia de proteínas provenientes de las plantas, empleando el proteoma del sorgo como referencia; así como de contaminantes frecuentes debido a la manipulación, como la queratina. Los resultados indicaron que las muestras poseen una baja contaminación con proteínas de provenientes de la planta, sin embargo, la contaminación con queratina no fue despreciable (Tabla 2).

A partir de las réplicas biológicas procesadas de la cepa UYSO10, se identificaron un total de 852 proteínas, las cuales constituyen un 14 % de las secuencias codificantes identificadas por el programa RAST. Se puede acceder al total de las proteínas identificadas en la condición planctónica en el link: <http://bit.ly/2xTT5A7>. De las 852 proteínas, 345 fueron identificadas en las 4 réplicas biológicas, 137 en 3 réplicas, 178 en 2 réplicas y 192 en una única réplica.

Tabla 2. Comparación del número total de espectros bacterianos detectados por réplica y tratamiento, así como el porcentaje de espectros asignados a posibles contaminaciones.

Espectros identificados	Réplicas biológicas			
	1	2	3	4
UYSO10	11759 (643) ^c	11778 (604)	11711 (635)	10322 (576)
Sorgo	45	0	18	34
Queratina	2036	2057	1899	2760
Total	13840	13835	13628	13116
% sorgo ^a	0,3	0,0	0,1	0,3
% queratina ^a	14,7	14,9	13,9	21,0

^aPara la identificación de proteínas de planta se empleó el genoma de sorgo (*Sorghum bicolor*) (Adriana Hemmerly com. pers. y Paungfoo et al 2016). ^bSobre un 100 % de espectros asignados. ^cNúmero de proteínas de UYSO10 identificadas en la muestra.

2. 2 ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA CEPA UYSO10 CRECIENDO EN CO-CULTIVO EN FORMA PLANCTÓNICA

Para el análisis se consideraron aquellas proteínas identificadas en al menos 2 réplicas biológicas (660 proteínas, 11 % del proteoma), organizándose según las siguientes categorías: i) transducción de señales ambientales y movimiento (Anexo B- Tabla 1); ii) envoltura celular, transporte y adhesión (Anexo B- Tabla 2); iii) adaptación al estrés (Anexo B- Tabla 3); iv) metabolismo del C y energético (Anexo B- Tabla 4); v) metabolismo del N (Anexo B- Tabla 5); vi) promoción del crecimiento vegetal (Anexo B- Tabla 6); y vii) otras características bacterianas asociadas a la interacción con la planta (Anexo B- Tabla 7). Es de destacar que diferentes proteínas anotadas como hipotéticas o poco caracterizadas, fueron también expresadas en esta condición (Anexo B- Tabla 8).

2. 3 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS Y DETERMINACIÓN DEL PH EN LA INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

En los frascos conteniendo medio de cultivo MS 1/10 sin N y plantas de caña de azúcar micropropagadas se detectó un aumento del pH con respecto al medio de cultivo. Sin embargo, cuando se inocularon las plantas con la cepa UYSO10 (interacción durante 48 h), se observó una disminución en el pH del medio de cultivo (Tabla 3). Por otro lado, en ninguna de las condiciones evaluadas fue posible detectar en el medio de cultivo N en forma de nitrato, nitrito o amonio, con los métodos utilizados.

Tabla3. Medida de pH y fuentes de N en el medio de co-cultivo de caña de azúcar y la cepa UYSO10, a las 48 h pi.

Tratamiento	pH	Nitrato (mg/l)	Nitrito (mg/l)	Amonio (mM)
MS 1/10 sin N	5,8	< 10	< 1	ND
MS + caña de azúcar	6,4	< 10	< 1	<0,01
MS + caña de azúcar + UYSO10	5,6	< 10	< 1	<0,01

ND. No determinado

3. DISCUSIÓN

3. 1 ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA CEPA UYSO10 EN CO-CULTIVO CON PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

En este capítulo nos aproximamos al estudio de la interacción planta-bacteria analizando el proteoma expresado por la cepa UYSO10 creciendo en forma planctónica en co-cultivo con plantas de caña de azúcar. Para ello, utilizamos un sistema ya caracterizado en el laboratorio, en el cual se inocularon plantas de caña de azúcar micropropagadas var. LCP con la cepa UYSO10, dejándose interactuar por 48 h [93] (Capítulo II, III).

Para la obtención de las células plactónicas, se utilizó una metodología ampliamente reportada que es la centrifugación del medio de cultivo una vez retiradas las plantas [160, 161, 189]. En estos trabajos se realizó un estudio transcriptómico de la cepa *H. seropedicae* en co-cultivo con plantas de maíz y trigo, evaluándose en las muestras la presencia de transcriptos de la planta “contaminantes”. Los resultados mostraron que los transcriptos de maíz fueron < 0,001 %, mientras que en el caso del trigo fueron entre 7,7-7,8 %. En nuestro trabajo, la contaminación de proteínas de planta fue baja, < 0,5 % en el nº de espectros asignados y la asignación de espectros a la cepa UYSO10 > 80 %, lo cual valida la estrategia empleada.

En términos generales se identificaron entre 576 y 643 proteínas que representan entre un 9,7-10,7 % del proteoma total, porcentaje menor al expresado en presencia de exudados (10,5–14 %) (Capítulo III) y menor aún al expresado en el medio MS 1/10 sin N y sin exudados (15-17 %) (Capítulo III). Estos resultados denotan una importante disminución en el proteoma expresado lo cual podría estar relacionado a una especialización del mismo a medida que se dan los diferentes pasos de la interacción con una planta hospedera. Estas observaciones también han sido realizadas en estudios transcriptómicos, así como en proteómicos de interacción planta-bacteria [161,190]. Dicha especialización podría deberse a que, al avanzar el proceso de interacción, por un lado, la oferta nutricional se simplifica (especializa) y por otro, a que la bacteria podría evitar la activación de una respuesta inmune, suprimiendo la expresión de proteínas potencialmente antigénicas y así lograr infectar los tejidos internos de la planta.

3. 1. 1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES AMBIENTALES Y MOVIMIENTO

El censado y transducción de señales es fundamental para la adaptación bacteriana a cambios ambientales. Mediante la aproximación empleada, se detectó la expresión de varias proteínas relacionadas con los mecanismos de transducción de señales,

incluyendo: proteínas MCPs, proteínas con dominios GGDEF o GGDEF y EAL, así como enzimas del tipo serina/treonina quinasas (Figura 2).

Debido a que los exudados radiculares y la rizodeposición son las principales fuentes de nutrientes para las rizobacterias, se ha propuesto que el comportamiento sensorial motil bacteriano juega un rol importante en el establecimiento de las interacciones planta-bacteria [191]. Cambios en los parámetros fisicoquímicos, así como en los nutrientes, O₂, N, luz, temperatura y aceptores alternativos de electrones, son detectados mediante quimiorreceptores conocidos como MCPs. En ese sentido, en las condiciones de estudio se detectaron diversos tipos de MCPs incluyendo de: citrato, ribosa y galactosa, serina, aspartato, dipéptidos así como varios sin clasificar. Asimismo, se identificó la proteína CheA, la cual es un regulador central de la quimiotaxis. Está proteína es una histidina quinasa que se autofosforila y puede fosforilar a la proteína CheY (no identificada), la cual interactúa con el motor flagelar, responsable del movimiento tipo *swimming* [191]. Otra proteína auxiliar expresada es CheW, cuya función es unirse a CheA y al receptor MCP. A su vez, en concordancia con la expresión de las MCPs y las proteínas relacionadas a la quimiotaxis, se encontraron expresadas varias proteínas estructurales del flagelo como flagelinas, FliF, FlgI, FliL y dos proteínas vinculadas al motor flagelar FliG y MotA. En su conjunto estos resultados sugieren que cuando la cepa UYSO10 se encuentra en co-cultivo con la planta en forma plactónica, censa distintas señales del ambiente y emplea el flagelo para alcanzar dichos estímulos.

Por otro lado, está reportado que las proteínas con dominios GGDEF o EAL se asocian a la síntesis o hidrólisis de la molécula de di-GMPc [192]. La misma es un mensajero secundario global cuyos niveles intracelulares controlan diversas funciones como la movilidad por *swarming*, virulencia, producción de exopolisacáridos y formación de biopelículas [192]. Las proteínas con estos dominios poseen usualmente otros dominios asociados, que participan en redes de transducción de señales sensoriales tales como los dominios PAS que censan el O₂ o el potencial redox y los dominios GAF que censan mono-nucleótidos o pequeñas moléculas. En conjunto estos reportes sugieren que tanto los estímulos ambientales como las señales intracelulares están involucrados en el metabolismo del di-GMPc [192]. En este sentido, en el presente estudio se identificaron dos proteínas con dominios GGDEF, una codificada por el gen *UYSO10_1616* que posee a su vez un dominio GAF, y la otra codificada por el gen *UYSO10_5937* anotada como una *diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC sensor(s)*. Es interesante resaltar que ambas proteínas fueron también identificadas en la cepa UYSO10 en forma constitutiva en presencia o ausencia de exudados, junto con otras dos proteínas con dominio GGDEF (Capítulo III). Tanto en las cepas *P. putida* como en *Azoarcus* sp. BH72 en interacción con plantas de maíz y arroz respectivamente, se detectaron proteínas con estos dominios en condiciones de co-cultivo [164, 193]. En particular, se describió en la cepa BH72 que mutantes en las

proteínas con los dominios GGDEF y GGDEF/EAL fueron menos competitivas que la cepa parental, en la colonización de las raíces de plantas de arroz [164]. Estos resultados sugieren su posible rol en la interacción planta-bacteria, siendo buenos candidatos para futuros estudios de mutagénesis.

Por otro lado, también se expresó la lipoproteína RcsF, la cual es un componente auxiliar del sistema de señalización de 2 componentes RcsDB [194] (Figura 2). RcsF transduce señales desde la superficie celular a la proteína *histidin kinase* RcsC. En particular, en *E. coli* se observó que este sistema regula el normal desarrollo de biopelículas, virulencia, así como los movimientos tipo *swimming* y *swarming* [194, 195].

Asimismo, se detectó la expresión de la proteína PpkA, una serina/treonina quinasa, componente central en la regulación postraduccional del sistema de secreción del tipo VI, necesaria para el ensamblaje y activación del mismo [196]. Una enzima con similares características ha sido descrita en la cepa *Azoarcus* sp. BH72 expresada en co-cultivo con plantas de arroz [164].

En conjunto los resultados sugieren que algunos de los componentes presentes en los exudados son posiblemente censados e influyen la transducción de señales en la cepa UYSO10, apoyando la idea de que la interacción planta-bacteria esta mediada por señales moleculares [159].

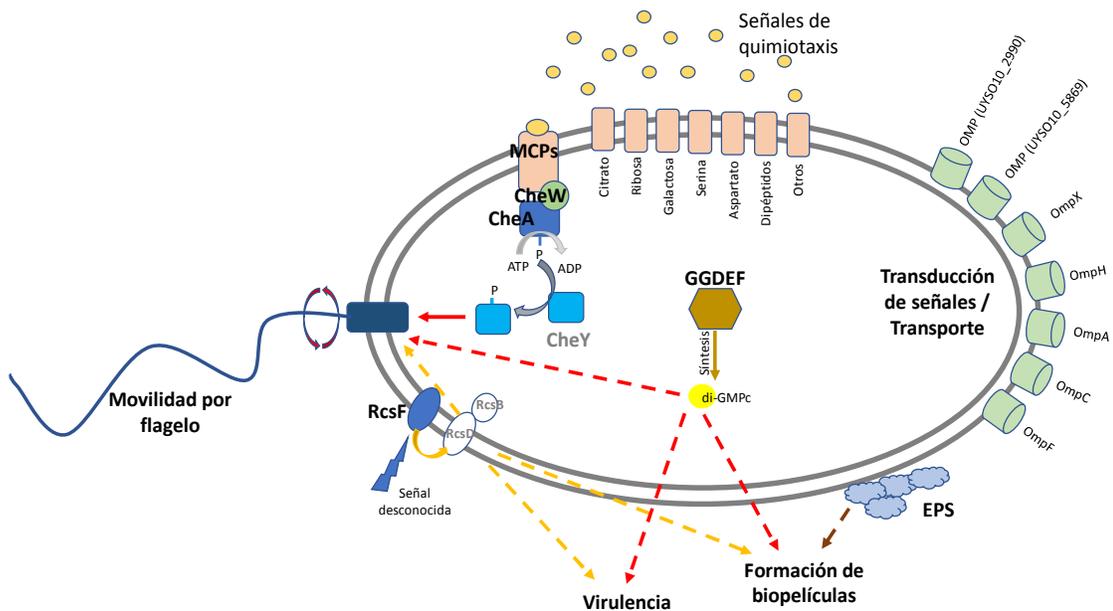


Figura 2. Ilustración de las proteínas identificadas y asociadas a la envoltura celular, transducción de señales, movilidad y adhesión en la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

3. 1. 2 ENVOLTURA CELULAR, TRANSPORTE Y ADHESIÓN

Se ha sugerido que los cambios en la envoltura celular bacteriana son fundamentales para la adaptación a nuevos ambientes. También se ha señalado que los LPS, exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares de la superficie celular juegan un rol esencial en la interacción planta-bacteria [24]. En este sentido, en el proteoma de la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con caña de azúcar en forma planctónica, se observó la expresión de proteínas asociadas a la mayoría de los componentes de la envoltura celular como proteínas de membrana, lipoproteínas (LP), LPS, peptidoglicano y varios transportadores.

Las proteínas de membrana poseen funciones importantes en las vías de transducción de señales, en el transporte, en la interacción celular, así como en la interacción con células eucariotas como puede ser la adhesión a su superficie, entre otros procesos. Con respecto a las proteínas de membrana externa se identificaron, las porinas OmpC, OmpF, OmpH y UYSO10_2990, así como una proteína estabilizadora de los canales mecanosensitivos y los precursores de las proteínas OmpX y la porina OmpA (Figura 2). Además, se identificaron proteínas involucradas en el establecimiento de las OMPs en la membrana externa, como el complejo BAM (ABCDE), el cual está involucrado en el plegado e inserción de las OMPs [197]; la chaperona Skp, la cual mantiene la solubilidad de las OMPs durante su pasaje por el periplasma; y la proteína DegQ, la cual degrada las proteínas sin plegar que se acumulan en el periplasma.

Dentro de las proteínas de membrana citoplasmática se identificaron YidC, involucrada en la inserción de proteínas en la membrana interna y la proteína YtfL, perteneciente a la familia de transportadores HlyC/CorC, así como proteínas del sistema Sec, el cual transloca proteínas a través de esta.

Por otro lado, se identificaron las siguientes lipoproteínas: el precursor de 1-fenilciclohexilpiperidina (PCP), YbjP de función desconocida, la LP estructural LolB, así como la lipoproteína Nlpl. En términos generales se ha descrito que la proteína Nlpl se asocia con cambios en la morfología bacteriana, así como con la virulencia, entre otros procesos [198]. Asimismo, se identificaron proteínas relacionadas a la síntesis, transporte y ensamblaje de los LPS.

En relación con los fosfolípidos, se identificaron la proteína MsbA, involucrada en la exportación del lípido A y posiblemente glicerofosfolípidos, las proteínas MlaA y MlaD, las cuales previenen la acumulación de fosfolípidos en la superficie celular; así como la proteína PqiB, la cual está asociada al transporte de fosfolípidos y mantenimiento de la asimetría de la membrana externa [199].

En su conjunto estos resultados muestran una gran dinámica en las estructuras de la membrana de la bacteria creciendo en co-cultivo, así como el posible rol de

componentes de la misma (ej. LPS y EPS), en la interacción planta-bacteria como ya se describió anteriormente.

En cuanto al transporte de nutrientes, en las condiciones ensayadas se identificaron proteínas relacionadas con el transporte de potasio, hierro, fosfato, sulfato y molibdeno, así como de péptidos, purinas y aminoácidos.

Por otro lado, se identificaron varios exportadores incluyendo transportadores de cobalto y metales pesados, exportadores de diversos tipos de drogas como el sistema AcrAB-TolC, así como el regulador de resistencia a multi-drogas EmrR, entre otros no definidos (UYSO10_3970, UYSO10_3065), (Figura 3). Se ha reportado que los transportadores multi-drogas pueden exportar un gran rango de sustratos incluyendo antibióticos, metales pesados, poluentes, compuestos vegetales, señales de *quorum sensing* y metabolitos bacterianos entre otros [200]. En particular, en las cepas *Azospirillum lipoferum* 4B y *H. seropedicae* SmR1, se reportó la expresión de este tipo de transportadores durante la interacción con diferentes cultivares de arroz y plantas de maíz, respectivamente [189, 201]. Mutantes de la cepa *H. seropedicae* SmR1 en el transportador de multi-drogas que mayor tasa de cambio mostraba, provocó que dicha cepa sea menos competitiva en la colonización de las raíces de maíz, postulándose que las plantas secretan diferentes compuestos bactericidas con el fin de controlar la colonización bacteriana [160]. En ese sentido, se comprobó que la cepa mutante es más sensible a los siguientes compuestos vegetales: flavonoides (naringerina, quercetina) y metabolitos del sistema inmune como ácido jasmónico y salicílico [160]. Otro caso interesante de resaltar es el del patógeno de la familia *Rosaceae*, *Erwinia amylovora*, el cual posee el transportador AcrAB que le confiere resistencia a fitoalexinas, compuestos vegetales antimicrobianos, permitiéndole así colonizar exitosamente las plantas [200]. Todos los trabajos mencionados concuerdan en que la habilidad para lidiar con compuestos tóxicos es una característica clave para sobrevivir en la rizósfera y la colonización radicular [200].

En general, varias de las proteínas asociadas a la envoltura celular expresadas en la condición en estudio, podrían participar en la interacción con la planta hospedera, ya sea facilitando la adhesión de la bacteria, transportando nutrientes o compuestos secretados por las plantas y detoxificando la célula de posibles compuestos bactericidas.

3. 1. 3 ADAPTACIÓN AL ESTRÉS

La interacción de una bacteria con su planta hospedera puede suponer un factor de estrés biótico para la misma [75,77]. En ese sentido en las condiciones ensayadas se identificaron varias proteínas asociadas al estrés como la *heat shock protein A*, la *cold protein* CspC, la proteína de estrés universal G, así como las proteínas GroEL, GroES y

HslJ. Tanto GroEL como la proteína de estrés universal G fueron también identificadas en la cepa UYSO10 como sobreexpresadas en presencia de exudados (Capítulo III), lo que reflejaría su importancia en los primeros pasos de la interacción.

Por otro lado, se identificaron las chaperonas DnaK, HtpG y Hfq. En particular, la proteína DnaK fue reportada como sobreexpresada en la cepa *G. diazotrophicus* co-cultivada con caña de azúcar [77, 168]. En cuanto a la proteína Hfq, la misma es una chaperona de ARNs pequeños, reguladores de diversos procesos biológicos incluida la respuesta fisiológica y adaptativa a la interacción planta-bacteria [202]. Por otro lado, también se detectaron la presencia de 2 proteínas asociadas al estrés nutricional, una asociada a la protección del ADN y el activador transcripcional *Stringent starvation protein A*.

Otro factor de estrés para la bacteria son las especies reactivas del oxígeno producidas por la planta frente a la percepción de un potencial patógeno. Previamente se había detectado en la cepa UYSO10 las actividades enzimáticas catalasa y superóxido dismutasa (Capítulo II). En este sentido en el proteoma de la cepa UYSO10 se identificaron las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, *Alkyl hydroperoxide reductase*, tiol peroxidasa y una tioredoxina reductasa (Figura 3). En particular, la *Alkyl hydroperoxide reductase*, codificada por el gen *UYSO10_3260* se identificó también en el proteoma de la cepa UYSO10 al ser expuesto a exudados radiculares (Capítulo III), sugiriendo un rol importante desde los estadios tempranos de la interacción planta-bacteria.

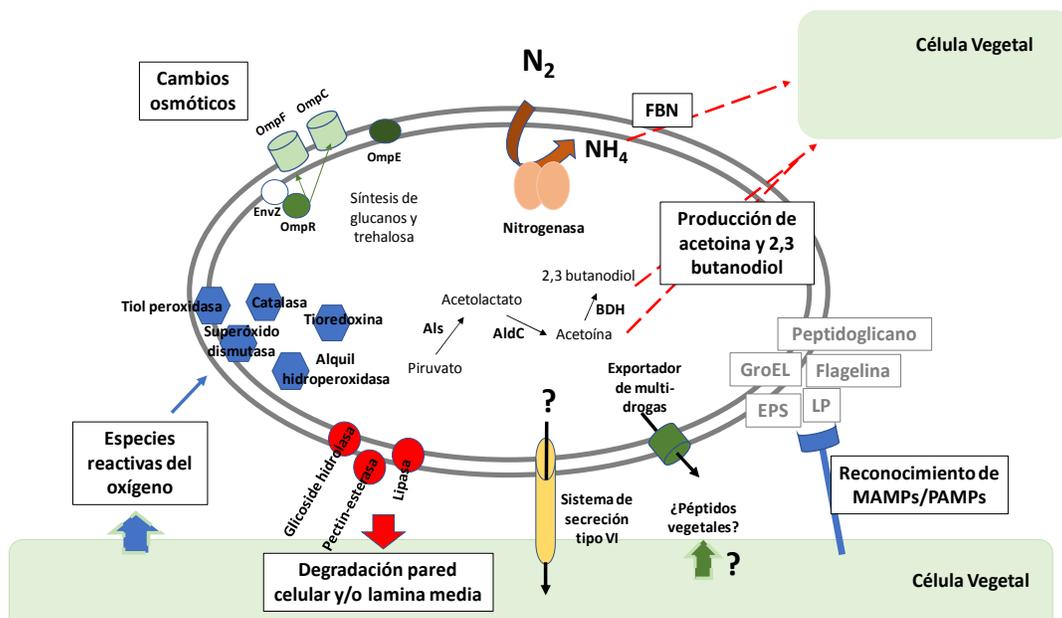


Figura 3. Ilustración de los mecanismos de la cepa UYSO10 expresados en co-cultivo y posiblemente asociados a la interacción con plantas de caña de azúcar.

Por último, la colonización de la rizósfera, así como la de los tejidos internos de la planta, implica cambios osmóticos, lo que requiere una rápida adaptación de la bacteria [161]. En este sentido en el proteoma en estudio se identificaron la lipoproteína OsmE inducible osmóticamente, así como la proteína OmpR perteneciente al sistema de 2 componentes OmpR/EnvZ [203] (Figura 3). En *E. coli* este sistema censa la osmolaridad y regula la expresión de las porinas OmpF y OmpC, las cuales también fueron identificadas. A su vez, se detectó la presencia de proteínas relacionadas con la síntesis de glucanos y trehalosa, sugiriendo que en presencia de la planta la bacteria se encuentra en un ambiente osmóticamente diferente.

3. 1. 4 TRANSPORTE Y METABOLISMO DE NUTRIENTES

Metabolismo del C

En el proteoma de la cepa UYSO10 crecida en co-cultivo se identificaron los transportadores de diversos azúcares incluyendo glucosa, fructosa, manitol, manosa, maltosa/maltodextrina y ribosa (Figura 4). En correlación con los mismos se identificaron los componentes de la vía de la glucólisis, incluyendo las que permiten metabolizar ribosa y fructosa, así como los del ciclo de Krebs. Es interesante resaltar que todos los azúcares para los cuales la cepa UYSO10 expresa transportadores, han sido reportados como componentes de los exudados radiculares de las plantas [9, 204], sugiriendo que los exudados de caña de azúcar utilizados pueden ser la fuente de dichos azúcares.

Como producto de la glucólisis y el ciclo de Krebs se producen ATP, GTP y poder reductor (NADH). En condiciones aeróbicas el NADH producido se oxida generando un gradiente transmembrana de protones. Sin embargo, según el diseño experimental utilizado en este trabajo, se espera que las condiciones sean de microaerofilia ya que los frascos conteniendo las plantas y las bacterias estaban quietos. Acorde con esta observación se identificaron las enzimas citocromo d ubiquinol oxidasa, la cual se expresa especialmente en condiciones limitantes de O₂ [205, 206], y la nitrato reductasa respiratoria, la cual utiliza nitrato como aceptor de electrones alternativo al O₂. Por otro lado, y consistentemente con la producción de un gradiente transmembrana de protones, se observó expresada la enzima F₀/F₁ sintasa responsable de convertir el gradiente de protones en ATP.

En general los resultados indican que la cepa UYSO10 transporta y metaboliza varias fuentes de azucares presentes en los exudados los cuales son respirados aeróbica como anaeróticamente.

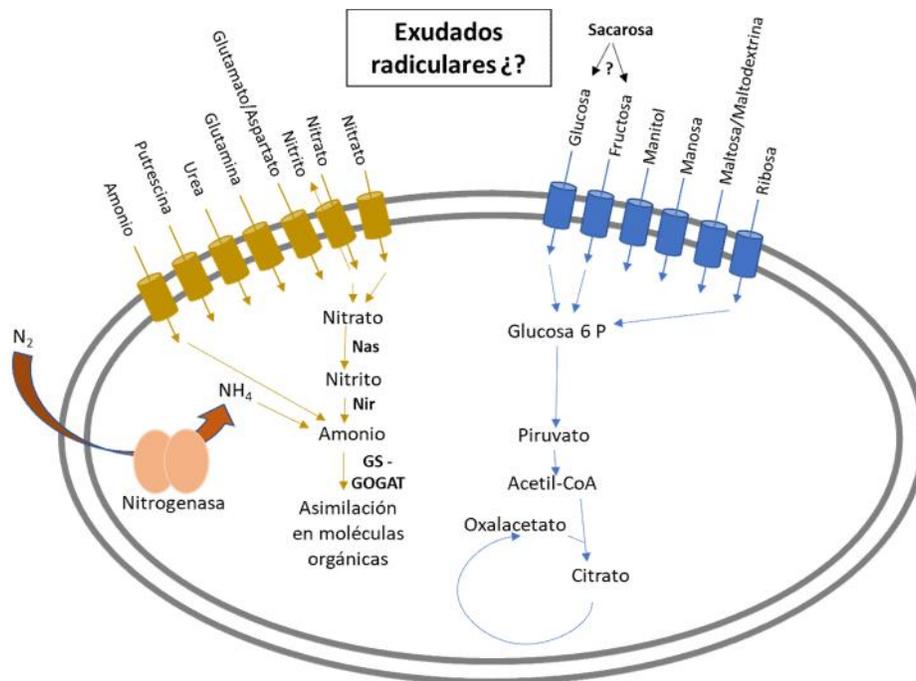


Figura 4. Ilustración del metabolismo de C y N activo en la cepa UYSO10 en co-cultivo con plantas de caña de azúcar en forma planctónica.

Metabolismo del N

En co-cultivo con plantas de caña de azúcar, en el proteoma de la cepa UYSO10 se expresan varias proteínas reguladoras del ciclo del N, incluyendo el sistema PII representado por la proteína GlnK, el sensor del contenido de N intracelular GlnD y el sistema NtrBC. Estas proteínas reguladoras controlan el transporte de compuestos nitrogenados a la célula, la FBN y la asimilación del N en moléculas orgánicas en la mayoría de las bacterias diazótrofes [207]. Asimismo, se identificaron expresados varios transportadores de compuestos nitrogenados incluyendo: de nitrato/nitrito (NarK), glutamato/aspartato, de glutamina, urea, putrescina y de amonio (Figura 4). Probablemente la expresión de dichos transportadores se deba a una respuesta general a la falta de N en el medio de cultivo [174], o tal vez en particular a la presencia de alguna fuente de N exudada por la caña de azúcar.

Todos los diazótrofes han desarrollado sistemas de regulación estricta para inhibir la FBN cuando hay N combinado disponible, o cuando se está en presencia de O₂. En varias gamma proteobacterias diazótrofes como *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas stutzeri* y *Klebsiella pneumoniae*, el sistema de dos componentes NifL/A, codificado por el operón *nifLA*, controla la expresión de todos los genes *nif*, juntamente con el factor sigma alternativo RpoN y el Integration Host factor (IHF) [207]. La proteína represora NifL en presencia de O₂ o N fijado, se une al activador NifA inactivándolo y reprimiendo

así la expresión de los genes *nif* [38]. A su vez, el operón *nif*LA se encuentra controlado por NtrC y las proteínas GlnB y GlnK, las cuales responden al estatus de N fijado. En el proteoma de la cepa UYSO10 en co-cultivo, se identificaron el regulador NifL, así como los genes estructurales de la nitrogenasa *nif*HDK y varias proteínas accesorias incluyendo NifU, NifE y la flavodoxina (Figura 4). Es interesante resaltar que dichas proteínas no fueron detectadas cuando la cepa UYSO10 fue expuesta durante 6 h a los exudados radiculares (Capítulo III). Esto puede deberse a que las condiciones experimentales de agitación de las muestras utilizadas en dicho experimento incorporaron el suficiente oxígeno en el medio de cultivo como para inhibir la FBN. Otra explicación podría ser que el tiempo de exposición (6 h) o la relación número de bacterias de la cepa UYSO10/cantidad de exudados, no haya sido adecuado para la inducción de los genes relacionados a la FBN. En general, los resultados obtenidos vinculados al metabolismo del N son similares a lo ocurrido cuando se analizó el transcriptoma de la cepa *H. seropedicae* crecida en co-cultivo con plantas de maíz y trigo, así como cuando se evaluó el proteoma de las raíces de plantas de arroz inoculadas con *H. seropedicae* [80, 160, 161].

En concordancia con la expresión de los transportadores de moléculas nitrogenadas y la expresión de la nitrogenasa, se detectaron las enzimas involucradas en la asimilación del amonio, la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT); así como las enzimas involucradas en la reducción de nitrato a amonio, la nitrato reductasa (Nas) y nitrito reductasa (Nir) (Figura 4). Estas vías también se han identificado en *H. seropedicae* creciendo en co-cultivo con plantas de maíz y trigo en forma planctónica [160, 161]. Tanto en el presente trabajo como en los citados, resulta inesperada la expresión de transportadores de nitrato, así como la reducción del mismo hacia amonio. La presencia de estas proteínas podría sugerir que es la planta quien exuda nitrato, ya que el mismo no fue agregado en el medio de cultivo. En particular, en el ensayo realizado por Balsanelli y colaboradores (2016), donde plantas de maíz fueron inoculadas con *H. seropedicae*, los autores detectaron la presencia de nitrato/nitrito, sugiriendo que los compuestos eran exudados por el maíz. Estas observaciones fueron relacionadas con una disminución del pH del medio de cultivo cuando está presente la planta y con el hecho de que en ambientes ácidos o en la presencia de amonio, el eflujo de nitrato por la planta puede ser mayor que el influjo [160, 208]. En nuestro sistema, el pH del medio de cultivo se mantuvo en co-cultivo con la cepa UYSO10 y no fue posible detectar nitrato, nitrito, ni amonio, por lo que es difícil hipotetizar de donde provienen estos compuestos nitrogenados. Asimismo, cabe resaltar que la cepa UYSO10 utiliza tanto amonio como nitrato como fuente única de N [94].

En términos generales, la descripción del proteoma muestra una situación en la cual la incorporación de N a la bacteria se da por la incorporación de compuestos nitrogenados posiblemente exudados por las plantas a través de transportadores y por la fijación de N₂ atmosférico, estando ambos procesos finamente regulados.

3. 1. 5 OTRAS CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS POSIBLEMENTE ASOCIADAS A LA INTERACCIÓN CON LA PLANTA

La translocación de proteínas a través de la membrana interna y externa se realiza a través de los sistemas de secreción, clasificándose en los de un solo paso (tipo I, tipo III, tipo IV y tipo VI), o de dos pasos, donde las proteínas son primero transportadas al periplasma vía el sistema Sec o TAT y luego exportadas (tipo II y tipo V) [209]. En particular los sistemas tipo III, IV y VI involucran la traslocación mediante “inyección” de la proteína en el citoplasma de una célula blanco. La importancia de estos sistemas en las interacciones planta-bacteria patogénica y simbióticas ha sido reportado [210]. Los sistemas del tipo III y IV son raros en bacterias endófitas [211], y si bien el sistema tipo VI, se asociaba inicialmente a patógenos, en los últimos años se ha descrito que su presencia en bacterias endófitas es bastante común, sugiriéndose un posible rol en la interacción planta-bacteria benéfica [22, 212]. El genoma de la cepa UYSO10 codifica para los sistemas de secreción tipo IV, V y VI (Beracochea en preparación). En particular, en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con caña de azúcar en forma planctónica, se identificaron varias proteínas del sistema de secreción tipo VI, el cual también se identificó expresado constitutivamente cuando la cepa se expuso a la presencia o ausencia de exudados (Capítulo III) (Figura 3). Se ha reportado que estos sistemas cumplen un doble rol, por un lado permiten a las bacterias mitigar la respuesta inmune de la planta y por otro pueden inyectar efectores tóxicos en las células bacterianas vecinas, compitiendo mejor por la colonización de los diferentes hábitats. Sin embargo, existe poca evidencia acerca del rol de estos sistemas en bacterias endófitas. En un estudio realizado en *H. seropedicae* se observó la expresión del sistema de secreción tipo VI creciendo en medio de cultivo mínimo, el cual fue reprimido en la rizósfera de maíz. Estos resultados sugieren que en esta cepa dicho sistema de secreción no posee un rol al menos en las etapas iniciales de la interacción [160]. Por otro lado, en la cepa *Azoarcus* sp. BH72 se construyó una mutante en este sistema incapaz de secretar la proteína estructural del tubo de inyección Hcp. En ensayos de competencia inoculando las cepas mutante y parental en igual proporción, se comprobó que la cepa mutada coloniza mejor las raíces de plantas de arroz, sugiriéndose que la pérdida de este sistema mejora la colonización de las plantas [164]. Otra posible interpretación sería que este sistema de secreción está involucrado en la especificidad huésped-hospedero.

Por otro lado, la presencia y expresión de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, podría ser uno de los mecanismos empleados por las bacterias endófitas para su ingreso a los tejidos internos de la planta o para su dispersión interna [75]. En ese sentido previamente se identificó en ensayos *in vitro* de la cepa UYSO10, la presencia de endoglucanasas (Capítulo II). En particular, en co-cultivo con plantas de caña de azúcar, se identificaron la expresión de diversas enzimas posiblemente involucradas en la interacción incluyendo una pectin-esterasa, una *predicted glycoside hydrolase* y una lipasa (Figura 3).

3. 1. 6 PRESENCIA DE MECANISMOS POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

En condiciones de co-cultivo se detectó en la cepa UYSO10, la expresión de dos posibles mecanismos de promoción del crecimiento vegetal: la FBN y la producción de compuestos volátiles tales como acetoina y 2,3- butanodiol (Figura 3). Es interesante marcar que estos mecanismos no fueron detectados en la cepa UYSO10 expuesta a exudados radiculares (Capítulo III). La producción de acetoina y 2,3- butanodiol implica la expresión de las siguientes enzimas identificadas en estas condiciones: acetolactato sintasa (Als), α -acetolactato carboxilasa (AldC) y la 2,3 butanodiol dehidrogenasa (BDH). Estos compuestos han sido asociados a la activación de la RSI, así como a la PCV [48, 184]. En particular, la expresión de la AlsS fue observada en *B. amyloliquefaciens* FZB42 creciendo en presencia de exudados radiculares de maíz [170].

CAPÍTULO V: CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN LOS GENES *NIFH* Y *ANFH* EN LA CEPA *KOSAKONIA* SP. UYSO10

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Estudiar el rol de la FBN en la PCV de la caña de azúcar

ESTRATEGIA:

Análisis bioinformáticos determinaron que el genoma de la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 presenta dos operones codificantes para la enzima nitrogenasa, el clásico operón *nifHDK* y el alternativo *anfHDGK* (Beracochea en preparación).

En este capítulo se plantea la construcción de mutantes en los genes estructurales *nifH* y *anfH*, así como las complementantes correspondientes y estudiar el fenotipo de las mutantes obtenidas *in vitro* e *in vivo* en interacción con la planta.

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1. 1 CEPAS Y PLÁSMIDOS

En la Tabla 1 y 2 se listan las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio. Cuando fue necesario, las cepas UYSO10 y las mutantes, así como las distintas cepas de *E. coli* empleadas, fueron cultivadas en medio de cultivo LB (Anexo A) en presencia de los antibióticos indicados toda la noche, a 30 ° y 37 °C respectivamente.

1. 2 CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA MUTANTE DERIVADA DE UYSO10 DESPROVISTA DE LOS GENES *nifH* Y *anfH*

Para la generación de cepas mutantes en los genes *nifH*, *anfH* y la doble mutante UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ o $\Delta\Delta$, se decidió eliminar completamente el marco de lectura abierto (orf) de cada uno de estos genes adaptando el método descrito por Martínez-García y de Lorenzo (2012). En este método se emplea el mecanismo de recombinación y reparación del ADN para quitar un fragmento de ADN deseado, sin dejar “cicatrices” o marcas en el genoma modificado (Figuras 1 y 2).

En un trabajo previo, empleando esta metodología se obtuvieron las cepas mutantes simples en los genes *nifH* y *anfH* [213]. En este trabajo se logró obtener la doble mutante UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$. La misma se construyó tomando como partida la cepa derivada de la mutante UYSO10 $\Delta nifH$ la cual contenía integrado a su cromosoma al plásmido pEMG- $\Delta anfH$ y como elemento extracromosomal autónomo, al plásmido codificante para la nucleasa I-SceI (pSW-2).

A continuación, se explica brevemente el método empleado para la construcción del plásmido pEMG- $\Delta anfH$. Mediante dos pasos sucesivos de PCR se amplificó un fragmento de 1000 pb correspondiente a 500 pb de las regiones corriente arriba (TS1) y corriente abajo (TS2) adyacentes al gen *anfH*. Este fragmento se clonó en el plásmido pEMG de manera que quedó flanqueado por secuencias blanco para la nucleasa I-SceI generando al plásmido recombinogénico pEMG- $\Delta anfH$ (Figura 1a). A continuación se construyó la cepa UYSO10 $\Delta nifH$ *anfH*::pEMG- $\Delta anfH$ (Figura 1b), para lo cual el plásmido se transfirió por conjugación triparental a la cepa UYSO10 $\Delta nifH$ y se indujo su integraciónal genoma por recombinación homóloga simple utilizando el antibiótico Km en el medio de cultivo para su selección (ya que pEMG no es replicable en UYSO10). Posteriormente, dicha cepa se transformó con el plásmido pSW-2 para

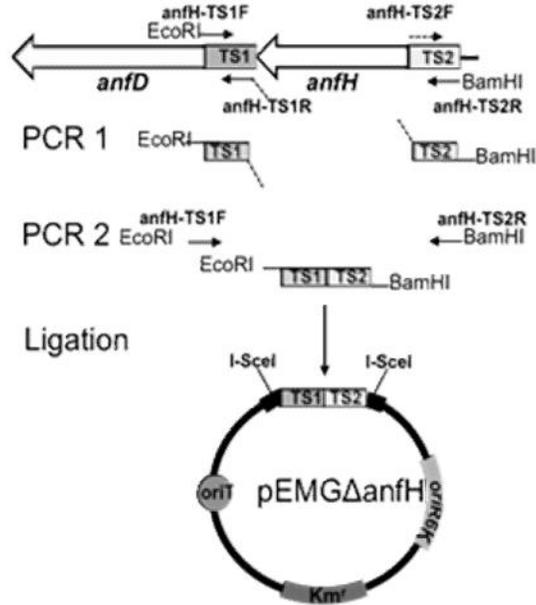
Tabla1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Resistencia a antibióticos	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i> pRK2013 (o pRK600)	Km _{50μM} , Cm _{25μM}	Cepa <i>helper</i> usada en las conjugaciones triparentales	Stock del laboratorio
<i>E. coli</i> DH5α-λ-pir	Nal _{10 μM}	Usada para el mantenimiento de plásmidos	Stock del laboratorio
<i>E. coli</i> DH5α-λ-pir pSEVA232- <i>nifH</i>	Km _{50μM}	Stock y donador del plásmido pnifH	[213]
<i>E. coli</i> DH5α-λ-pir pSEVA632- <i>anfH</i>	Gm _{10μM}	Stock y donador del plásmido panfH	[213]
UYSO10	Amp _{100μM}	Cepa parental	[89]
UYSO10 Δ <i>nifH</i>	Amp _{100μM}	Cepa mutada en el gen <i>nifH</i>	[213]
UYSO10 Δ <i>nifH</i> pnifH	Amp _{100μM} Km _{50μM}	Cepa mutada en el gen <i>nifH</i> y con gen <i>nifH</i> en trans	Este trabajo
UYSO10 Δ <i>anfH</i>	Amp _{100μM}	Cepa mutada en el gen <i>anfH</i>	[213]
UYSO10 Δ <i>anfH</i> panfH	Amp _{100μM} Gm _{10μM}	Cepa mutada en el gen <i>anfH</i> y con gen <i>anfH</i> en trans	Este trabajo
UYSO10 Δ <i>nifH anfH</i> ::pEMG-Δ <i>anfH</i> pSW-2	Amp _{100μM} Km _{50μM} Gm _{10μM}	Cepa derivada de la cepa UYSO10 Δ <i>nifH</i> , con el plásmido pSW-2 y pEMG- <i>anfH</i> integrado en el genoma	[213]
UYSO10 Δ <i>nifH</i> -Δ <i>anfH</i> (ΔΔ)	Amp _{100μM}	Cepa mutada en los genes <i>nifH</i> y <i>anfH</i> (doble mutante)	Este trabajo
UYSO10 ΔΔ pnifH	Amp _{100μM} Km _{50μM}	Doble mutante con el gen <i>nifH</i> en trans	Este trabajo
UYSO10 ΔΔ panfH	Amp _{100μM} Gm _{10μM}	Doble mutante con el gen <i>anfH</i> en trans	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencia
pRK2013	Km ^R , provee los genes <i>tra</i> necesarios para la transferencia de plásmidos conjugativos	Stock del laboratorio
pEMG	Km ^R , Ori6K (no replicable en la cepa UYSO10), LacZ α	[214]
pEMG- Δ nifH	Derivado de pEMG. Recombinable. Contiene los dos fragmentos de 500 pb, corriente arriba y corriente abajo, adyacentes al gen <i>nifH</i> .	[213]
pEMG- Δ anfH	Derivado de pEMG. Recombinable. Contiene los dos fragmentos de 500 pb, corriente arriba y corriente abajo, adyacentes al gen <i>anfH</i> .	[213]
pSW-2	Gm ^R , oriRK2 (plásmido inestable en la cepa UYSO10). Contiene al gen <i>I-sceI</i> bajo el control del promotor <i>Pm</i> , el cual se activa en presencia de 3-metil benzoato (3MB).	[214]
pSEVA232- <i>nifH</i> (pnifH)	Km ^R , pBBR1, movilizable (oriT), LacZ α . Posee clonado el gen <i>nifH</i> junto con un fragmento de 340 pb antes del inicio de la transcripción que contiene su promotor.	[213]
pSEVA632- <i>panfH</i> (panfH)	Gm ^R , pBBR1, movilizable (oriT), LacZ α . Posee clonado el gen <i>anfH</i> junto con un fragmento de 254 pb antes del inicio de la transcripción que contiene su promotor.	[213]

(a)



(b)

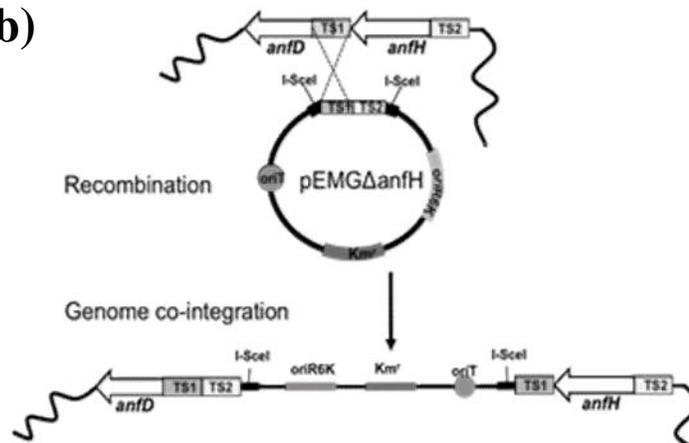


Figura 1. Aproximación empleada para la construcción de la mutante en los genes *nifH* y *anfH*, mediante el empleo del sistema I-Sce-I: construcción de la cepa UYSO10 Δ *nifH anfH*::pEMG- Δ *anfH*. **a-Obtención del plásmido pEMG- Δ *anfH*.** El plásmido pEMG- Δ *anfH* contiene los fragmentos inmediatamente adyacentes de cada lado (corriente arriba TS1 y corriente abajo TS2) al marco de lectura abierto del gen *anfH*. **b-Cointegración en el genoma.** El plásmido pEMG- Δ *anfH* es transferido mediante conjugación a la cepa UYSO10 y es obligado a recombinar mediante la selección de colonias resistentes a la Km.

obtener la cepa UYSO10 Δ *nifH anfH*::pEMG- Δ *anfH* pSW-2. El plásmido, pSW-2 (Gm^R) expresa la nucleasa I-SceI la cual reconoce y genera un corte de doble hebra en la secuencia blanco introducidas por la integración del pEMG- Δ *anfH*. Este corte induce la resolución del cointegrado que puede generar la delección del gen blanco o la reversión a la versión salvaje (Figura 2). La construcción de la cepa UYSO10 Δ *nifH anfH*::pEMG-

Δ anfH pSW-2 se realizó en el marco de un proyecto ejecutado con anterioridad en el laboratorio, por lo que en este trabajo se comenzó verificando sus características genéticas.

1. 2. 1 VERIFICACIÓN DE LA CEPA UYSO10 Δ nifH anfH::pEMG- Δ anfH pSW-2

La verificación de la cepa UYSO10 Δ nifH anfH::pEMG- Δ anfH pSW-2, se realizó mediante PCR. Para ello se verificó: (i) la ausencia del gen *nifH* (Δ nifH), (ii) la presencia del plásmido pEMG- Δ anfH cointegrado en el cromosoma (*anfH*::pEMG- Δ anfH) y (iii) la presencia del plásmido pSW-2, como se describe a continuación. En todos los casos, las reacciones de PCR se realizaron utilizando directamente como molde de ADN, colonias frescas de la cepa UYSO10 Δ nifH anfH::pEMG- Δ anfH pSW-2, crecidas en LB_{AmpKmGm}.

1. 2. 1. 1 VERIFICACIÓN DE LA AUSENCIA DEL GEN *nifH*.

Para esto se realizó una PCR utilizando los cebadores nifH-TS1F y nifH-TS2R (Tabla 3). La reacción se realizó en un volumen total de 25 μ l, conteniendo 12,5 μ l de Dream Taq Green Master Mix de Thermo Scientific, 1 μ l de cada cebador 10 μ M y 10,5 μ l de H₂O. Con la ayuda de un tip se introdujo una colonia proveniente de una placa de Petri fresca de la cepa UYSO10 Δ nifH anfH::pEMG- Δ anfH pSW-2. Como control positivo se utilizó la cepa parental UYSO10 y como control negativo no se colocó ADN en el tubo de reacción. El programa de ciclado presentó una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de una primera etapa de desnaturalización durante 1 min a 95 °C, hibridación de los cebadores durante 1 min a 57 °C y una extensión de 2 min a 72 °C. La corrida se finalizó con una extensión durante 6 min a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa 1 % (p/v) como se describió en el Capítulo II_1. 2. 3. Los tamaños de los amplicones esperados fueron de 1037 y 1934 pb, para la cepa mutante (delección del gen) y la cepa parental respectivamente.

1. 2. 1. 2 VERIFICACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pEMG-anfH.

La presencia del cointegrado se evaluó mediante la capacidad de la cepa de crecer en medio de cultivo LB conteniendo Km 50 μ g/ μ l y por amplificación por PCR utilizando los cebadores anfH-TS1F y anfH-TS2R (Tabla 3). Las condiciones de la PCR, el ciclado del termociclador, así como la visualización del amplicón fueron las mismas que los descritos en el punto anterior. Los tamaños de los amplicones esperados fueron de 1000 y 1844 pb para la cepa mutante (delección del gen) y la cepa parental respectivamente; así como la presencia de ambas bandas para la cepa con el plásmido pEMG- Δ anfH co-integrado en el cromosoma.

1. 2. 1. 3 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL PLÁSMIDO pSW-2.

La presencia del plásmido pSW-2 se evaluó mediante la capacidad de la cepa de crecer en medio de cultivo LB conteniendo Gm 10 µg/µl y por amplificación por PCR utilizando los cebadores PSW-F y PSW-R (Tabla 3). Las condiciones de la PCR, el ciclado del termociclador, así como la visualización del amplicón son los mismos que los descritos anteriormente. El tamaño del amplicón esperado fue de 500 pb.

1. 2. 2 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA NUCLEASA I_{Sec-I} Y SELECCIÓN DE LA CEPA UYSO10

ΔnifH-ΔanfH

Una vez confirmada la correcta construcción de la cepa UYSO10 *ΔnifH anfH::pEMG-ΔanfH* pSW-2, se realizó la inducción de la nucleasa I_{Sec-I} (Figura 2a). Para ello, un cultivo crecido en medio LB_{AmpKmGm} fue repicado a medio de cultivo fresco hasta alcanzar una D.O.₆₂₀ de 0,3-0,4. En ese momento se le agregó 3MB en una concentración final de 2 mM y se incubó con agitación toda la noche a 30 °C. Al otro día, una dilución del cultivo se plaqueó en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB_{Amp} de forma de obtener por placa entre 100 y 1000 ufc. Colonias al azar fueron picadas a nuevas placas: LB_{Amp} y LB_{AmpKm} y aquellas colonias que perdieron la capacidad de crecer en Km fueron sujetas a una PCR usando los cebadores anfH-TS1F y anfH-TS2R (Figura 2b), en las condiciones descriptas previamente (punto 1. 2. 1. 2).

1. 2. 3 ELIMINACIÓN DEL PLÁSMIDO pSW-2

Con el objetivo de eliminar el plásmido pSW-2 de la cepa UYSO10 *ΔnifH-ΔanfH* pSW-2, se realizaron 3 repiques sucesivos de la cepa en medio de cultivo líquido LB_{Amp}, dejando crecer cada repique en agitación durante 24 h a 30 °C. Al cabo de este tiempo, se seleccionaron colonias sensibles a la Gm y se verificó la pérdida del plásmido por PCR como fue descrito en el punto 1. 2. 1. 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Fragmento a amplificar	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
nifH-TS1F	<u>cgaattc</u> ctccattaaacgcaccggctg*	Gen <i>nifH</i> y 500 pb de cada lado	1934 para gen parental y 1037 para mutante con delección del gen	[213]
nifH-TS2R	cgggatccgatccctttggtcagcgggaacag			
anfH-TS1F	<u>gcgaattc</u> gtttgccatcccgaagggg	Gen <i>anfH</i> y 500 pb de cada lado	1844 para gen parental y 1000 para mutante con delección del gen	[213]
anfH-TS2R	cgggatccctgcgcaatggcggcaatc			
psWF	ggacgcttcgctgaaaacta	Presencia del plásmido psW-2	500	[214]
psWR	aacgtcgtgactgggaaaac			
pnifH-F	<u>gcgaattc</u> cctgtgccagctcatttatcc	Gen <i>nifH</i> y 337 pb antes	1235	[213]
pnifH-R	cgggatcctcaaaccggttttcttctgcg			
panfH-F	ggggatccttaatcgctcagaccatatttaacg	Gen <i>anfH</i> y 226 pb antes	1069	[213]
panfH-R	cgggatcccggatcgccatgaataaacac			

*Los pares de bases subrayados corresponden a la secuencia diana de las enzimas de restricción presentes en el cebador (ggatcc corresponde a BamHI, gaattc a EcoRI y ggatcc a KpnI). La presencia de estas secuencias se requiere para la construcción de las cepas mutantes.

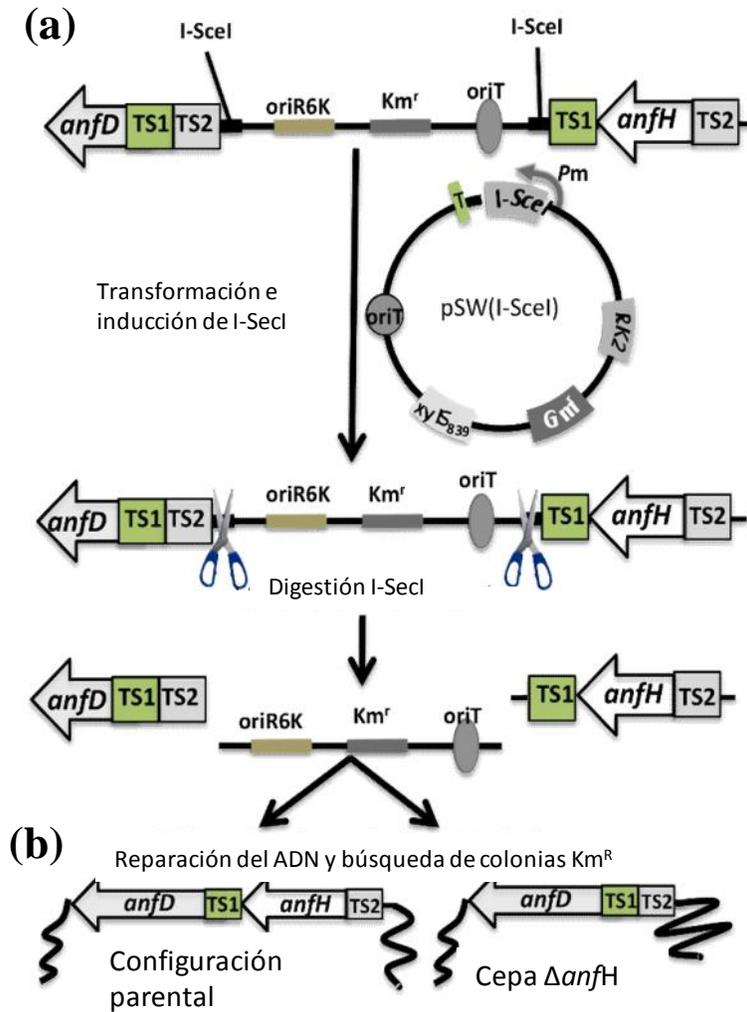


Figura 2. Aproximación empleada para la construcción de la mutante en los genes *nifH* y *anfH*, mediante el empleo del sistema I-Sce-I: inducción de la resolución del cointegrado. **a- Expresión de la nucleasa I-SceI.** Las cepas con el co-integrado son transformadas con el plásmido pSW que expresa la nucleasa I-SceI. En presencia de 3MB, se expresa la nucleasa, la cual genera dos cortes en el ADN. **b- Reparación del ADN.** La reparación del ADN ocurre por doble recombinación homóloga lo que puede regenerar el genotipo parental o inducir la mutación. Las bacterias en las cuales ocurre la mutación pierden la resistencia a la Km.

1. 3 CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES COMPLEMENTANTES DERIVADAS DE LAS CEPAS MUTANTES DESPROVISTAS DE LOS GENES *nifH* Y *anfH*

La complementación de las cepas mutantes se realizó mediante la incorporación en cada una de ellas, de los plásmidos conteniendo al gen deseado junto con su promotor nativo, los cuales fueron llamados pSEVA232-*nifH* (pnifH) y pSEVA632-*anfH* (panfH), disponibles en el laboratorio (Tabla 2). Los plásmidos se encontraban en cepas de *E. coli* y fueron movilizados a las respectivas cepas de UYSO10 mutadas, mediante

conjugación triparental utilizando como cepa *helper* a *E. coli* pRK2013 (Tabla 1). Para ello, se crecieron toda la noche las tres cepas necesarias para la conjugación: i) las cepas mutantes: UYSO10 $\Delta nifH$, UYSO10 $\Delta anfH$ o UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$, ii) *E. coli* pRK2013 y iii) las cepas donantes: *E. coli* DH5 α - λ -pir pSEVA232-*nifH* o *E. coli* DH5 α - λ -pir pSEVA632-*anfH*, según correspondiese (Tabla 4). Para realizar la conjugación, se cosecharon en un mismo tubo eppendorf, 200 μ l de cada uno de estos cultivos. En cada caso, las células se suspendieron en 50 μ l de LB líquido y se depositaron como una gota en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB. A las 24 h se suspendió una anzada de las colonias crecidas en 500 μ l de LB líquido y se sembraron 50 μ l utilizando rastrillo en una placa de LB_{AmpKm} o LB_{AmpGm}, para la complementación con los plásmidos pnifH o panfH respectivamente. Se continuó trabajando con las colonias que adquirieron la capacidad de crecer en las condiciones mencionadas.

Como controles de la conjugación, se cosecharon en diferentes tubos eppendorf células de: I) la cepa UYSO10 mutante a complementar y II) las 2 cepas de *E. coli* utilizadas en cada conjugación las cuales fueron tratadas al igual que se explicó mas arriba. En estos casos se corroboró que no hubiera crecimiento en las placas conteniendo LB_{AmpKm} o LB_{AmpGm}.

Tabla 4. Cepas utilizadas para la construcción de las cepas de UYSO10 mutantes y complementadas en los genes *nifH* y *anfH* mutados y para los controles.

Cepa de UYSO10 mutada y complementada construida	Cepas utilizadas en la conjugación triparental	Cepas utilizadas en los controles realizados
UYSO10 $\Delta nifH$ pnifH	1-UYSO10 $\Delta nifH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 3- <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA232- <i>nifH</i>	1- UYSO10 $\Delta nifH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 y <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA232- <i>nifH</i>
UYSO10 $\Delta anfH$ panfH	1-UYSO10 $\Delta anfH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 3- <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA632- <i>anfH</i>	1- UYSO10 $\Delta anfH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 y <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA632- <i>anfH</i>
UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$ pnifH	1-UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 3- <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA232- <i>nifH</i>	1- UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 y <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA232- <i>nifH</i>
UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$ panfH	1-UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 3- <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA632- <i>anfH</i>	1- UYSO10 $\Delta nifH-\Delta anfH$ 2- <i>E. coli</i> pRK2013 y <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir pSEVA632- <i>anfH</i>

La incorporación del plásmido se corroboró mediante dos reacciones de PCR empleando como molde de ADN colonias de cada cepa provenientes de placas de Petri frescas. En la primera PCR, se confirmó la presencia/ausencia de los genes *nifH* y *anfH*

parentales según la cepa mutada, usando los cebadores nifH-TS1F/TS2R o anfH-TS1F/TS2R según correspondiese. En la segunda PCR, se confirmó la presencia del gen con su promotor utilizando los cebadores: pnifH-F/R (Tabla 3), en el caso de la complementación en trans del gen *nifH* y los cebadores panfH-F/R (Tabla 3), para la complementación en trans del gen *anfH*. Para ambas PCR, la reacción, así como las condiciones del ciclado son las mismas descritas en el punto 1.2.1.1. En particular, para la segunda reacción de PCR, los amplicones esperados poseen un tamaño de 1235 pb en el caso del gen *nifH* y su promotor y de 1069 pb para *anfH* y su promotor.

1. 4 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA UYSO10 Y LAS MUTANTES OBTENIDAS

Para esto se hicieron caracterizaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. La caracterización *in vitro* de las cepas parental y mutantes, consistió en la evaluación de: 1- la capacidad de crecer en medio de cultivo LB y 2- la determinación de la actividad de la enzima nitrogenasa evaluada mediante el ensayo de reducción del acetileno (ARA por su sigla en inglés *Acetylene reduction assay*).

Por otro lado, la caracterización *in vivo* consistió en la evaluación de la respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las diferentes mutantes, en ensayos en cuarto de plantas con luz y temperatura controlada.

1. 4. 1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS EN ESTUDIO, DE CRECER EN MEDIO DE CULTIVO LB (CONDICIONES DE NO FBN)

Con el fin de evaluar si las mutaciones realizadas afectan la capacidad de las cepas de crecer en medio de cultivo LB, se realizaron curvas de crecimiento en microplacas de 96 pocillos utilizando un espectrofotómetro de placa Varioskan Flash (Thermo Scientific). Para ello, 1×10^6 células de cada una de las cepas a ensayar se inocularon en 200 μ l de medio de cultivo LB_{Amp} y se incubaron con agitación de 180 rpm durante 30s cada 19,5 min a 30 °C. El crecimiento bacteriano se registró midiendo la absorbancia a 620 nm (D.O._{620nm}) cada 2 h durante 60 h. Las curvas de crecimiento se realizaron por cuatriplicado.

1. 4. 2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA EN LAS DIFERENTES CEPAS EN ESTUDIO.

La actividad nitrogenasa se evaluó mediante el ensayo de ARA [215]. Para esto las cepas a evaluar fueron crecidas en viales conteniendo 12 ml de medio de cultivo NFCC semisólido (Anexo A) y variaciones del mismo. Las variantes evaluadas buscaron simplificar el medio de cultivo de forma que presentará una única fuente de carbono (ácido málico o sacarosa 0,5 % (p/v)), así como una única fuente de N (glutamato 0,05 mM). También se evaluaron el medio de cultivo NFCC sin modificar líquido y sin Mo, de

forma de evaluar si la presencia del Mo afecta la funcionalidad de la enzima nitrogenasa codificada por los genes *nif*. Para todas las pruebas realizadas se inocularon en el centro del vial 100 μ l de una suspensión obtenida a partir de un cultivo crecido toda la noche en medio LB_{Amp}, LB_{AmpKm} y LB_{AmpGm}, según correspondiese, conteniendo 1×10^7 o 1×10^8 células lavadas con NaCl 0,9 % (p/v). Asimismo, se evaluó el efecto del agregado o no de los antibióticos en los medios de cultivo. A los 4 días de incubación a 30 °C, el tapón de algodón del vial se cambió por uno de goma, se sustituyó el 10% del volumen atmosférico del vial por gas acetileno (1 ml) y se incubó por 72 h a 30 °C. Posteriormente, muestras de 8 μ l de la parte gaseosa de cada vial fueron inyectadas en un cromatógrafo de fase gaseosa con detector de llama ionizante (GC-Fid) (GC- 2010 Plus, Shimadzu), equipado con una columna TG-Bond (30 m x 0,32 mm ID x 10 μ m) (Thermo Scientific). Como gas transportador se empleó N₂, empleándose una temperatura de columna y de detector de 35 y 150 °C, respectivamente. Cada cepa evaluada se ensayó por quintuplicado y se empleó como control negativo viales conteniendo el medio de cultivo evaluado sin inocular.

1. 4. 3 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR A LA INOCULACIÓN CON LA CEPA PARENTAL Y LAS DIFERENTES MUTANTES

Plantas de caña de azúcar micropropagadas de la var. LCP de similar tamaño y en etapa de enraizamiento, fueron colocadas asépticamente en frascos conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS 1/10 sin N [123], a razón de cuatro por frascos. A los tres días, los frascos que no presentaron contaminación visible fueron inoculados con 1×10^7 células/planta de la cepa parental o con cada una de las mutantes [93]. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 10 réplicas por tratamiento. Diez días posteriores a la inoculación, las plantas fueron trasplantadas a macetas conteniendo 1,5 kg de tierra:arena (2:1). La tierra utilizada provino de predios de la empresa ALUR en Bella Unión, Artigas. La misma presenta la característica de poseer una tradición en plantación de caña de azúcar sin el agregado de fertilizantes. Una muestra de la mezcla utilizada fue enviada para su análisis fisicoquímico al Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de INIA La Estanzuela. Dichos análisis mostraron un bajo % de N, lo que posibilita la realización de este tipo ensayo (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis fisicoquímico del suelo utilizado en el ensayo de respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con las cepas UYSO10 parental y mutantes.

pH (H ₂ O)	pH (KCl)	N (%)	Corg (%)	N-NO ₃ (μ N/g)	N-NH ₄ (μ N/g)	Bray I (μ P/g)	K (meq/100g)	Fe (mg/kg)
6,6	6,0	0,04	0,34	7,4	1,4	7	0,05	22,0

A los 15 días posteriores a la inoculación se realizó una segunda inoculación como fue descrito previamente. Las plantas fueron mantenidas en cuarto de plantas con un fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad a 26 °C y regadas con agua de la canilla según necesidad. El ensayo se cosechó a los 4 meses pi, donde se evaluaron las variables biométricas: altura de la planta, diámetro del tallo, peso seco de la parte aérea y peso seco radicular. La parte aérea se envió para análisis de N-total por el método de Kjeldahl [216] al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía, UdelaR.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa Infostat aplicando un análisis de varianza paramétrico o no paramétrico según correspondiese, con un $p \leq 0,05$ [217]. En caso de obtenerse diferencias significativas, las medias de los tratamientos fueron comparadas usando la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis, según los datos tuviesen una distribución paramétrica o no paramétrica respectivamente.

2 RESULTADOS

2.1 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES EN LOS GENES *nifH* Y *anfH*

Mediante la estrategia empleada se obtuvo la cepa UYSO10 mutada en ambos genes *nifH* y *anfH* (UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$) (Figura 3, cuadros A y C, carril 6). A su vez se obtuvieron las cepas complementantes para cada uno de los genes eliminados por incorporación de un plásmido conteniendo los genes parentales y sus promotores: cepas UYSO10 $\Delta nifH$ pnifH, UYSO10 $\Delta anfH$ panfH, UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ pnifH y UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ panfH.

En la Figura 3 se muestran los productos de amplificación obtenidos en las PCR realizadas con el fin de confirmar cada construcción (Tabla 6): (A) detección de la presencia o la ausencia del gen *nifH*, utilizando cebadores complementarios a las regiones adyacentes del gen en la cepa parental; (B) detección de la presencia del gen *nifH* y su promotor en la cepa parental y en aquellas que portan el plásmido pnifH; (C) detección de la presencia o la ausencia del gen *anfH*, utilizando cebadores complementarios a las regiones adyacentes del gen en la cepa parental; y (D) detección de la presencia del gen *anfH* y su promotor en la cepa parental y en aquellas que portan el plásmido panfH.

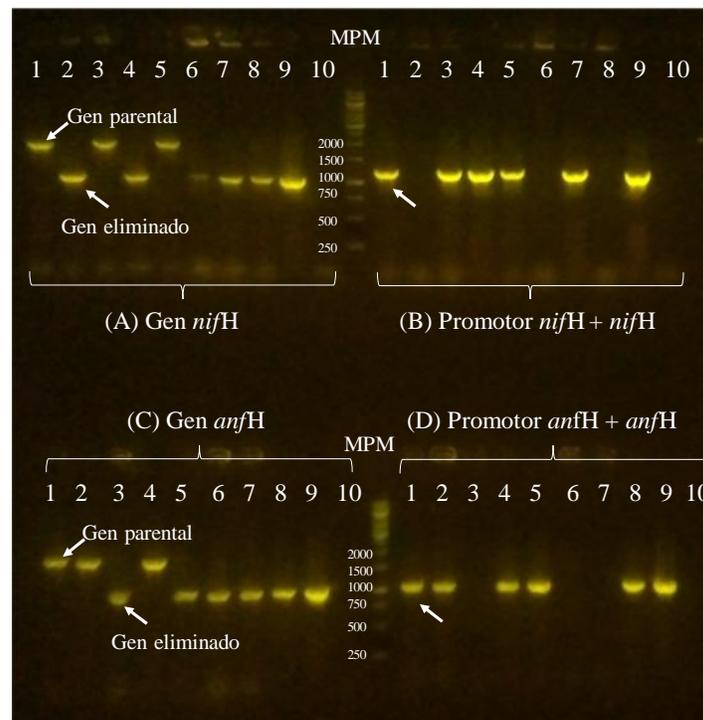


Figura 3. Gel de agarosa mostrando la verificación por PCR de las diferentes mutantes realizadas en la cepa UYSO10. **Cuadro A:** Producto de la amplificación del gen *nifH* y aproximadamente 500 pb

adyacentes a cada lado del gen. Se espera un amplicón de 1934 y de 1037 pb para la cepa parental y mutante, respectivamente. **B:** Producto de la amplificación del gen *nifH* y su promotor. Se espera un amplicón de 1235 pb. **C:** Producto de la amplificación del gen *anfH* y aproximadamente 500 pb adyacentes a cada lado del gen. Se espera un amplicón de 1844y de 1000 pb para la cepa parental y mutante, respectivamente. **D:** Producto de la amplificación del gen *anfH* y su promotor. Se espera un amplicón de 1069 pb. **Carriles:** 1-UYSO10, 2- UYSO10 $\Delta nifH$, 3- UYSO10 $\Delta anfH$, 4- UYSO10 $\Delta nifH$ pnifH, 5- UYSO10 $\Delta anfH$ panfH, 6- UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$, 7- UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ pnifH, 8- UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ panfH, **9-control positivo**, plásmidos: **A-** pEMG-nifH, **B-** pnifH, **C-** pEMG-anfH y **D-** panfH) y **10-control negativo** sin ADN. **MPM:** Generuler 1 Kb de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 6. Tamaños esperados de los productos de amplificación de las PCR realizadas para confirmar las construcciones en las cepas UYSO10 mutantes.

Cepa	Tamaño del producto de amplificación esperado (pb)			
	PCR A	PCR B	PCR C	PCR D
UYSO10	1934	1235	1844	1235
$\Delta nifH$	1037	-	1844	1235
$\Delta anfH$	1937	1235	1000	-
$\Delta nifH$ pnifH	1037	1235	1844	1235
$\Delta anfH$ panfH	1937	1235	1000	1235
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$	1037	-	1000	-
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ pnifH	1037	1235	1000	-
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ panfH	1037	-	1000	1235

2. 2 CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE LAS CEPAS UYSO10 PARENTAL Y MUTANTES

Con el fin de evaluar si las mutaciones realizadas afectaron la capacidad de crecimiento de las cepas mutadas, se evaluó el crecimiento de las mismas así como la de la cepa parental, en medio de cultivo rico LB (condiciones de no FBN), en el tiempo (Figura 4). Los resultados mostraron que no existen diferencias en el crecimiento entre las cepas mutadas y la parental en las condiciones ensayadas.

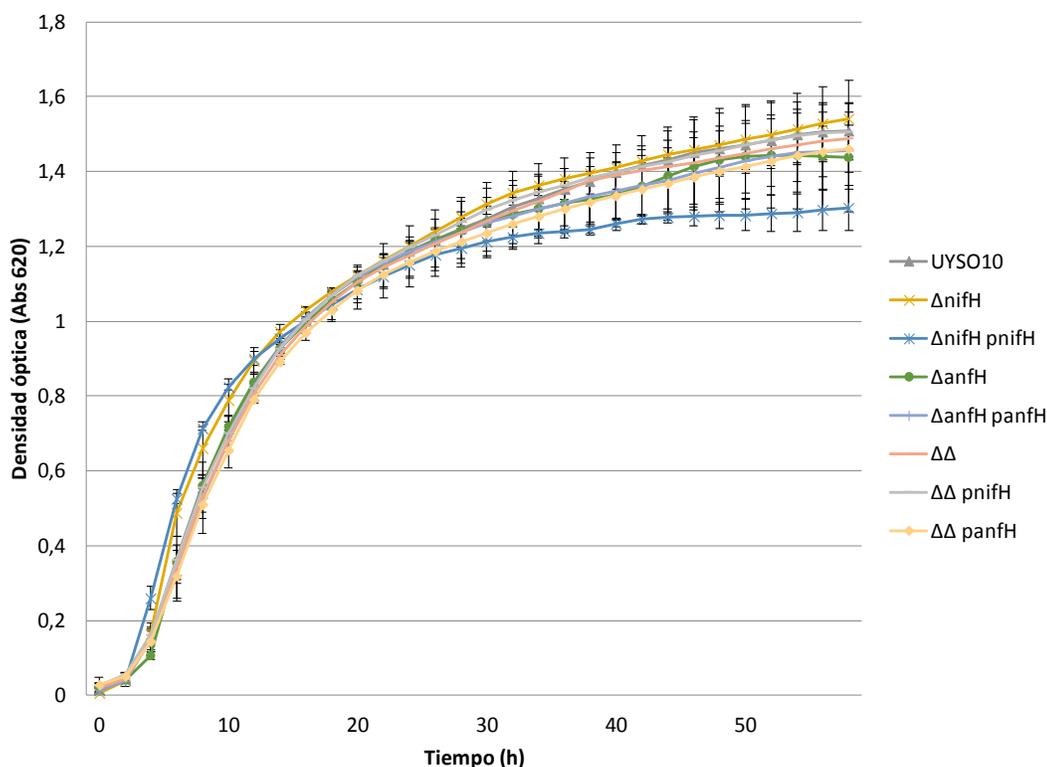


Figura 4. Curvas de crecimiento en medio de cultivo LB, de la cepa UYSO10 y las diferentes mutantes.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la enzima nitrogenasa en la cepa parental y las diferentes mutantes, se realizaron ensayos de reducción del acetileno. En los mismos se evaluó la actividad de la enzima nitrogenasa en medio de cultivo NFCC y NFCC modificado, utilizando una única fuente de C (sacarosa o ácido málico) y como fuente de N glutamato. Asimismo, se evaluó mediante esta metodología el efecto del número de células inoculadas, el uso de antibióticos, así como utilizar medio de cultivo líquido. Los resultados obtenidos no fueron repetitivos para cada cepa evaluada en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, es interesante resaltar que todas las cepas, con excepción de la doble mutante, mostraron actividad nitrogenasa en la mayoría de las condiciones. Asimismo, el agregado de antibióticos en el medio de cultivo no mostró diferencias en la actividad de la enzima, sin embargo, el inocular el vial con 1×10^7 células/vial mostró una mayor actividad enzimática, que el inocular con 1×10^8 células.

A modo de conclusión, los resultados mostraron que la mejor condición ensayada fue cuando se utilizó un inóculo de 1×10^7 células en medio de cultivo NFCC (sin modificar) líquido y sin el agregado de antibióticos. En dicha condición se observó producción de etileno en la cepa parental y en las mutantes excepto en la doble mutante (Tabla 7). Finalmente se realizó un último ensayo de reducción de acetileno utilizando el medio

de cultivo NFCC sin el agregado de molibdeno. Los resultados mostraron el mismo patrón mencionado en el cual, la única cepa que no fue capaz de reducir acetileno fue la doble mutante (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad nitrogenasa de la cepa UYSO10 parental y las mutantes.

Cepa	Producción de etileno	
	NFCC (Mo 9, 1 μ M)	NFCC sin Mo agregado ^a
UYSO10	+	+
$\Delta nifH$	+	+
$\Delta nifH$ pnifH	+	+
$\Delta anfH$	+	+
$\Delta anfH$ panfH	+	+
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$	-	-
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ pnifH	+	+
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ panfH	+	+

^aSi bien no se agregó Mo en el medio de cultivo, la receta del medio de cultivo NFCC contiene extracto de levadura 20 mg/l.

2. 3 CARACTERIZACIÓN *in vivo* DE LAS CEPAS UYSO10 PARENTAL Y MUTANTES

Con el objetivo de evaluar el papel de la FBN en la interacción planta-bacteria, se realizó un ensayo de respuesta de plantas de caña de azúcar micropropagadas a la inoculación con las cepas UYSO10 parental y las diferentes mutantes. El mismo se realizó bajo condiciones controladas, en un sistema donde previamente se reportó la promoción del crecimiento vegetal por la cepa UYSO10 [93, 94].

El análisis estadístico de los parámetros biométricos evaluados, mostraron que la inoculación con las cepas UYSO10 $\Delta nifH$ y UYSO10 $\Delta anfH$, no fue significativamente diferente de la inoculación con la cepa parental. Sin embargo, cuando se inoculó la cepa UYSO10 $\Delta nifH$ pnifH se observó un aumento significativo del crecimiento de las plantas de caña de azúcar en un 19 % en la altura, 8 % en el diámetro y un 40 % en la acumulación de N y al inocular con la cepa UYSO10 $\Delta anfH$ panfH se registró un aumento de un 30 % en la acumulación de N. Por otro lado, la inoculación con UYSO10 $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ ($\Delta\Delta$), mostró una disminución significativa del crecimiento en un 9 % en la altura, 13 % en el diámetro y un 32 % en el peso seco aéreo, en comparación con la cepa UYSO10 parental (Figura 5 y 6). Asimismo, la respuesta de las plantas a la inoculación con las cepas UYSO10 doble mutante, conteniendo en plásmidos el promotor y el gen *nifH* ($\Delta\Delta$ pnifH) o *anfH* ($\Delta\Delta$ panfH), mostraron una recuperación del efecto promotor del crecimiento vegetal (Figura 5 y 6).

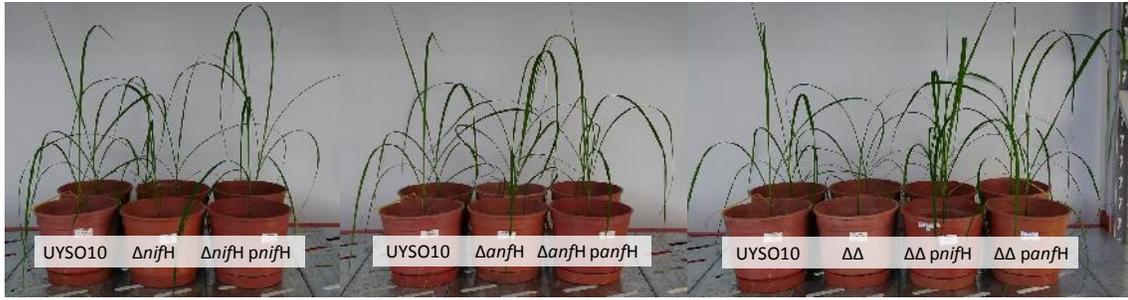


Figura 5. Vista del ensayo de PCV de plantas de caña de azúcar inoculadas con las cepas UYSO10 parental y mutantes, a los 3 meses pi.

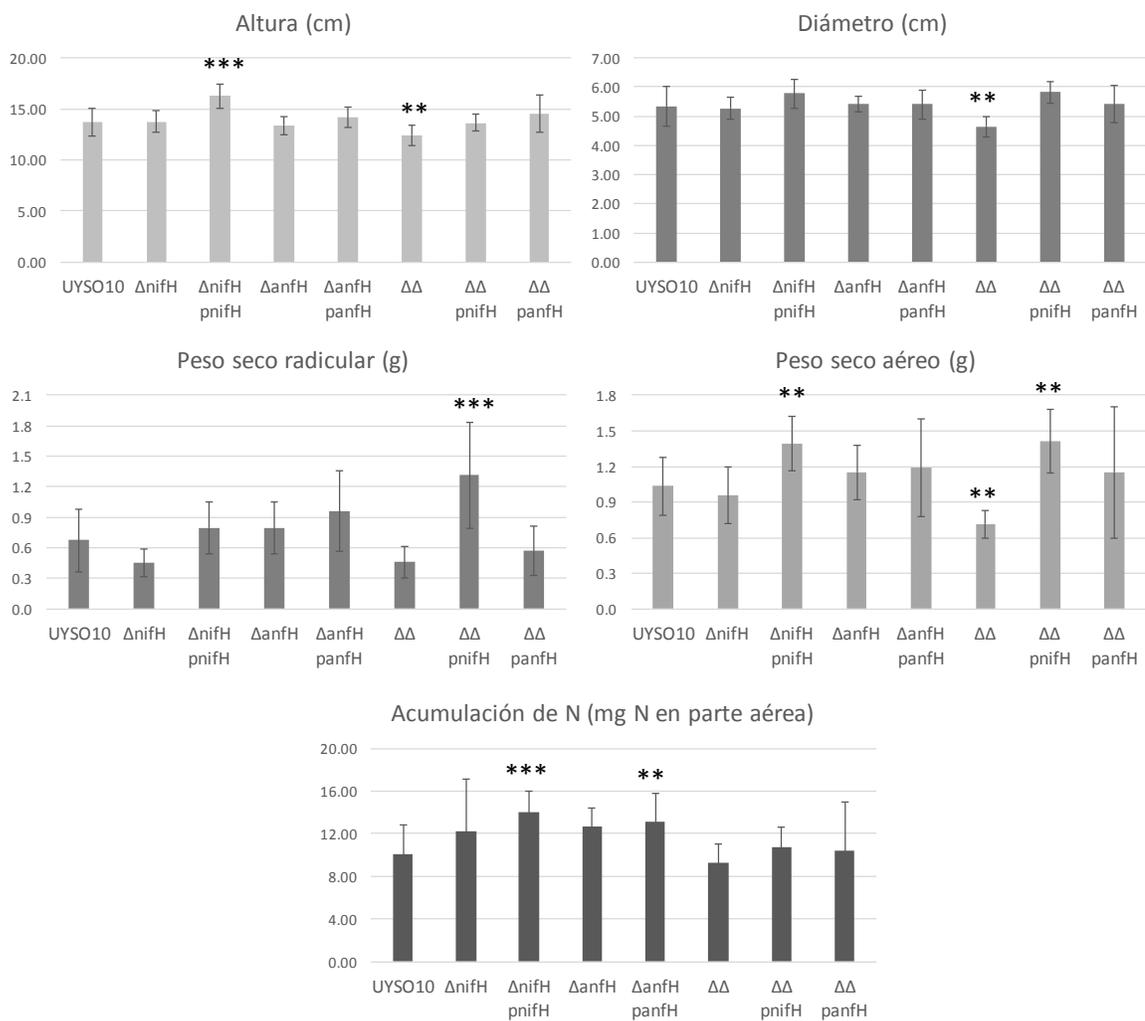


Figura 6. Respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las mutantes en las enzimas nitrogenasas. Con asteriscos se indican los tratamientos que difieren significativamente del tratamiento inoculado con la cepa UYSO10 (* $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$).

3 DISCUSIÓN

3.1 FBN EN GRAMÍNEAS POR ENDÓFITOS DIAZÓTROFOS

El estudio de BPCV asociadas a gramíneas, ha aumentado considerablemente a nivel mundial, buscándose extender los conocimientos de la FBN muy estudiada en leguminosas [218]. Varios endófitos PCV han sido descritos como biotecnológicamente promisorios, siendo la FBN y la producción de fitohormonas, los principales mecanismos reportados como responsables de la promoción [50, 75, 219, 220].

Mediante el empleo de técnicas isotópicas del ^{15}N , se ha demostrado que diversos cultivos de gramíneas son capaces de adquirir parte de su N nutricional a partir de la FBN. En particular, para el cultivo de caña de azúcar, se calculó que el N proveniente de la FBN puede alcanzar hasta un 60 % en variedades cultivadas en Brasil y entre 34-59 % en variedades cultivadas en Uruguay [89, 218]. Asimismo, la expresión de la nitrogenasa por bacterias endófitas en los tejidos internos de las plantas hospedadas, se ha confirmado mediante diferentes aproximaciones, incluyendo: i- la presencia y/o cuantificación de transcritos del gen *nifH*, ii- la construcción de fusiones de genes o de promotores con genes reporteros, iii- inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra la enzima nitrogenasa y iv- técnicas isotópicas del ^{15}N aplicadas a plantas inoculadas con una bacteria, en condiciones controladas [221–226].

Con la finalidad de poder determinar el rol de la FBN en la promoción del crecimiento vegetal, se construyeron en las cepas endofíticas diazotróficas *G. diazotrophicus* Pal5, *K. pneumoniae* 342 y *Azoarcus* sp. BH72, mutantes *knock out* en genes codificantes para la enzima nitrogenasa, particularmente en los genes estructurales *nifD*, *nifH* y *nifK* respectivamente [108, 221, 227]. En los casos mencionados, mediante ensayos de respuesta de las plantas hospedadas a la inoculación con las cepas parental y las mutantes, se pudo demostrar que la FBN es al menos en parte, responsable de la PCV observada, cuando se evaluó la PCV y el N incorporado. Tanto para de *G. diazotrophicus* como para *K. pneumoniae* se evaluó también la colonización de las plantas por las cepas parentales y mutantes, no observándose diferencias significativas y sugiriendo que las mutaciones no afectaron la capacidad colonizadora de las bacterias. Es de destacar que, en todas las cepas nombradas, la única nitrogenasa presente es del tipo MoFe-nitrogenasa, y que en ninguno de estos estudios se realizó la construcción de la cepa mutada *nif⁻* con el agregado posterior del gen eliminado en trans (complementante).

3. 2 NITROGENASAS

La nitrogenasa es la enzima encargada de la reducción del dinitrogeno a amonio. La misma posee dos componentes proteicos generalmente denominados como la proteína Fe y la proteína MoFe. Estos términos hacen referencia a la composición metálica de los grupos prostéticos que contienen dentro cada componente proteico. Todos los diazótrofos conocidos poseen la MoFe-nitrogenasa y algunos poseen además una o las dos nitrogenasas llamadas “alternativas”: la VFe-nitrogenasa y la FeFe-nitrogenasa [228]. A pesar de las diferencias en su contenido en metales, estos subtipos son estructuralmente similares y se encuentran filogenéticamente relacionados. Sin embargo, la eficiencia de la MoFe-nitrogenasa es mayor, porque requiere de menos moléculas de ATP y menor poder reductor por molécula de N₂ fijada [40]. Por ser la MoFe-nitrogenasa universal, la primera en ser descubierta y ser más eficiente, ha sido el subtipo más estudiado. A su vez, algunos autores postulan que el tamaño de la población de diazótrofos equipados únicamente con la MoFe-nitrogenasa supera en varios ordenes de magnitud a aquellos que contienen a su vez nitrogenasas alternativas [228]. Por estos motivos, han sido pocos los trabajos que buscaron comprender el rol de las nitrogenasas alternativas.

El organismo modelo más estudiado por poseer las 3 variantes de nitrogenasas ha sido *A. vinelandii*. Estudios en este organismo han demostrado una regulación jerárquica por disponibilidad de metales, donde en presencia de Mo, se expresa la MoFe-nitrogenasa y se reprimen las otras formas. En ausencia de Mo y presencia de V, se expresa la VFe-nitrogenasa y solo en ausencia de ambos metales lo haría la FeFe-nitrogenasa [229, 230]. Esta regulación fisiológica de la expresión de la nitrogenasa según la disponibilidad de metales ha sido entendida como de optimización del proceso por parte del organismo [40]. En el mismo sentido, en la cepa *Rhodobacter capsulatus* que posee la MoFe- y FeFe-nitrogenasa, la cepa mutante $\Delta nifHDK$ (FeFe-nitrogenasa funcional), no pudo crecer de forma diazotrófica o expresar los genes *anf* en concentraciones de Mo >10 Nm [231]. Curiosamente esta represión de las nitrogenasas alternativas en *A. vinelandii* se observa solamente a temperaturas mayores a 15 °C y no por debajo [232], sugiriendo que la temperatura puede ser otro factor de regulación. A partir de estas observaciones, surge una de las hipótesis de la existencia de las nitrogenasas alternativas, la cual postula que las mismas están especializadas para ser activas en ambientes específicos [228]. Sin embargo, en aparente contradicción, la VFe- y FeFe-nitrogenasa están presentes en organismos que habitan diversos ambientes desconociéndose su real contribución [233].

Por otro lado, a partir de estudios transcriptómicos realizados en *A. vinelandii* y *Rhodopseudomonas palustris*, se comprobó que cuando se expresan las nitrogenasas alternativas, se observa un gran aumento de los genes de adquisición de nitrógeno [230, 234]. Entre los genes sobreexpresados se encuentran los asociados al transporte de compuestos nitrogenados y al acceso de N fijado. De esta forma, se hipotetizó una

nueva forma de regulación de las enzimas alternativas, sugiriendo que su expresión podría responder a los niveles de falta de N fijado, en vez de ser una respuesta directa a la presencia de metales [234].

Actualmente, mediante estudios de genómica comparativa se ha propuesto que la presencia de nitrogenasas alternativas no se encuentra tan restringida como se ha sugerido [235]. A su vez, un nuevo método llamado ISARA (*Isotopic acetylene reduction assay*), ha sido desarrollado para discriminar la actividad de cada subtipo de nitrogenasa [233]. Al aplicar esta técnica, se pudo comprobar que las nitrogenasas alternativas contribuyen significativamente a la FBN en muestras ambientales [233, 235].

Teniendo en cuenta la bibliografía consultada con respecto a las nitrogenasas alternativas, se puede apreciar que quedan muchas interrogantes aún por responder acerca de cómo es la regulación de su expresión, si esta regulación es universal, así como el entender cuál es su rol en el ambiente.

3. 3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NITROGENASAS PRESENTES EN LA CEPA UYSO10

Mediante el ensayo de reducción de acetileno, se determinó previamente que la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10, presenta la capacidad de fijar biológicamente el N₂ atmosférico *in vitro* [89]. Asimismo, estudios bioinformáticos determinaron la presencia en el genoma de 2 operones que codifican para las enzimas MoFe- y FeFe-nitrogenasa (Figura 7) (Beracochea en preparación). Con el objetivo de evaluar el efecto de la FBN en la capacidad PCV observada para esta cepa y el papel que juega cada subtipo de nitrogenasa en el mismo, se construyeron y caracterizaron mutantes individuales y dobles por delección de uno de los genes estructurales de cada nitrogenasa, *nifH* y *anfH*.

Los resultados obtenidos demostraron que la reducción de acetileno se detectó en todas las condiciones ensayadas exceptuando en la doble mutante $\Delta nifH\text{-}\Delta anfH$, lo que confirma que solo la delección de ambos genes estructurales impide la FBN. Observaciones similares fueron reportadas en *Rhodopseudomonas palustris*, diazótrofo que posee 3 nitrogenasas, donde mutantes capaces de expresar una única nitrogenasa fijaron el N₂ atmosférico, pero no lo hizo la triple mutante ($\Delta nifH\ \Delta vnfH\ \Delta anfA$) [234]. Asimismo, en nuestro modelo de estudio, la inhibición de la FBN se revirtió tras la complementación *in trans* con un plásmido conteniendo el gen *nifH* o *anfH* con sus promotores correspondientes.

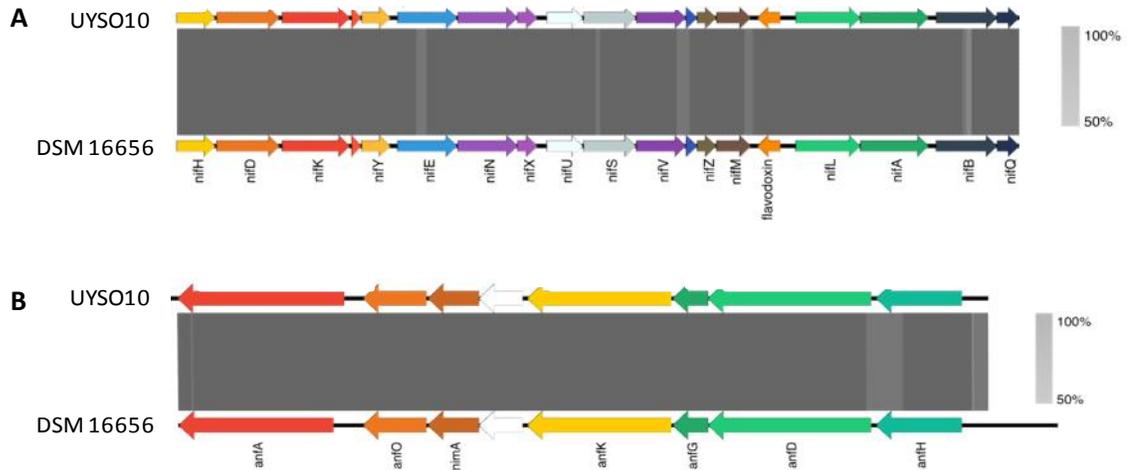


Figura 7. Arreglo genético de los genes que codifican para la MoFe-nitrogenasa y FeFe-nitrogenasa en la cepa UYSO10 y su comparación con la cepa *K. radicincitans* DSM16656^T. **A.** Comparación del operón *nif*. **B.** Comparación del operón *anf*. Para su construcción se utilizó la homología de secuencia a nivel de aminoácidos. La figura fue gentilmente cedida por Martín Beracochea (Beracochea en preparación).

Los resultados obtenidos también demostraron que la actividad de la FeFe-nitrogenasa no es inhibida por la presencia de Mo (9,1 μM). Si bien, puede que la presencia de Mo ejerza una inhibición de la enzima a mayores concentraciones, este no parece ser el caso, ya que concentraciones de 1 μM y 10 nM inhibieron la expresión de las nitrogenasas alternativas en los diazótrofos *A. vinelandii* y *R. capsulatus*, respectivamente [229, 231]. Un caso similar al aquí observado fue reportado en el diazótrofo *R. palustris*, donde una cepa mutante en la MoFe-nitrogenasa, creciendo diazotróficamente en presencia de una sal de Mo (15 nM a 100 μM), expresó la VFe- y FeFe-nitrogenasa, según la disponibilidad de V en el medio de cultivo [234]. Esta observación también se realizó en *Rhodospirillum rubrum*, donde la bacteria sintetizó la FeFe-nitrogenasa en presencia de Mo, cuando la MoFe-nitrogenasa no podía ser expresada de forma funcional [236].

Por otra parte, la cepa UYSO10 expresando la FeFe-nitrogenasa fue capaz de crecer en medio conteniendo V (17 μM) y mostrar actividad ARA (datos no mostrados). Todas estas observaciones en conjunto sugieren que la expresión de la FeFe-nitrogenasa de *Kosakonia* sp UYSO10 no es afectada por la concentración de los metales Mo y V en el medio de cultivo.

Recientemente se publicó un artículo muy similar al trabajo aquí realizado. En el mismo se construyeron a partir de *K. radicincitans* DSM16656^T las mutantes $\Delta nifH$, $\Delta anfH$ y $\Delta anfH-\Delta nifH$. A continuación, las cepas fueron evaluadas en su capacidad de FBN, mediante evaluación del contenido de N e incorporación de ¹⁵N. A partir de la aplicación de ambas técnicas los autores observaron la contribución de N de la MoFe-

nitrogenasa, pero no de la FeFe-nitrogenasa, bajo las condiciones ensayadas [237]. También evaluaron disminuir la cantidad de Mo del medio de cultivo de 230 μM a 0,4 μM , sin observar efecto sobre la FeFe-nitrogenasa. Es muy interesante resaltar que si bien la cepa DSM16656^T posee un 98,91 % de similitud a nivel genómico con la cepa UYSO10 y ambas poseen el mismo arreglo genómico de los operones *nif* y *anf* con casi un 100 % de identidad en la secuencia de aminoácidos (Figura 7) (Beracochea en preparación), los resultados obtenidos por dichos autores son diferentes a los obtenidos por nuestro grupo. Entre las posibles causas para explicar esta situación se podrían enumerar i- la existencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para la FeFe-nitrogenasa, que impidan la actividad en la cepa DSM16656^T, ii- que la mutante $\Delta nifH$ construida por Ekanjo y colaboradores tenga algún efecto sobre la FeFe-nitrogenasa o iii- la diferencia provenga del medio de cultivo y condiciones de crecimiento ensayadas.

Aún resta por conocer como es la regulación de los subtipos de nitrogenasas en *Kosakonia* sp. UYSO10, aunque todo sugiere que no es únicamente por la disponibilidad de metales (Mo, V).

3. 4 LA MOFE Y FEFE NITROGENASAS DEL ENDÓFITO *KOSAKONIA* SP. UYSO10 SON NECESARIAS PARA LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE CAÑA DE AZÚCAR

En el presente estudio los resultados mostraron que la MoFe y la FeFe nitrogenasas son necesarias para la promoción del crecimiento vegetal de cañas de azúcar por la cepa UYSO10. Esta afirmación se basa en que la inoculación de plantas de caña de azúcar con la cepa mutada en ambas nitrogenasas tuvo un efecto negativo sobre los parámetros de crecimiento evaluados. Asimismo, se observó que las delecciones de los genes *nifH* o *anfH* por separado, no mostraron un efecto en la PCV, sugiriendo que la FBN está ocurriendo en ambas condiciones.

El género *Kosakonia* ha sido recientemente definido a partir de un grupo de cepas anteriormente clasificadas como pertenecientes a el género *Enterobacter* [95]. Dichas cepas han sido principalmente reportadas como asociadas a plantas y se las ha descrito como promotoras del crecimiento vegetal [96, 98, 238–241]. En particular, las cepas *Kosakonia* sp. NN145S y NN143E mostraron ser capaces de promover el crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar micropropagadas y se demostró, mediante ensayos de dilución isotópica del ¹⁵N que la FBN era uno de los mecanismos actuantes [242]. En otro trabajo, la cepa *Kosakonia* sp R4-368, aislada de plantas de *Jatropha curcas*, mostró ser capaz de reducir acetileno y promover el crecimiento vegetal de dicha planta [243]. Estudios bioinformáticos realizados por estos autores concluyeron que el genoma de esta cepa posee únicamente el operon *nif*. Al realizar mutantes *knockout* en los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* por separado, observaron que las

cepas mutadas perdían la capacidad de reducir el acetileno y de promover en parte el crecimiento vegetal. Asimismo, los autores observaron que las poblaciones de la cepa parental y mutantes que colonizaron las plantas fue similar, por lo que las mutaciones no estarían afectando la colonización de la planta por la bacteria [243]. Por otro lado, en las cepas *K. radicincitans* DSM16656^T y UMEnt01/12, *K. oryzae* Ola51T y YD4 y *Kosakonia* sp. NN145S y NN143E, se ha descrito la presencia de la Mo- y la FeFe-nitrogenasa [237, 242, 244]. Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el efecto de cada nitrogenasa en la planta, mediante la construcción y evaluación de cepas mutantes.

En los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de cepas pertenecientes al género *Kosakonia* y su interacción con las plantas. En ese sentido han sido varios los reportes de promoción del crecimiento de diversos cultivos por la inoculación de cepas de este género, realizados en condiciones de invernáculo y campo [27, 98, 99]. En varios trabajos, se señala a la FBN como uno de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal [242, 243], sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación y actividad de los subtipos de nitrogenasas que presentan. En el presente trabajo, observamos que tanto la MoFe-nitrogenasa como la FeFe-nitrogenasa son funcionales y se encuentran activas *in vitro*. Curiosamente, la FeFe-nitrogenasa no parece estar regulada por los niveles de Mo y V en el medio de cultivo. Asimismo, los ensayos *in vivo* muestran que la MoFe y/o la FeFe nitrogenasas son necesarias para la promoción del crecimiento vegetal de cañas de azúcar por la cepa UYSO10 y que la presencia de una u otra enzima poseen el mismo efecto sobre las plantas. A partir de lo antedicho, se propone el género *Kosakonia* como un interesante modelo de estudio para seguir profundizando y evaluar la importancia de los subtipos de nitrogenasas en el contexto de la PCV.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1- Las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24, presentan diversas características fenotípicas potencialmente involucradas en la interacción.
- 2- Las cepas UYSO10 y UYSO24 son endófitos verdaderos de caña de azúcar.
- 3- En presencia de exudados radiculares de plantas de caña de azúcar, ambas cepas adaptan su proteoma con la finalidad de transportar y metabolizar diferentes nutrientes y de interaccionar con la planta hospedera.
- 4- En co-cultivo con plantas de caña de azúcar, la cepa UYSO10 expresa diversas proteínas asociadas a transportar y metabolizar diferentes fuentes de C y N, estando la FBN activa; a censar diferentes estímulos ambientales y relacionadas con la interacción y la PCV.
- 5- Tanto la MoFe-nitrogenasa como la FeFe-nitrogenasa presentes en el genoma de la cepa UYSO10 son funcionales y se encontraron activas *in vitro* en las condiciones ensayadas.
- 6- La MoFe y FeFe nitrogenasas del endófito *Kosakonia* sp. UYSO10 son necesarias para la promoción del crecimiento de caña de azúcar.

PERSPECTIVAS

Con respecto al capítulo II:

a- Dado que actualmente se cuenta con los genomas de las cepas UYSO10 y UYSO24, sería interesante realizar búsquedas bioinformáticas focalizadas a la identificación de otras características asociadas a la interacción, como ser la presencia de sistemas de secreción y de genes relacionados con el mecanismo de *quorum sensing*, entre otros posibles. Se plantea particularmente para la cepa UYSO24 la búsqueda de posibles genes de nodulación, teniendo en cuenta su afiliación filogenética.

Con respecto al capítulo III y IV:

a- Validar la expresión diferencial de algunas de las proteínas identificadas. Para ello, se podrían realizar cuantificaciones de los transcritos mediante qRT-PCR, generar cepas mutantes donde se incluya algún gen reportero asociado al promotor del gen a evaluar o realizar la construcción de cepas mutantes por delección en los genes de interés. Dichas mutantes se caracterizarían *in vivo* en las mismas condiciones, en medio de cultivo con y sin exudados radiculares o creciendo en co-cultivo de forma planctónica o en asociación con la planta.

b- Caracterizar la composición de los exudados radiculares de las plantas de caña de azúcar micropropagadas con el fin de profundizar en el conocimiento de la interacción. Para ello se podrían estudiar los diferentes componentes mediante su análisis por cromatografía gaseosa (GC-MS) y líquida (HPLC-MS). Posteriormente se podrían evaluar los efectos de los componentes principales de dicho exudado o de algún componente particular que resulte interesante sobre las bacterias, evaluando la quimiotaxis, la expresión de los genes seleccionados, entre otras características.

c- Evaluar si la producción de compuestos volátiles es responsable al menos en parte de PCV en caña de azúcar. Para demostrarlo, se podrían construir mutantes en alguno de los genes involucrados y evaluar dichas mutantes *in vitro* e *in vivo* en asociación con la planta.

Con respecto al capítulo V:

a- Profundizar en el conocimiento de la interacción planta-bacteria en el modelo de estudio evaluando la colonización de la planta tanto por la cepa parental como las mutantes simples y doble en las nitrogenasas. Para ello, se propone evaluar la

colonización mediante microscopía y/o cuantificación de la colonización realizando recuentos por ufc o PCR en tiempo real.

b- Confirmar y cuantificar mediante alguna de las técnicas isotópicas del ^{15}N , cual es el porcentaje de N proveniente de la FBN incorporado a la planta. En estos ensayos se pueden incluir diferentes concentraciones de N en el sustrato, de forma de evaluar si existe un efecto inhibitorio de la FBN en presencia de N disponible para la planta.

c- Estudiar diferentes factores que influyen en la actividad de cada uno de los subtipos de nitrogenasas. Se propone construir cepas con plásmidos donde los promotores de cada enzima se fusionen con genes reporteros y de esta forma evaluar diferentes estímulos ambientales como la presencia y concentración de los metales Mo, V y Fe, la concentración de N fijado, la presencia de exudados radiculares de plantas de caña de azúcar y líquido apoplástico obtenido a partir de tallos de caña de azúcar, así como diferentes fuentes de C como glucosa, sacarosa, piruvato, malato, EtOH y glicerol. Las condiciones ensayadas pueden a su vez ser confirmadas aplicando el ensayo de reducción de acetileno. Finalmente sería interesante realizar ensayos de inoculación de plantas y observar la expresión de una u otra enzima.

ANEXO A – MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

Medio de cultivo triptona-extracto de levadura (TY) [245]

Componentes	Cantidad
Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
CaCl ₂	0,68 g
H ₂ O c. s. p. 1 litro	

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) [246]

Componentes	Cantidad
Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O c. s. p. 1 litro	

Medio de cultivo LGI [247]

Componentes	Cantidad
Azúcar cristal	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,015 g
Solución FeEDTA 1,64 %	4,0 ml
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,002 g
Solución de vitaminas	1,0 ml
KNO ₃	1,0 g
Azul de bromotimol 0,5 %	5,0 ml
H ₂ O c. s. p. 1 litro	
<u>Solución de vitaminas</u>	
Biotina	0,01 g
Pyridoxal-HCl	0,02 g
H ₂ O c. s. p. 1 litro	

Ajustar el pH a 6,0–6,2 con solución H₂SO₄ 5 %.

Medio de cultivo NFCC [248]

Componentes	Cantidad
Ácido málico	5,0 g
Glucosa	2,5 g
Acetato de sodio	2,46 g
Piruvato de sodio	2,53 g
NaOH	4,7 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
FeCl ₃	0,01 g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,002 g
Azul de bromotimol	2,5 mg
<u>H₂O c. s. p. 1 litro</u>	

Ajustar el pH a 6,8. Para la preparación de los medios semisólidos, agregar 20 mg/l de extracto de levadura y 2,4 g de agar.

En este trabajo se utilizaron también variantes del medio de cultivo NFCC, donde las fuentes de C fueron sustituidas por sacarosa 0,5 % o ácido málico 0,5 % y el extracto de levadura por glutamato 0,05 mM.

Medio de cultivo CAS [249]

Componentes	Cantidad
<u>Medio base</u>	
Solución salina*	100 ml
PIPES	30,24 g
Extracto de levadura desferrado	1,0 g
MgCl 1M	1,0 ml
CaCl ₂ 0,1 M	1,0 ml
Manitol	1,0 g
Agua desionizada	748 ml
Agar	15,0 g
<u>Solución salina</u>	
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Agar	3,75 g
H ₂ O c. s. p. 100 ml	
<u>Solución colorante</u>	
CAS	60,48 g
Agua desionizada	59 ml

Preparación: Agregar al medio base estéril 10 ml de glucosa 20 % estéril. Por otro lado, agregar a la solución colorante 1 ml de una solución de FeCl₃ (135 mg de FeCl₃ · 6H₂O en 50 ml de una solución HCl 0,01 N). A continuación, agregar dicha solución gota a gota sobre una solución de HDTMA 72,88 mg en 40 ml de agua desionizada. Finalmente, agregar la solución resultante al medio base justo antes de armar las placas.

En este trabajo, se sustituyó en la receta original las fuentes de C, utilizando las presentes en el medio de cultivo NFCC, ácido málico 5 % (p/v), glucosa 2,5 % (p/v), piruvato de sodio 2,53 % (p/v) y acetato de sodio 2,46 % (p/v).

Medio de cultivo Aleksandrov [250]

Componentes	Cantidad
Sacarosa	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
CaCO ₃	1,0 g
Agar	15,0 g
H ₂ O c. s. p. 1 litro	

Ajustar el pH a 7,5.

2. MEDIO DE CULTIVO PARA PLANTAS

Medio de cultivo MS [251]

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

Solución de vitaminas del medio de cultivo Staba [252]

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

Agregar al medio de cultivo base MS solución de vitaminas 1 ml/l, sacarosa 20 g/l y mioinositol 100 mg/l. Ajustar el pH a 5,8.

En esta tesis se trabajo con una modificacion del medio cultivo, para ello se preparó el medio MS diluido al decimo y sin agregar la fuente de N (NH₄NO₃ni KNO₃) [123].

3. SOLUCIONES

Solución de Bradford [144]

Disolver 100 mg de Azul Comassie G-250 en 50 mL de EtOH 95 %. A continuación, agregar 100 ml de H₃PO₄ 85 % y agua destilada hasta 200 ml. Filtrar la solución 4-5 veces.

ANEXO B – TABLAS DE PROTEÍNAS, CAPÍTULO IV

Tabla 1. Proteínas asociadas a la transducción de señales ambientales y al movimiento, identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
Receptores de quimiotaxis			
1162	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein III (ribose and galactose chemoreceptor protein)</i>	4	147
502	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	4	78
5120	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor protein STM3152</i>	4	67
3243	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)</i>	4	65
4683	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein IV (dipeptide chemoreceptor protein)</i>	4	63
4682	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein II (aspartate chemoreceptor protein)</i>	4	52
5943	<i>Aerotaxis sensor receptor protein</i>	3	50
1545	<i>Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer</i>	3	49
5085	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)</i>	3	45
4985	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	3	45
3312	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	3	45
3088	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	2	35
3177	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	2	29
Regulación de la quimiotaxis			
4687	<i>Chemotaxis response - phosphatase CheZ</i>	4	52
4680	<i>Signal transduction histidine kinase CheA (EC 2.7.3.-)</i>	2	19
4681	<i>Positive regulator of CheA protein activity (CheW)</i>	2	11

Asociadas al flagelo				
587	<i>Flagellin (FliC)</i>		4	64
4274	<i>Flagellin (FliC)</i>		3	28
4296	<i>Flagellar basal body-associated protein FliL</i>		3	24
674	<i>Flagellar P-ring protein FliG</i>		2	15
4678	<i>Flagellar motor rotation protein MotA</i>		2	12
4290	<i>Flagellar M-ring protein FliF</i>		2	7
4291	<i>Flagellar motor switch protein FliG</i>		2	6
Proteínas con dominios GGDEF				
1616	<i>GGDEF domain protein</i>		2	12
5937 ^b	<i>diguanylate cyclase/phosphodiesterase (GGDEF y EAL domains) with PAS/PAC sensor(s)</i>		1	4
Otrasenzimas				
4819	<i>Serine/threonine protein kinase</i>		4	95
5	<i>Protein RcsF</i>		4	31

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa. ^bComo excepción se incluyó en la tabla una proteína expresada en una única réplica biológica.

Tabla 2. Proteínas asociadas a la envoltura celular, transporte y adhesión, identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a	Descripción ^b
Proteínas asociadas a la envoltura celular				
5809	<i>Major outer membrane lipoprotein Lpp</i>	4	762	Integridad de la ME o EC
4230	<i>Outer membrane protein OmpC</i>	4	746	Proteína de ME
255	<i>Outermembraneprotein A precursor</i>	4	450	Proteína de ME
278	<i>Outer membrane protein OmpF</i>	4	169	Proteína de ME

1230	<i>Outer membrane beta-barrel assembly protein BamB</i>	4	101	Establecimiento de proteínas de ME
3992	<i>Outer membrane protein X precursor</i>	4	98	Proteína de ME
25	<i>Outer membrane protein assembly factor YaeT (BamA)</i>	4	91	Establecimiento de proteínas de ME
5778	<i>Outer membrane lipoprotein pcp precursor</i>	4	86	Lipoproteína
5300	<i>UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.7)</i>	4	86	Síntesis de peptidoglicano
1417	<i>Outer membrane beta-barrel assembly protein BamC; Lipoprotein-34 precursor</i>	4	80	Establecimiento de proteínas de ME
343	<i>Uncharacterized lipoprotein YbjP</i>	4	75	Lipoproteína
3683	<i>ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase (EC 5.1.3.20)</i>	4	63	Síntesis de LPS
1896	<i>Protein involved in stability of MscS mechanosensitive channel</i>	4	62	Proteína de ME
97	<i>Protein translocase subunit SecA</i>	4	60	Sistema de traslocación Sec
3672	<i>Protein-export protein SecB (maintains pre-export unfolded state)</i>	4	36	Sistema de traslocación Sec
372	<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (EC 3.4.16.4)</i>	4	35	Síntesis de peptidoglicano
2431	<i>probable membrane protein yjell</i>	4	30	Proteína de MI
110	<i>UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase (EC 6.3.2.13)</i>	4	27	Síntesis de peptidoglicano
24	<i>Outer membrane chaperone Skp (OmpH) precursor y Outer membrane protein H precursor</i>	4	26	Establecimiento de proteínas de ME
4132	<i>Outer-membrane-phospholipid-binding lipoprotein MlaA</i>	4	20	Fosfolípidos
295	<i>Lipid A export permease/ATP-binding protein MsbA</i>	4	19	Fosfolípidos
5174	<i>Outer membrane channel TolC (OpmH)</i>	3	110	Proteína de ME
2860	<i>Protein translocase subunit SecD</i>	3	95	Sistema de traslocación Sec
3911	<i>Tol-Pal system beta propeller repeat protein TolB</i>	3	58	Integridad de la ME o EC
140	<i>Outer membrane protein Imp, required for envelope biogenesis / Organic solvent tolerance protein precursor</i>	3	52	
3798	<i>Inner membrane protein translocase component YidC, long form</i>	3	32	Proteína de MI
967	<i>Outer membrane beta-barrel assembly protein BamD</i>	3	28	Establecimiento de proteínas de ME
5314	<i>Lipopolysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein LptB</i>	3	23	Transporte de LPS

3282	<i>D-alanyl-D-alanine</i> carboxypeptidase (EC 3.4.16.4)	3	23	Síntesis de peptidoglicano
3912	Tol-Pal system <i>peptidoglycan-associated lipoprotein</i> PAL	3	22	Integridad de la ME o EC
5304	<i>Phospholipid ABC transporter substrate-binding protein</i> MlaD	3	21	Fosfolípidos
2859	<i>Preprotein translocase subunit</i> YajC (TC 3.A.5.1.1)	3	20	
3283	<i>Septum-associated rare lipoprotein</i> A	3	17	Integridad de la ME o EC
2990	<i>Putative outer membrane protein</i>	3	17	Proteína de ME
5869	<i>Putative outer membrane protein</i>	3	14	Proteína de ME
5777	<i>Anhydro-N-acetylmuramicacidkinase</i> (EC 2.7.1.170)	3	13	Reciclaje de peptidoglicano
5276	<i>Lipoprotein</i> Nlpl	3	11	Lipoproteína
917	<i>Outer membrane beta-barrel assembly protein</i> BamE	2	16	Establecimiento de proteínas de ME
4973	<i>Outer membrane lipoprotein</i> LolB	2	13	Lipoproteína
643	<i>beta-N-acetylglucosaminidase</i> (EC 3.2.1.52)	2	12	Síntesis de peptidoglicano
643	<i>beta-N-acetylglucosaminidase</i> (EC 3.2.1.52)	2	12	Reciclaje de peptidoglicano
5332	<i>Outer membrane stress sensor protease</i> DegQ, <i>serine protease</i>	2	10	Establecimiento de proteínas de ME
513	<i>Inner membrane protein</i> YtfL	2	10	Proteína de MI
3293	<i>LPS-assembly lipoprotein</i> RlpB precursor (<i>Rare lipoprotein</i> B)	2	10	Ensamblaje LPS
3813	<i>N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase</i> (EC 2.7.7.23) / <i>Glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase</i> (EC 2.3.1.157)	2	10	Síntesis de peptidoglicano
4746	<i>Paraquat-inducible protein</i> B	2	7	Fosfolípidos
4834	<i>N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase</i> (EC 4.2.1.126)	2	7	Síntesis de peptidoglicano
192	<i>Soluble lytic murein transglycosylase precursor</i> (EC 3.2.1.-)	2	6	Reciclaje de peptidoglicano

Transportadores

5369	<i>Amino acid ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein</i> YhdW	4	184	De aminoácidos
650	<i>PTS system, glucose-specific IIC component / PTS system, glucose-specific IIB component</i> (EC 2.7.1.69)	4	118	De azúcares
1647	<i>Nitrate ABC transporter, substrate-binding protein</i>	4	103	De nutrientes
1647	<i>Nitrate ABC transporter, substrate-binding protein</i>	4	103	De fuentes nitrogenadas
4632	<i>PTS system, fructose-specific IIA component / Fructose-specific</i>	4	88	De azúcares

	<i>phosphocarrier protein HPr</i>			
2928	<i>Ammonium transporter</i>	4	85	De nutrientes
2928	<i>Ammonium transporter</i>	4	85	De fuentes nitrogenadas
4630	<i>PTS system, inactive IIB catalytic domain / PTS system, fructose-specific IIB component (EC 2.7.1.69) / PTS system, fructose-specific IIC component</i>	4	71	De azúcares
4	<i>Methionine ABC transporter substrate-binding protein</i>	4	47	De aminoácidos
3926	<i>Putative molybdenum transport ATP-binding protein modF</i>	4	45	De nutrientes
2146	<i>Oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein OppA (TC 3.A.1.5.1)</i>	4	41	De péptidos
1389	<i>PTS system, glucose-specific IIA component</i>	4	40	De azúcares
4161	<i>Lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein ArgT (TC 3.A.1.3.1)</i>	4	36	
3662	<i>PTS system, mannitol-specific IIC component / PTS system, mannitol-specific IIB component (EC 2.7.1.69) / PTS system, mannitol-specific IIA component</i>	4	33	De azúcares
356	<i>Putrescine ABC transporter putrescine-binding protein PotF (TC 3.A.1.11.2)</i>	4	28	De fuentes nitrogenadas
3870	<i>Ferric uptake regulation protein FUR</i>	4	26	De nutrientes
4765	<i>PTS system, mannose-specific IIA component / PTS system, mannose-specific IIB component (EC 2.7.1.69)</i>	3	168	De azúcares
3621	<i>Dipeptide-binding ABC transporter, periplasmic substrate-binding component (TC 3.A.1.5.2) y Dipeptide chemoreceptor</i>	3	61	De péptidos
4763	<i>PTS system, mannose-specific IID component</i>	3	50	De azúcares
4992	<i>Nitrate/nitrite transporter NarK</i>	3	28	De nutrientes
2046	<i>Guanine/hypoxanthine permease GhxP</i>	3	27	De purinas
2819	<i>Ethanolamine permease</i>	3	22	De aminoácidos
3299	<i>Glutamate Aspartate periplasmic binding protein precursor GltI (TC 3.A.1.3.4)</i>	3	20	De aminoácidos
3833	<i>Kup system potassium uptake protein</i>	3	18	De nutrientes
3987	<i>Glutamine ABC transporter, permease protein GlnP</i>	3	18	De aminoácidos

1645	<i>Nitrate ABC transporter, ATP-binding protein</i>	3	17	De nutrientes
5372	<i>Amino acid ABC transporter, ATP-binding protein YhdZ</i>	3	17	De aminoácidos
1645	<i>Nitrate ABC transporter, ATP-binding protein</i>	3	17	De fuentes nitrogenadas
219	<i>Cytosine/purine/uracil/thiamine/allantoin permease family protein</i>	3	14	
3486	<i>Branched-chain amino acid transport ATP-binding protein LivF (TC 3.A.1.4.1)</i>	3	12	De aminoácidos
1534	<i>Maltoporin (maltose/maltodextrin high-affinity receptor, phage lambda receptor protein)</i>	3	9	De azúcares
5370	<i>Amino acid ABC transporter, permease protein YhdX</i>	2	25	De aminoácidos
1646	<i>Nitrate ABC transporter, permease protein</i>	2	17	De nutrientes
1646	<i>Nitrate ABC transporter, permease protein</i>	2	17	De fuentes nitrogenadas
3494	<i>Branched-chain amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein (TC 3.A.1.4.1)</i>	2	16	De aminoácidos
4165	<i>Histidine ABC transporter, ATP-binding protein HisP (TC 3.A.1.3.1)</i>	2	15	De aminoácidos
2738	<i>ABC transporter, ATP-binding protein</i>	2	15	
2993	<i>Methionine ABC transporter ATP-binding protein</i>	2	13	De aminoácidos
3987	<i>Glutamine ABC transporter, permease protein GlnP</i>	2	12	De aminoácidos
1533	<i>Maltoporin (maltose/maltodextrin high-affinity receptor, phage lambda receptor protein)</i>	2	12	De azúcares
3810	<i>Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (TC 3.A.1.7.1)</i>	2	11	De nutrientes
4970	<i>Putative sulfate permease</i>	2	10	De nutrientes
3837	<i>Ribose ABC transport system, periplasmic ribose-binding protein RbsB (TC 3.A.1.2.1)</i>	2	10	De azúcares

Exportadores

2960	<i>Multidrug efflux system AcrAB-TolC, inner-membrane proton/drug antiporter AcrB (RND type)</i>	4	77	
3270	<i>Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA; Cation efflux system protein CusA</i>	4	69	
3269	<i>Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, membrane fusion protein, CzcB family</i>	4	63	

3268	<i>Heavy metal RND efflux outer membrane protein, CzcC family</i>	4	46
3970	<i>ABC-type efflux pump membrane fusion component YbhG</i>	4	30
2961	<i>Multidrug efflux system AcrAB-TolC, membrane fusion component AcrA</i>	4	30
1562	<i>Multidrugresistanceregulator EmrR (MprA)</i>	2	12
3065	<i>Efflux transport system, outer membrane factor (OMF) lipoprotein</i>	2	5

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa. ^bME: membrana externa, EC: envoltura celular, MI: membrana interna

Tabla 3. Proteínas asociadas a la adaptación al estrés, identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
Asociadas al estrés			
2429	<i>Heat shock protein 60 family chaperone GroEL</i>	4	222
3262	<i>Universal stress protein G</i>	4	27
3788	<i>16 kDa heat shock protein A</i>	3	24
2428	<i>Heat shock protein 60 family co-chaperone GroES</i>	3	19
4759	<i>Cold shock protein of CSP family =>CspC (naming convention as in E. coli)</i>	2	15
1137	<i>Heat shock protein hslJ</i>	2	12
Chaperonas			
3990	<i>DNA protection during starvation protein</i>	4	261
173	<i>Chaperone protein DnaK</i>	4	107
561	<i>RNA-binding protein Hfq</i>	4	32
5327	<i>Stringent starvation protein A</i>	4	27
2971	<i>Chaperone protein HtpG</i>	3	46
39	<i>HtrA protease/chaperone protein</i>	3	21
Antioxidantes (vinculadas al estrés oxidativo)			
4857	<i>Catalase-peroxidase KatG (EC 1.11.1.21)</i>	4	221

2854	<i>Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like protein</i>	4	82
2214	<i>Thiol peroxidase, Tpx-type</i> (EC 1.11.1.15)	4	57
1875	<i>Folate-dependent protein for Fe/S cluster synthesis/repair in oxidative stress</i>	4	28
3260	<i>Alkyl hydroperoxide reductase protein C</i> (EC 1.11.1.15)	3	37
5881	<i>Catalase KatE</i> (EC 1.11.1.6) / <i>Glutamine amidotransferase-like domain</i>	2	19
315	<i>Thioredoxin reductase</i> (EC 1.8.1.9)	2	11
5792	<i>Superoxide dismutase [Fe]</i> (EC 1.15.1.1)	2	8
Estrésosmótico			
706	<i>Glucans biosynthesis protein G precursor</i>	4	75
705	<i>Glucans biosynthesis glucosyltransferase H</i> (EC 2.4.1.-)	4	46
3446	<i>Two-component system response regulator OmpR</i>	4	42
5882	<i>Osmotically-inducible lipoprotein E. OsmE</i>	4	30
5506	<i>Malto-oligosyltrehalose synthase</i> (EC 5.4.99.15)	2	15
4674	<i>Alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]</i> (EC 2.4.1.15)	2	9

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa.

Tabla 4. Proteínas asociadas al metabolismo del C y energético identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
Enzimas de las vías: glucolisis, gluconeogenesis y ciclo de Krebs			
5808	<i>Pyruvate kinase</i> (EC 2.7.1.40)	4	186
1897	<i>Fructose-bisphosphate aldolase class II</i> (EC 4.1.2.13)	4	175
4717	<i>Pyruvate kinase</i> (EC 2.7.1.40)	4	169
2329	<i>6-phosphofructokinase</i> (EC 2.7.1.11)	4	117
3675	<i>2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase</i> (EC 5.4.2.12)	4	93
2618	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i> (EC 1.1.1.42)	4	92
1156	<i>NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (EC 1.2.1.12)	4	76
2185	<i>Aconitate hydratase</i> (EC 4.2.1.3) y <i>2-methylisocitrate dehydratase</i> (EC 4.2.1.99)	4	70

77	<i>Dihydrolipoamide dehydrogenase of pyruvate dehydrogenase complex</i> (EC 1.8.1.4) y <i>Dihydrolipoamide dehydrogenase</i> (EC 1.8.1.4)	4	65
3898	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] beta chain</i> (EC 6.2.1.5)	4	65
3889	<i>Citrate synthase (si)</i> (EC 2.3.3.1)	4	56
2324	<i>Triosephosphate isomerase</i> (EC 5.3.1.1)	4	51
3921	<i>Phosphoglycerate mutase</i> (EC 5.4.2.11)	4	43
2029	<i>Protease VII(Omptin) precursor</i> (EC 3.4.23.49)	4	26
79	<i>Pyruvatedehydrogenase E1 component</i> (EC 1.2.4.1)	3	245
2443	<i>Fumarate reductase flavoprotein subunit</i> (EC 1.3.5.4)	3	71
78	<i>Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex</i> (EC 2.3.1.12)	3	59
2114	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i> (EC 5.3.1.9)	3	52
3875	<i>Phosphoglucomutase</i> (EC 5.4.2.2)	3	25
1214	<i>Aconitate hydratase 2</i> (EC 4.2.1.3)	3	24
5748	<i>Fumarate hydratase class I</i> (EC 4.2.1.2)	3	11
4828	<i>Fumarate hydratase class I, anaerobic</i> (EC 4.2.1.2)	2	27
3895	<i>2-oxoglutaratedehydrogenase E1 component</i> (EC 1.2.4.2)	2	22
3892	<i>Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</i> (EC 1.3.5.1)	2	19
4239	<i>Malate:quinone oxidoreductase</i> (EC 1.1.5.4)	2	10
Metabolización de fuentes carbonadas			
4497	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i> (EC 1.1.1.44)	4	259
4971	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase</i> (EC 2.7.6.1)	4	124
4631	<i>1-phosphofructokinase</i> (EC 2.7.1.56)	4	123
4720	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.49)	4	121
650	<i>PTS system, glucose-specific IIC component / PTS system, glucose-specific IIB component</i> (EC 2.7.1.69)	4	118
115	<i>Fructose repressor FruR, LacI family</i>	4	85
1532	<i>Fructokinase</i> (EC 2.7.1.4)	4	82
4630	<i>PTS system, inactive IIB catalytic domain / PTS system, fructose-specific IIB component</i> (EC 2.7.1.69) / <i>PTS system, fructose-specific IIC component</i>	4	71
2138	<i>UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i> (EC 2.7.7.9)	4	38

4089	<i>Glucokinase</i> (EC 2.7.1.2)	4	37
3865	<i>PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIC component / PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIB component</i> (EC 2.7.1.69) / <i>PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIA component</i>	4	34
3662	<i>PTS system, mannitol-specific IIC component / PTS system, mannitol-specific IIB component</i> (EC 2.7.1.69) / <i>PTS system, mannitol-specific IIA component</i>	4	33
4559	<i>Fructose-bisphosphate aldolase class I</i> (EC 4.1.2.13)	3	239
68	<i>Glucose dehydrogenase, PQQ-dependent</i> (EC 1.1.5.2)	3	22
3940	<i>6-phosphogluconolactonase</i> (EC 3.1.1.31)	3	19
1404	<i>Transketolase</i> (EC 2.2.1.1)	2	59
1901	<i>Transketolase</i> (EC 2.2.1.1)	2	35
500	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase, type I</i> (EC 3.1.3.11)	2	15
5749	<i>Mannose-6-phosphate isomerase</i> (EC 5.3.1.8)	2	13

Transporte de electrones

3903	<i>Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I</i> (EC 1.10.3.-)	4	154
3822	<i>ATP synthase FO sector subunit b</i> (EC 3.6.3.14)	4	91
4193	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain F</i> (EC 1.6.5.3)	4	72
2302	<i>Glycerol dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.6)	4	64
4189	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase chain A</i> (EC 1.6.5.3)	4	53
4995	<i>Respiratory nitrate reductase delta chain</i> (EC 1.7.99.4)	4	50
4190	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain B</i> (EC 1.6.5.3)	4	40
3904	<i>Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II</i> (EC 1.10.3.-)	3	21
2087	<i>Quinone oxidoreductase</i> (EC 1.6.5.5)	3	19
1254	<i>Inositol-1-monophosphatase</i> (EC 3.1.3.25)	3	17
4996	<i>Respiratory nitrate reductase gamma chain</i> (EC 1.7.99.4)	2	14

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa.

Tabla 5. Proteínas asociadas al metabolismo del N identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
Proteínas reguladoras del metabolismo del N			
2276	<i>Nitrogen regulation protein NtrC</i>	4	78
2927	<i>Nitrogen regulatory protein P-II, GlnK</i>	4	57
35	<i>[Protein-PII] uridylyltransferase (EC 2.7.7.59) / [Protein-PII]-UMP uridylyl-removing enzyme</i>	3	32
2275	<i>Nitrogen regulation protein NtrB (EC 2.7.13.3)</i>	3	17
Fijación biológica del N			
5485	<i>Nitrogenase (molybdenum-iron) beta chain (EC 1.18.6.1). NifK</i>	4	580
5488	<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.-)</i>	4	376
5486	<i>Nitrogenase (molybdenum-iron) alpha chain (EC 1.18.6.1). NifD</i>	4	369
5487	<i>Nitrogenase (molybdenum-iron) reductase and maturation protein NifH</i>	4	143
3958	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaB</i>	4	98
5472	<i>Nitrogen fixation negative regulator NifL</i>	4	60
3959	<i>Cyclic pyranopterin monophosphate synthase accessory protein</i>	4	28
1427	<i>Formatehydrogenlyase subunit 5</i>	3	30
5479	<i>Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein NifU</i>	3	25
5473	<i>Flavodoxin 1</i>	3	24
5482	<i>Nitrogenase FeMo-cofactor scaffold and assembly protein NifE</i>	3	12
Asimilación de amonio			
4993	<i>Respiratory nitrate reductase alpha chain (EC 1.7.99.4)</i>	4	684
2274	<i>Glutamine synthetase type I (EC 6.3.1.2)</i>	4	408
1644	<i>Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit (EC 1.7.1.4)</i>	4	402
5324	<i>Glutamate synthase [NADPH] large chain (EC 1.4.1.13)</i>	4	374
3423	<i>Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit (EC 1.7.1.4)</i>	4	374
4994	<i>Respiratory nitrate reductase beta chain (EC 1.7.99.4)</i>	4	203
5325	<i>Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13)</i>	4	114

1643	<i>Assimilatory nitrate reductase large subunit</i> (EC 1.7.99.4)	4	102
4995	<i>Respiratory nitrate reductase delta chain</i> (EC 1.7.99.4)	4	50
3424	<i>Nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit</i> (EC 1.7.1.4)	3	28
5735	<i>Fumarate and nitrate reduction regulatory protein</i>	2	7

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa.

Tabla 6. Proteínas asociadas a la promoción del crecimiento vegetal identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
5094	<i>Acetolactate synthase, catabolic</i> (EC 2.2.1.6). Als_c	4	458
5093	<i>2,3-butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (R)-acetoin-specific</i> (EC 1.1.1.4) / <i>Acetoin (diacetyl) reductase</i> (EC 1.1.1.304). BDH	4	150
4884	<i>2,3-butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (S)-acetoin-specific</i> (EC 1.1.1.76). BDH	4	148
116	<i>Acetolactate synthase small subunit</i> (EC 2.2.1.6). Als_s	4	64
5095	<i>Alpha-acetolactate decarboxylase</i> (EC 4.1.1.5). AldC	4	57
117	<i>Acetolactate synthase large subunit</i> (EC 2.2.1.6). Als_g	4	38

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa.

Tabla 7. Proteínas asociadas a otras características bacterianas involucradas en la interacción con la planta en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
Sistema de secreción tipo VI			
4800	IcmF-related protein	4	85
4804	<i>Uncharacterized protein</i> ImpC	4	70
971	ClpB protein	4	53
4818	ClpB protein	4	43
3566	VgrG protein	3	30
4799	<i>Outer membrane protein</i> ImpK/VasF, OmpA/MotB domain	3	24
4802	<i>Uncharacterized protein</i> ImpA	3	20
4810	<i>Uncharacterized protein</i> ImpI/VasC	3	17
4797	<i>Uncharacterized protein</i> ImpJ/VasE	2	7
Enzimas degradadoras de polímeros vegetales			
3941	<i>Pectinesterase</i> (EC 3.1.1.11)	4	49
1045	<i>Lipase</i>	2	11
5523	COG1649 <i>predicted glycoside hydrolase</i>	2	6

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa.

Tabla 8. Proteínas hipotéticas o sin caracterizar identificadas en la cepa UYSO10 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar.

Gen en UYSO10	Proteína identificada	nº de réplicas presentes	Señal total ^a
498	FIG00731333: <i>hypothetical protein</i>	4	93
1103	COGs COG3558	4	45

1328	<i>Uncharacterized protein EC-HemY in Proteobacteria (unrelated to HemY-type PPO in GramPositives)</i>	4	42
3087	<i>domain of unknown function DUF1745</i>	4	41
37	<i>UPF0325 protein YaeH</i>	4	39
2363	<i>Hypothetical protein</i>	4	34
824	<i>Hypothetical protein</i>	4	33
4079	<i>Uncharacterized protein yfeC</i>	4	27
4181	<i>UPF0304 protein yfbU</i>	4	25
1005	<i>Uncharacterized protein YjiM</i>	4	24
4786	<i>FIG004684: SpoVR-like protein</i>	4	23
5932	<i>Uncharacterized protein Pfl_4311</i>	4	23
4135	<i>UPF0381 protein YfcZ</i>	4	22
4812	<i>FIG00634680: hypothetical protein</i>	3	25
3634	<i>Uncharacterized protein YiaF</i>	3	19
2342	<i>Hypothetical protein</i>	3	14
1982	<i>Uncharacterized protein YjcZ</i>	3	12
5236	<i>Uncharacterized membrane protein YqjD</i>	2	23
5825	<i>Uncharacterized protein YdiJ</i>	2	19
2891	<i>Uncharacterized oxidoreductase, YajO family</i>	2	18
591	<i>Hypothetical protein</i>	2	17
2799	<i>Protein containing domains DUF404,DUF407</i>	2	11
3513	<i>FIG00921676: hypothetical protein</i>	2	10
2740	<i>FIG01201095: hypothetical protein</i>	2	10
4331	<i>Hypothetical protein</i>	2	7
4930	<i>Hypothetical protein</i>	2	7

^aLa señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa.

ANEXO C- PUBLICACIONES REALIZADAS A PARTIR DE ESTA TESIS

Taulé C, Castillo A, Villar S, Olivares F y Battistoni F. Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant and Soil* 403, 403–418(2016).

Taulé C, Luizzi H, Beracochea M, Mareque C, Platero R y Battistoni F. Biological nitrogen fixation is involved in the plant growth promotion of sugarcane plants by the endophyte *Kosakonia* sp. UYSO10. Enviado para su evaluación a la revista *Annals of Microbiology*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Turner TR, James EK, Poole PS: The plant microbiome. *Genome Biol* 14,209 (2013)
2. Lagunas B, Schäfer P, Gifford ML: Housing helpful invaders: The evolutionary and molecular architecture underlying plant root-mutualist microbe interactions. *J Exp Bot* 66,2177–2186 (2015)
3. Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ: Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends Microbiol* 18, 365–373 (2010)
4. Oldroyd GED: Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11,252–263 (2013)
5. Hartlova A, Krocova Z, Cerveny L, Stulik J: A proteomic view of the host-pathogen interaction: The host perspective. *Proteomics* 11,3212–3220 (2011)
6. Knief C, Delmontte N, Vorholt J: Bacterial adaptation to life in association with plants- A proteomic perspective from culture to in situ conditions. *Proteomics* 11,3086–3105 (2011)
7. Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM: The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17, 478–486 (2012)
8. Downie JA: The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34,150–170 (2010)
9. Badri D V. , Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM: Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20,642–650 (2009)
10. Gualtieri G, Bisseling T: The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol* 42,181–194 (2000)
11. Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, Ferreira PCG, Hemerly AS, Cheng Z, Silhavy TJ, Ruiz N, Kahne D, Rediers H, Bonnacarrère V, Rainey PB, Bonnacarre V, Hamonts K, Vanderleyden J, Peralta H, Aguilar A, Díaz R, Mora Y, Martínez-Batallar G, Salazar E, Vargas-Lagunas C, Martínez E, Encarnación S, Girard L, Mora J, Pankievicz VCCS, Camilios-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passeti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM, Schmid F, Biol C, Chen X, Miché L, Sachs S, Wang Q, Buschart A, Yang H, Vera Cruz CM, Hurek T, Reinhold-Hurek B, Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, Ferreira PCG, Hemerly AS, Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B, Cambiaghi A, Ferrario M, Masseroli M, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankievicz VCCS, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA, Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A, Hu J, Rampitsch C, Bykova N V. , Braun M, Silhavy TJ, Lodha TD, Hembram P, Basak NTJ, Cheng Z, Duan J, Hao Y, McConkey BJ, Glick BR, Alberton D, Muller-Santos M, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Cordeiro FA, Yates MG, De Oliveira Pedrosa F, de Souza EM, Ferrari CS, Amaral FP, Bueno JCF, Scariot MC, Valentim-Neto PA, Arisi ACM: 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 (2016)
12. Van der Wolf J, De Boer SH (2015): Phytopathogenic bacteria. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture*, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 65–78
13. Afroz A, Zahur M, Zeeshan N, Komatsu S: Plant-bacterium interactions analyzed by proteomics. *Front Plant Sci* 4,1–18 (2013)
14. Scheres B, Van Der Putten WH: The plant perceptron connects environment to development.

Nature 543,337–345 (2017)

15. Guttman DS, McHardy AC, Schulze-Lefert P: Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nat Rev Genet* 15,797–813 (2014)
16. Wilson D: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73,274–276 (1995)
17. Quadt-Hallmann A, Hallmann J, Kloepper JW: Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can J Microbiol* 43,254–259 (1997)
18. Reinhold-Hurek B, Hurek T: Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *CRC Crit Rev Plant Sci* 17, 29–54 (1998)
19. Malfanova N, Lugtenberg B, Berg G (2013): Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there? In: *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, de Bruijn FJ, ed. John Wiley and Sons, pp. 391–403
20. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW: Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43,895–914 (1997)
21. López-Fernández S, Sonego P, Moretto M, Pancher M, Engelen K, Pertot I, Campisano A: Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils similarities and differences between endophytes and other symbiotic bacteria. *Front Microbiol* 6,1–15 (2015)
22. Mitter B, Petric A, Shin MW, Chain PSG, Hauberg-Lotte L, Reinhold-Hurek B, Nowak J, Sessitsch A: Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front Plant Sci* 4,120 (2013)
23. Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, Ferreira PCG, Hemerly AS: Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J Exp Bot* 65,5631–5642 (2014)
24. Mercado-Blanco J (2015): Life of microbes inside the plant. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture*, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 25–32
25. James E: Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *F Crop Res* 65,197–209 (2000)
26. Vargas L, Brígida ABS, Mota Filho JP, De Carvalho TG, Rojas CA, Vaneechoutte D, Van Bel M, Farrinelli L, Ferreira PCG, Vandepoele K, Hemerly AS: Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS One* 9, e114744(2014)
27. Berger B, Brock AK, Ruppel S: Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. *Plant Soil* 370,641–652 (2013)
28. Oliveira ALM, Canuto EL, Silva EE, Reis VM, Baldani JI: Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian J Microbiol* 35,295–299 (2004)
29. Lugtemberg B, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013): Plant Growth promotion by microbes. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, de Bruijn FJ, ed. Wiley Blackwell, pp. 561–573
30. Lugtemberg B, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013): Microbial control of plant root disease. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, de Bruijn FJ, ed. Wiley Blackwell, pp. 575–586

31. Spaepen S (2015): Plant hormones produced by microbes. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 247–256
32. Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L: Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221,297–303 (2005)
33. Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, De La Cruz HR, Macías-Rodríguez L: Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 51,75–83 (2010)
34. Patten CL, Glick BR: Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiology* 42,207–220 (1996)
35. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R: Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31,425–448 (2007)
36. Glick BR (2015): Stress control and ACC deaminase. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 257–264
37. Adesemoye AO, Kloepper JW: Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85,1–12 (2009)
38. de Bruijn FJ (2015): Biological nitrogen fixation. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 215–224
39. Newton W (2015): Recent advances in understanding nitrogenases and how they work. In: Biological nitrogen fixation, de Bruijn FJ, ed. Wiley Blackwell, pp. 7–20
40. Poza-Carrión C, Echavarrri-Erasun C, Rubio LM (2015): Regulation of *nif* gene expression in *Azotobacter vinelandii*. In: Biological nitrogen fixation, de Bruijn FJ, ed. Wiley Blackwell, pp. 101–107
41. Barea J-M, Richardson M (2015): Phosphate mobilisation by soil microorganisms. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 225–234
42. Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013): Microbial control of plant root diseases. In: Molecular microbial ecology of the rhizosphere, de Bruijn FJ, ed. Wiley, pp. 391–403
43. Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J: Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321,513–535 (2009)
44. Bally R, Elmerich C (2007): Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. In: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, Elmerich C and Newton W, eds. Springer, pp. 171–190
45. Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënné-Loccoz Y: The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321,341–361 (2018)
46. Rosenblueth M, Martínez-Romero E: Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19, 827–837 (2006)
47. Haichar F el Z, Santaella C, Heulin T, Achouak W: Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77, 69–80 (2014)
48. Rudrappa T, Biedrzycki ML, Kunjeti SG, Donofrio NM, Czymbek KJ, Paul W: The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 153,130–138 (2010)

49. Baetz U, Martinoia E: Root exudates: the hidden part of plant defense Trends in Plant Science Root exudates - the hidden part of plant defense. Trends Plant Sci 19, 90–98 (2014)
50. Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD Van: Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol 16,463–471 (2008)
51. Coskun D, Britto DT, Shi W, Kronzucker HJ: How plant root exudates shape the nitrogen cycle. Trends Plant Sci 22,661–673 (2017)
52. Santi C, Bogusz D, Franche C: Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann Bot 111,743–767 (2013)
53. Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Camilios-Neto D, Brusamarello-Santos L, Balsanelli E, Weiss V, Baura VA, Wasseem R, Cruz LM, De Oliveira Pedrosa F, Souza EM, Monteiro RA: Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. Front Microbiol 6,491 (2015)
54. Webster G, Jain V, Davey MR, Gough C, Vasse J, Dénairié J, Cocking EC: The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. Plant cell Environ 21,373–383 (1998)
55. Rudrappa T, Czymmek KJ, Pare PW, Bais HP: Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol 148, 1547–1556 (2008)
56. Neal AL, Ahmad S, Gordon-Weeks R, Ton J: Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. PLoS One 7, e35498 (2012)
57. Vanbleu E, Vanderleyden J (2010): Molecular genetics of rhizosphere and plant-root colonization. In: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, Elmerich C and Newton WE, eds. Springer, pp. 85–112
58. Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B: Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Mol Plant Microbe Interact 20,526–533 (2007)
59. Balsanelli E, Serrato RVR, de Baura VA, Sasaki G, Yates MGM, Rigo LLU, Pedrosa FOF, de Souza EM, Monteiro RA: *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. Environ Microbiol 12,2233–2244 (2010)
60. Tadra-Sfeir MZ, Souza EM, Faoro H, Müller-Santos M, Baura VA, Tuleski TR, Rigo LU, Yates MG, Wasseem R, Pedrosa FO, Monteiro RA: Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. Appl Environ Microbiol 77, 2180–2183 (2011)
61. Meneses CHSG, Rouws LFM, Simoes-Araujo JL, Vidal MS, Baldani JI: Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Mol Plant Microbe Interact 24,1448–58 (2011)
62. Burdman S, Dulguerova G, Okon Y, Jurkevitch E: Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. Mol Plant-Microbe Interact 14,555–561 (2001)
63. Olivares FL: Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infeccao e colonizacao de plantas de cana-de-acucar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do genero *Herbaspirillum*. Tesis de Doctor en Filosofia en Agronomía, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro. Seropédica, Brasil (1997)
64. Angus AA, Hirsch AM (2013): Biofilm formation in the rhizosphere: multispecies interactions and implications for plant growth. In: Molecular microbial ecology of the rhizosphere, de Bruijn FJ, ed. John Wiley and Sons, pp. 701–712

65. Hurek T, Reinhold-Hurek B: *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J Biotechnol* 106,169–178 (2003)
66. Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka E: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71,1685–1693 (2005)
67. Hurek T, Reinhold-Hurek B (2005): Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plant: hidden activities of unknown bacteria. In: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and Environment*, Werner D and Newton WE, eds. Springer, pp. 173–198
68. Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM: *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil* 356,175–196 (2012)
69. Ambrosini A, de Souza R, Passaglia LMP: Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. *Plant Soil* 400,193–207 (2015)
70. Miché L, Battistoni F, Gemmer S, Belghazi M, Reinhold-Hurek B: Up-regulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 502–511 (2006)
71. Zipfel C, Oldroyd GED: Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543,328–336 (2017)
72. Trdá L, Fernandez O, Boutrot F, Héloir MC, Kelloniemi J, Daire X, Adrian M, Clément C, Zipfel C, Dorey S, Poinssot B: The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytol* 201,1371–1384 (2014)
73. Vinagre F, Vargas C, Schwarcz K, Cavalcante J, Nogueira EM, Baldani JJ, Ferreira PCG, Hemerly AS: SHR5: A novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot* 57, 559–569 (2006)
74. Carvalho TLG, Ferreira PCG, Hemerly AS: Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. *Trop Plant Biol* 4,31–41 (2011)
75. Compant S, Clément C, Sessitsch A: Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42,669–678 (2010)
76. Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Vêncio RZN, Vicentini R, Duarte RDC, de Rosa VE, Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH, Rodrigues F a, Ulian EC, Zingaretti SM, Galbiatti J a, Almeida RS, Figueira AVO, Hemerly AS, Silva-Filho MC, Menossi M, Souza GM: Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* 8, 71–78 (2007)
77. Lery LMS, Hemerly AS, Nogueira EM, von Krüger WM a, Bisch PM: Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant-Microbe Interact* 24,562–576 (2011)
78. Iniguez a L, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW: Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 169–78 (2005)
79. Cavalcante JJ V, Vargas C, Nogueira EM, Vinagre F, Schwarcz K, Baldani JJ, Ferreira PCG, Hemerly a S: Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *J Exp Bot* 58, 673–686 (2007)
80. Alberton D, Muller-Santos M, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Cordeiro FA, Yates MG, De

- Oliveira Pedrosa F, De Souza EM: Comparative proteomics analysis of the rice roots colonized by *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 reveals induction of the methionine recycling in the plant host. *J Proteome Res* 12,4757–4768 (2013)
81. Fabiano E, Arias A: Identification of inoculant strains and naturalized populations of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* using complementary methodologies. *World J Microbiol Biotechnol* 6,121–126 (1990)
 82. Monza J, Fabiano E, Arias A: Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol Biochem* 24,241:247 (1992)
 83. Platero R, Peixoto L, Battistoni F, Fabiano E: Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* 218, 65–70 (2003)
 84. Platero R, Peixoto L, O'Brian M, Fabiano E: Fur is involved in manganese-dependent regulation of *mntA* (*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environmental Microbiol* 70,4349–4355 (2004)
 85. Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, Frioni L, Battistoni F, Fabiano E: New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Appl Environmental Microbiol* 78, 1692–1700 (2012)
 86. Platero R, Rios C, James EK, Iriarte A, Zabaleta M, Battistoni F, Fabiano E: Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of native Uruguayan *Mimosa* species. *Appl Environmental Microbiol* 82,3150–3164 (2016)
 87. Battistoni F, Platero R, Noya F, Arias A, Fabiano E: Intracellular iron content of *Sinorhizobium meliloti* influences nodule competitiveness of alfalfa plants. *Soil Biol Biochem* 34,593–597 (2002)
 88. Battistoni F, Platero RA, Duran R, Cerveñansky C, Battistoni J, Arias A, Fabiano E: Identification of an iron-regulated, hemin-binding outer membrane protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 68, 5877–5881 (2003)
 89. Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis VM, Sicardi M, Battistoni F: The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356,35–49 (2012)
 90. de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, Beracochea M, Battistoni F: 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 (2015)
 91. Rosconi F, Davyt D, Martinez V, Martinez M, Abin-Carriquiry JA, Zane H, Butler A, De Souza E, Fabiano E: Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ Microbiol* 15,916–927 (2013)
 92. Mareque C, Taulé C, Beracochea M, Battistoni F: Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann Microbiol* 65,1057–1067 (2015)
 93. Taulé C: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Biología, Montevideo, Uruguay(2011)
 94. Barlocco C: Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.): bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aporte a la fijación de nitrógeno. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Biología, Montevideo, Uruguay (2012)
 95. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P: Taxonomic evaluation of the genus

- Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 36,309–319 (2013)
96. Ruppel S, Merbach W: Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp. in bacterial pure culture: An investigation using ¹⁵N₂ incorporation and acetylene reduction measures. *Microbiol Res* 150,409–418 (1995)
 97. Schilling G, Gransee A, Deuhel A, Ležovič G, Ruppel S: Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkd* 161,465–478 (1998)
 98. Brock AK, Berger B, Mewis I, Ruppel S: Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on growth, glucosinolate profile, and immune responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microb Ecol* 65,661–670 (2013)
 99. Berger B, Wiesner M, Brock AK, Schreiner M, Ruppel S: *K. radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agron Sustain Dev* 35,1521–1528 (2015)
 100. Rouws LFM, Leite J, Feitosa de Matos G, Zilli J, Reed Rodrigues Coelho M, Ribeiro Xavier G, Fischer D, Hartmann A, Reis VM, Baldani I: Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. *Environ Microbiol Rep* 6,354–363 (2014)
 101. Burbano CS, Liu Y, Rösner KL, Reis VM, Caballero-Mellado J, Reinhold-Hurek B, Hurek T: Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. *Environ Microbiol Rep* 3,383–389 (2011)
 102. Fischer D, Pfitzner B, Schmid M, Simões-Araújo JL, Reis VM, Pereira W, Ormeño-Orrillo E, Hai B, Hofmann A, Schloter M, Martinez-Romero E, Baldani JI, Hartmann A: Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Soil* 356,83–99 (2012)
 103. Soenens A, de la Peña S, Imperial J (2016): Characterisation of symbiotic and non-symbiotic rhizobial diversity in an agricultural soil. In: 12th European Nitrogen Fixation Conference, p. 238
 104. Ponce P (1991): Cultivos de tejidos en caña de azúcar. In: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*, WMR and LAM, eds. CIAT Colombia, pp. 543–575
 105. Garcia R, Cidade D, Castellar A, Magioli C, Callado C, Mansur E: *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90,181–190 (2007)
 106. Kim SJS-J, Lee C-MCM, Han B-RBR, Kim M-YMY, Yeo Y-SYS, Yoon SHS-H, Koo B-SBS, Jun H-KHK: Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 282,44-51 (2008)
 107. Battistoni FJ, Sicardi M, Taulé C, Barlocco C, Mareque C, Hackembruch F: INFORME FINAL DEL PROYECTO: FPTA-275 Producción sustentable en caña de azúcar : bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales. INIA Serie FPTA-INIA 54(2012)
 108. Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C: Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. *Mol plant-microbe Interact* 14,358–366 (2001)
 109. Platero R, de Lorenzo V, Garat B, Fabiano E: *Sinorhizobium melloti* Fur like (Mur) protein binds a Fur box like sequence present in the *mntA* promoter in a manganese responsive manner. *Appl Environmental Microbiol* 73,4832–4838 (2007)

110. Castro-Sowinski S, Martinez-Drets G, Okon Y: Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiol Lett 209, 119–125 (2002)
111. Pedrosa O, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, Madeira HMF, Nodari RO, Osaku CA, Petzl-Erler ML, Terenzi H, Vieira LGE, Steffens MBR, Weiss VA, Pereira LF, Almeida MIM, Alves LR, Marin A, Araujo LM, Balsanelli E, Baura VA, Chubatsu LS, Faoro H, Favetti A, Friedermann G, Glienke C, Karp S, Kava-cordeiro V, Raittz RT, Ramos HJ, Ribeiro EMSF, Rigo LU, Rocha SN, Schwab S, Silva AG, Souza EMEM, Tadra-sfeir MZ, Torres RA, Dabul ANG, Soares MA, Gasques LS, Gimenes CCT, Valle JS, Ciferri RR, Correa LC, Murace NK, Pamphile J, Patussi E, Prioli AJ, Prioli SMA, Rocha C, Arantes OMN, Furlaneto M. , Godoy LP, Oliveira CEC, Satori D, Vilas-boas LA, Watanabe M, Dambros P, Guerra MP, Mathioni SM, Santos KL, Steindel M, Vernal J, Barcellos FG, Campo RJ, Chueire LMO, Nicolás FM, Pereira-Ferrari L, Silva J, Gioppo N, Margarido V, Menck-Soares M, Pinto FGS, Simao R, Takahashi E, Yates MG: Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1,a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. PLoS Genet 7, 1–10 (2011)
112. Rosconi F, Trovero F, De Souza E, Fabiano E: Serobactins mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. Environ Microbiol 18, 2523–2533 (2015)
113. Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Can J Microbiology 40,911–915 (1994)
114. Martinez-Rosales C, Castro-Sowinsky S: Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. Polar Res 30,1–8 (2011)
115. Kiiskinen LL, Ratto M, Kruus K: Screening for novel laccase-producing microbes. J Appl Microbiol 97, 640–646 (2004)
116. Sack U, Hofrichter M, Fritsche W: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardi*. FEMS Microbiol Lett 152,227–234 (1997)
117. Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Arijó S, Martínez-Manzanares E, Moriñigo MA, Balebona MC: Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. J Fish Dis 29, 355–364 (2006)
118. Penrose DM, Glick BR: Technical focus Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol Plant 118, 10–15 (2003)
119. Blaha D, Prigent-Combaret C, Mirza MS, Moëgne-Loccoz Y: Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. FEMS Microbiol Ecol 56,455–470 (2006)
120. Ali SZ, Sandhya V, Linga Venkateswar R: Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. Ann Microbiol 64,493–502 (2014)
121. Rashid MH, Kornberg A: Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 97, 4885–4890 (2000)
122. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T: Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods 72,157–165 (2008)
123. Reis VM, Olivares FL, de Oliveira ALM, dos Reis Junior FB, Baldani JI, Dobereiner J: Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. Plant Soil 206,205–211 (1999)

124. Callejas MC: Caracterización ecofisiológica de matas microbianas denominadas por Cianobacterias en suelos de la isla Rey Jorge: Antártida Marítima. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Biología, Montevideo, Uruguay (2011)
125. Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cabadilla CF, Ortega E, Rodes R: A Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (A new role for the apoplast). *Plant Physiol* 105,1139–1147 (1994)
126. James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JI, Dobereiner J: Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45,757–766 (1994)
127. James EK, Olivares FL, de Oliveira a L, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM: Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52,747–760 (2001)
128. Njoloma J, Tanaka K, Shimizu T, Nishiguchi T, Zakria M, Akashi R, Oota M, Akao S: Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. *Biol Fertil Soils* 43,137–143 (2006)
129. Kim J, Lim J, Lee C: Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv* 31,1358–1373 (2013)
130. Harshey RM: Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57, 249–73 (2003)
131. Buschart A, Sachs S, Chen X, Herglotz J, Krause A, Reinhold-Hurek B: Flagella Mediate Endophytic Competence Rather Than Act as MAMPS in Rice– *Azoarcus* sp. Strain BH72 Interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* 25,191–199 (2012)
132. Dörr, J, Hurek T, Reinhold-Hurek B: Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol Microbiol* 30,7–17 (1998)
133. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C: Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4,1–19 (2013)
134. Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T: An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol plant-microbe Interact* 19, 181–188 (2006)
135. James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquío WL, Reddy PM, Iannetta PPM, Olivares FL, Ladha JK: Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant-Microbe Interact* 15,894–906 (2002)
136. Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A: The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus*PAL5. *Mol Plant Microbe Interact* 26,937–945 (2013)
137. Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, Schenk PM: Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front Microbiol* 8, 2552 (2017)
138. Asis C a. , Shimizu T, Khan MK, Akao S: Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Sci Plant Nutr* 49, 915–920 (2003)
139. Mareque C: Caracterización de la población endófito bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Biología. Montevideo, Uruguay (2014)

140. Chi F, Shen S-H, Cheng H, Jing Y-X, Yanni YG, Dazzo FB: Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl Environ Microbiol* 71,7271–7278 (2005)
141. Mehboob I, Naveed M, Zahir ZA: Rhizobial association with non-legumes: Mechanisms and applications. *CRC Crit Rev Plant Sci* 28, 432–456 (2009)
142. García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Fernández MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix Á, Velázquez E: *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One* 7, e3812(2012)
143. Gutierrez-Zamora ML, Martínez-Romero E: Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* 91,117–126 (2001)
144. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72,248–254 (1976)
145. Alban A, David S, Bjorkestén L: A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3,36–44 (2003)
146. Unlu M, Morgan ME, Minden JS: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071–2077 (1997)
147. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M, Jensen, Lars Juhl von Mering C, Bork P: eggNOG 4. 5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res* 44,286–293 (2016)
148. Yu N. , Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL: PSORTb 3. 0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26,1608–1615 (2010)
149. Yu CS, Lin CJ, Hwang JK: Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* 13,1402–1406 (2004)
150. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res* 25,3389–3402 (1997)
151. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang H-Y, Dosztányi Z, El-Gebali S, Fraser M, Gough J, Haft D, Holliday GL, Huang H, Huang X, Letunic I, Lopez R, Lu S, Marchler-Bauer A, Mi H, Mistry J, Natale DA, Necci M, Nuka G, Orengo CA, Park Y, Pesseat S, Piovesan D, Potter SC, Rawlings ND, Redaschi N, Richardson L, Rivoire C, Sangrador-Vegas A, Sigrist C, Sillitoe I, Smithers B, Squizzato S, Sutton G, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Xenarios I, Yeh L-S, Young S-Y, Mitchell AL: InterPro in 2017 — beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res* 45,190–199 (2017)
152. The Uniprot Consortium: UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 45,D158–D169 (2017)
153. Liu H, Sadygov RG, Yates JR: A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 76,4193–4201 (2004)
154. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost, Felipe V Santos, Marlon D. M. Fischer, Juliana S. G. Aquino PF, Moresco JJ, Yates III, John R. Barbosa VC: Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4. 0. *Nat Protoc* 11,102–117 (2016)

155. Lugtenberg B (2015): Life of microbes in the rhizosphere. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture. , Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 7–16
156. Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G: Plant-driven selection of microbes. Plant Soil 321,235–257 (2009)
157. Badri D V. , Vivanco JM: Regulation and function of root exudates. Plant cell Environ 32,666–681 (2009)
158. Witzel K, Strehmel N, Baldermann S, Neugart S, Becker Y, Becker M, Berger B, Scheel D, Grosch R, Schreiner M, Ruppel S: *Arabidopsis thaliana* root and root exudate metabolism is altered by the growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* DSM 16656^T. Plant Soil 419, 557–573 (2017)
159. Mark GL, Dow JM, Kiely PD, Higgins H, Haynes J, Baysse C, Abbas A, Foley T, Franks A, Morrissey J, O’Gara F: Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. Proc Natl Acad Sci 102,17454–17459 (2005)
160. Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankievicz VC, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA: Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. Environ Microbiol 18, 2343–2356 (2016)
161. Pankievicz VCS, Camilios-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passetti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM: RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. Plant Mol Biol 90,589–603 (2016)
162. Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Yeoh YK, Donose BC, Webb RI, Parsons J, Liao W, Sagulenko E, Lakshmanan P, Hugenholtz P, Schmidt S, Ragan MA: Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting *Burkholderia* species. Sci Rep 6,37389 (2016)
163. Cheng Z, Duan J, Hao Y, McConkey BJ, Glick BR: Identification of Bacterial Proteins Mediating the Interactions Between *Pseudomonas putida* UW4 and *Brassica napus* (Canola). Mol Plant-Microbe Interact 22,686–694 (2009)
164. Shidore T, Dinse T, Ohrlein J, Becker A, Reinhold-Hurek B: Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Environ Microbiol 14,2775–2787 (2012)
165. Cordeiro FA, Tadra-Sfeir MZ, Huergo LF, De Oliveira Pedrosa F, Monteiro RA, De Souza EM: Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. J Proteome Res 12,1142–1150 (2013)
166. Witzel K, Üstün S, Schreiner M, Grosch R, Börnke F, Ruppel S: A proteomic approach suggests unbalanced proteasome functioning induced by the growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* in *Arabidopsis*. Front Plant Sci 8, 661 (2017)
167. Lery LMS, von Krüger WMA, Viana FC, Teixeira KRS, Bisch PM: A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics 1784,1578–1589 (2008)
168. Dos Santos MF, Muniz de Padua VL, Nogueira EDM, Silva Hemerlyd A, Barbosa Domont G: Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. J Proteomics 73,917–931 (2010)
169. Hauberg L, Schmidt F, Scharf C, Dörr J, Völker U, Reinhold-Hurek B: Proteomic characterization of a pilR regulatory mutant of *Azoarcus* sp. strain BH72 with the aid of gel-based and gel-free approaches. Proteomics 10,458–469 (2010)

170. Kierul K, Voigt B, Albrecht D, Chen XH, Carvalhais LC, Borriss R: Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology* 161,131–147 (2015)
171. Sabri S, Nielsen LK, Vickers CE: Molecular control of sucrose utilization in *Escherichia coli* W, an efficient sucrose-utilizing strain. *Appl Environ Microbiol* 79, 478–487 (2013)
172. Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LGP, Ollero FJ, Nicolás MF, Pains Rodrigues E, Shigueyoshi Nakatani A, Silva Batista JS, Oliveira Chueire LM, Souza RC, Ribeiro Vasconcelos AT, Megías M, Hungria M, Martínez-Romero E: Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13,735 (2012)
173. Warren CR: Wheat roots efflux a diverse array of organic N compounds and are highly proficient at their recapture. *Plant Soil* 397, 147–162 (2015)
174. Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, Bender RA, Kustu S: Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14674–14679 (2000)
175. Tejera N, Ortega E, Rodes R, Lluch C: Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. *J Plant Physiol* 163,80–85 (2006)
176. Castillo A, Taboada H, Mendoza A, Valderrama B, Encarnación S, Mora J: Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli*. *Microbiology* 146,1627–1637 (2000)
177. Nachin L, Nannmark U, Nyström T, Nystro T: Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion and Motility. *J Bacteriol* 187, 6265–6272 (2005)
178. Yao J, Allen C: The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J Bacteriol* 189, 6415–6424 (2007)
179. Xie Z, Ulrich LE, Zhulin IB, Alexandre G: PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *PNAS* 107, 2235–2240 (2010)
180. Boller T, Felix G: A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60,379–406 (2009)
181. Ogawa J, Long SR: The *Rhizobium meliloti*ELc locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev* 9, 714–729 (1995)
182. Sheibani-Tezerji R, Rattei T, Sessitsch A, Trognitz F, Mitter B: Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans*PSJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio* 6,e00621-15 (2015)
183. Ryu C-M (2015): Bacterial volatiles as airborne signals for plants and bacteria. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture*, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 53–62
184. Ryu C-M, Farag MA, Hu C, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 100,4927–4932 (2003)
185. Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, Zhang Y-B, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S: Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet* 6,e1000943 (2010)
186. Coleman SA, Minnick MF: Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (Ia1B) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect Immun* 69, 4373–4381

(2001)

187. Coleman SA, Minnick MF: Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. *Microb Pathog* 34,179–186 (2003)
188. Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Pühler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thébault P, Vandenbol M, Weidner S, Galibert F: Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *PNAS* 98, 9877–9882 (2001)
189. Drogue B, Sanguin H, Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyé F: Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS Microbiol Ecol* 87, 543–555 (2014)
190. Battistoni F: From genomics to proteomics in *Azoarcus* sp. BH72,a N₂-fixing endophytic bacterium. Tesis de doctor en Filosofía en Ciencias Naturales, Universidad de Bremen, Alemania (2006)
191. Alexandre G, Zhulil IB (2007): Chemotaxis in soil diazotrophs: survival and adaptative response. In: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, Elmerich C and Newton W, eds. Springer, pp. 73–84
192. Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Dow JM: Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol* 188, 8327–8334 (2006)
193. Matilla MA, Espinosa-Urgel M, Rodríguez-Herva JJ, Ramos JL, Ramos-González MI: Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* 8, R179 (2007)
194. Clarke DJ (2012): The Rcs phosphorelay: biofilm formation and virulence in the Enterobacteriaceae. In: Two-component system in bacteria, Caister Academic Press
195. Ferrières L, Clarke DJ: The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol* 50,1665–1682 (2003)
196. Mougous JD, Gifford CA, Ramsdell TL, Mekalanos JJ: Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol* 9, 797–803 (2007)
197. Kim KH, Aulakh S, Paetzel M: The bacterial outer membrane β -barrel assembly machinery. *Protein Sci* 21,751–768 (2012)
198. Tao J, Sang Y, Teng Q, Ni J, Yang Y, Tsui SKW, Yao YF: Heat shock proteins IbpA and IbpB are required for NlpI-participated cell division in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 6,51 (2015)
199. Isom GL, Davies NJ, Chong ZS, Bryant JA, Jamshad M, Sharif M, Cunningham AF, Knowles TJ, Chng SS, Cole JA, Henderson IR: MCE domain proteins: Conserved inner membrane lipid-binding proteins required for outer membrane homeostasis. *Sci Rep* 7, 8608 (2017)
200. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon J, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Bernardini A, Sanchez M, Martinez J: Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* 4,14 (2016)
201. Balsanelli E, De Baura VA, De Oliveira Pedrosa F, De Souza EM, Monteiro RA: Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. *PLoS One* 9, e110392 (2014)
202. Harfouche L, Haichar F el Z, Achouak W: Small regulatory RNAs and the fine-tuning of plant-

- bacteria interactions. *New Phytol* 206,98–106 (2015)
203. Krämer R: Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem Rec* 10,217–229 (2010)
 204. Sasse J, Martinoia E, Northen T: Feed your friends: Do plant exudates shape the root Mmicrobiome? *Trends Plant Sci* 23,25–41 (2018)
 205. D'Alessandro M, Erb M, Ton J, Brandenburg A, Karlen D, Zopfi J, Turlings TCJ: Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant, Cell Environ* 37, 813–826 (2014)
 206. Borisov VB, Gennis RB, Hemp J, Verkhovskiy MI: The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Bioch* 1807, 1398–1413 (2011)
 207. Pedrosa FO, Elmerich C (2007): Regulation of nitrogen fixation and ammonium assimilation. In: *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*, pp. 41–71
 208. Segonzac C, Boyer J-C, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B, Sommerer N, Rossignol M, Gibrat R: Nitrate efflux at the root plasma membrane: Identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell Online* 19, 3760–3777 (2007)
 209. Tommassen J, Wosten HAB (2015): Microbial cell surfaces and secretion systems. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture.*, Lugtenberg B, ed. Springer, pp. 33–44
 210. Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC: Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 9, Suppl 1 S2 (2009)
 211. Reinhold-Hurek B, Hurek T: Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14,435–443 (2011)
 212. Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B: Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant-Microbe Interact* 25,28–36 (2012)
 213. Platero RA (2014): Informe proyecto ANII FCE 6580. Aplicación de herramientas moleculares sintéticas para el estudio de las interacciones bacteria-organismo hospedero.
 214. Martínez-García E, de Lorenzo V: Transposon-based and plasmid-based genetic tools for editing genomes of Gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol* 813,267–283 (2012)
 215. Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC: The acetylene-ethylene assay for n(2) fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43,1185–1207 (1968)
 216. APHA (1985): Standar methods for the examination of water and wastewater. Washington
 217. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW: InfoStat versión 2015, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>(2015)
 218. Boddey RM, Polidoro JC, Resende AS, Alves BJR, Urquiaga S: Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. *Aust J Plant Physiol* 28, 889–895 (2001)
 219. Boddey RM, Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, Dobereiner J: Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174,195–209 (1995)

220. de-Bashan LE, Hernandez J-PP, Bashan Y, Maier RM: *Bacillus pumilus* ES4 : Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ Exp Bot* 69, 343–352 (2010)
221. Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y: *Azoarcus*grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant-Microbe Interact* 15,233–242 (2002)
222. You M, Nishiguchi T, Saito A, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K: Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum*endophyte in wild rice species: Daily rhythm during the light-dark cycle. *Appl Environ Microbiol* 71,8183–8190 (2005)
223. Egener T, Hurek T, Reinhold-Hurek B: Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72,a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Mol Plant-Microbe Interact* 11,71–75 (1998)
224. Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye BIN, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K: Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* 67, 5285–5293 (2001)
225. Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM: Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol Ecol* 45,39–47 (2003)
226. Thaweenut N, Hachisuka Y, Ando S, Yanagisawa S, Yoneyama T: Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. *Plant Soil* 338, 435–449 (2010)
227. Iniguez a L, Dong Y, Triplett EW: Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol Plant-Microbe Interact* 17, 1078–1085 (2004)
228. Glazer AN, Kechris K, Howard JB (2015): Distribution and ecological niches of nitrogenases. In: *Biological nitrogen fixation*, de Bruijn FJ, ed. Wiley, pp. 87–98
229. Joerger RD, Loveless TM, Pau RN, Mitchenall LA, Simon BH, Bishop PE: Nucleotide sequences and mutational analysis of the structural genes for nitrogenase 2 of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 172,3400–3408 (1990)
230. Hamilton TL, Ludwig M, Dixon R, Boyd ES, Dos Santos PC, Setubal JC, Bryant DA, Dean DR, Peters JW: Transcriptional profiling of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 193,4477–4486 (2011)
231. Schneider K, Muller A, Schramm U, Klipp W: Demonstration of a molybdenum and vanadium independent nitrogenase in a *nifHDK* deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *EurJBiochem* 195,653–661 (1991)
232. Walmsley J, Kennedy C: Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* 57, 622–624 (1991)
233. Zhang X, McRose DL, Darnajoux R, Bellenger JP, Morel FMM, Kraepiel AML: Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications. *Biogeochemistry* 127, 189–198 (2016)
234. Oda Y, Samanta SK, Rey FE, Yan T, Zhou J, Harwood CS: Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 187, 7784–7794 (2005)
235. McRose DL, Zhang X, Kraepiel AML, Morel FMM: Diversity and activity of alternative nitrogenases in sequenced genomes and coastal environments. *Front Microbiol* 8, 267 (2017)

236. Lehman LJ, Roberts GP: Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* 173,5705–5711 (1991)
237. Ekanjo LK, Ruppel S, Remus R, Witzel K, Patz S, Becker Y: Site-directed mutagenesis to deactivate two nitrogenase isozymes of *Kosakonia radicincitans* DSM16656^T. *Can J Microbiology* 64,97–106 (2018)
238. Bergottini VM, Filippidou S, Junier T, Johnson S, Chain PS, Otegui MB, Zapata PD, Junier P: Genome sequence of *Kosakonia radicincitans* strain YD4, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). *Genome Announc* 3,e00239-15 (2015)
239. Kämpfer P, Ruppel S, Remus R: *Enterobacter radicincitans* sp. nov. , a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol* 28, 213–221 (2005)
240. Ruppel S, Hecht-Buchholz C, Remus R, Ortmann U, Schmelzer R: Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant Soil* 145,261–273 (1992)
241. Witzel K, Gwinn-Giglio M, Nadendla S, Shefchek K, Ruppel S: Genome sequence of *Enterobacter radicincitans* DSM16656(T), a plant growth-promoting endophyte. *J Bacteriol* 194,5469 (2012)
242. Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q: Plant growth-promoting nitrogen-fixing *Enterobacteriaceae* in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ* 27, 391–398 (2012)
243. Madhaiyan M, Peng N, Te NS, Hsin I C, Lin C, Lin F, Reddy C, Yan H, Ji L: Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species. *Biotechnol Biofuels* 6,140 (2013)
244. Li Y, Li S, Chen M, Peng G, Tan Z, An Q: Complete genome sequence of *Kosakonia oryzae* type strain Ola 51T. *Stand Genomic Sci* 12,8–11 (2017)
245. Josey DP, Beynon JL, Johnston AWB, Beringer JE: Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J Appl Bacteriol* 46,343–350 (1979)
246. Sambrook E, Fritsch F, Maniatis J (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York
247. Baldani JI, Baldani VLD, Sampaio MJAM, Doberainer J: A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An Acad Bras Cienc* 256–265 (1984)
248. Mirza BS, Rodrigues JL: Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. *Appl Environ Microbiol* 78, 5542–5549 (2012)
249. Schwyn B, Neilands JB: Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160,47–56 (1987)
250. Avakyan ZA, Pivovarova TA, Shinner F: Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya* 55,477–482 (1986)
251. Murashige T, Skooge F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15,473–497 (1962)
252. Lin A, Staba EJ: Peppermint and spearmint tissue cultures I. Callus formation and submerged culture. *Lloydia* 24,139–145 (1961)