



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Trabajo final de carrera

“Métodos de conservación de grano de variedades criollas de *Zea mays* y sus efectos sobre las comunidades microbianas endófitas”

Bach. Timothy Riley

Laboratorio de Microbiología de Suelos
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales

Tutora: Msc. Tania Trasante

Co-tutora: PhD. Patricia Vaz Jauri

Agosto de 2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutoras Tania y Paty, cuyo apoyo y orientación fueron fundamentales para la realización de este trabajo. A mis amigos y compañeros, gracias por compartir este viaje conmigo, por sus consejos y por los momentos de distracción que tanto necesitaba. También quiero reconocer a las diferentes fuentes de inspiración que me motivaron y guiaron a lo largo de esta investigación. Finalmente, pero con especial gratitud, quiero agradecer a mi familia, cuyo amor y apoyo incondicional me han sostenido en cada paso del camino. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

Índice

Agradecimientos	2
Índice	3
Resumen	4
Introducción	5
Las comunidades microbianas endófitas y las interacciones en comunidades.....	5
Los microorganismos y su participación en la disponibilidad de nutrientes.....	8
Otras funciones promotoras del crecimiento vegetal.....	10
El modelo de estudio.....	12
Hipótesis	13
Objetivos	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	14
Materiales y métodos	14
Selección de las semillas de maíz.....	14
Diseño experimental para evaluar las estrategias de conservación.....	15
Preparación de las muestras: desinfección superficial y macerados.....	15
Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional del microbioma endófito de semilla.....	16
Cultivo de bacterias endófitas y determinaciones de abundancia.....	16
Aislamiento de morfotipos	17
Determinación de características de interés biotecnológico en aislamientos de la colección.....	17
Identificación de aislamientos de la colección.....	18
Análisis de datos.....	18
Resultados	19
Recuentos en placa.....	19
Diversidad microbiana.....	20
Tasa de germinación.....	22
Determinación de propiedades metabólicas de interés biotecnológico.....	23
Identificación de aislamientos de la colección.....	26
Discusión y perspectivas	26
Conclusiones	30
Bibliografía	31
ANEXO	37
Composición de los medios de cultivo utilizados:.....	37
Calibración de curva de absorbancia a 536 nm para AIA.....	39

Resumen

El maíz (*Zea mays*) es una de las plantas más emblemáticas en la historia de la agricultura y un componente esencial de la seguridad alimentaria a nivel mundial. Su cultivo extendido ha generado un interés continuo en mejorar su rendimiento y resistencia a factores bióticos y abióticos. En este contexto, el desafío radica en el desarrollo de nuevas tecnologías y prácticas agrícolas que no solo aumenten la productividad del maíz, sino que también mejoren su resistencia frente a las condiciones cambiantes del entorno. Estas innovaciones representan una oportunidad clave para asegurar la sostenibilidad del cultivo y, por ende, su papel fundamental en la seguridad alimentaria.

Este trabajo aborda el efecto de diferentes estrategias de conservación de semillas de razas criollas de maíz en las comunidades microbianas endófitas y su relación con las tasas de germinación. Se basa en la hipótesis de que las variedades criollas de maíz han desarrollado vínculos con microorganismos propios de las áreas donde se cultivan. Los objetivos incluyen caracterizar la diversidad taxonómica de las comunidades bacterianas endófitas cultivables, evaluar propiedades metabólicas de interés biotecnológico y determinar la relación entre las estrategias de conservación, las comunidades microbianas, y la viabilidad de las semillas.

Se observó una respuesta variable de las variedades de maíz a los distintos métodos de conservación empleados, sugiriendo la necesidad de adoptar estrategias de conservación específicas para cada variedad. Se destaca la sensibilidad de la composición de las comunidades de actinobacterias endófitas a los métodos de conservación de grano y la relación que guardan la diversidad en las comunidades microbianas con las tasas de germinación. Aunque hubo dificultades en la extracción de ADN de los microorganismos aislados, se plantea la posibilidad de realizar la secuenciación del gen ARNr 16S para su identificación taxonómica, lo cual es importante al momento de evaluar su potencial como bioinsumo para la agricultura.

Se resalta la relevancia de los hallazgos para optimizar prácticas agrícolas y mejorar el rendimiento de los cultivos, tanto en la conservación del microbioma endófito como en la tasa de germinación. Se sugiere que estudios futuros con muestras más grandes podrían aclarar la relación entre tratamientos y la diversidad de microorganismos, y su aplicación en prácticas agrícolas.

Introducción

Las comunidades microbianas endófitas y las interacciones en comunidades

El término “endófito” fue utilizado por primera vez por De Barry en 1866 para referirse a todos los microorganismos que viven dentro de las plantas. Los microorganismos endófitos son bacterias y hongos que crecen y residen por parte de o durante todo su ciclo de vida dentro de los tejidos de una planta hospedera sin que ésta muestre síntomas de enfermedad o efectos negativos en sus tejidos (Pal et al., 2019). Estos microorganismos pueden colonizar diversas partes de la planta, incluyendo raíces, tallos, hojas, y semillas.

Hay dos tipos básicos de asociaciones de microorganismos en cuanto a su inclusión en la semilla, aquellos soportados sobre la superficie de la semilla y aquellos que residen dentro de la semilla, o endófitos (Martinez-Rodriguez et al., 2019). Ambos grupos son importantes para la evolución de las comunidades microbianas de la plántula y de los estadios de desarrollo vegetales tempranos (Taulé et al., 2021). Estos microorganismos transportados por las semillas pueden ser bacterias, hongos, virus y oomycetes. La persistencia de estos microorganismos depende la habilidad de colonizar los distintos tejidos del organismo vegetal, de colonizar el suelo en el que germina la semilla y de competir con los microorganismos presentes en el suelo y en la endosfera (Martinez-Rodriguez et al., 2019; Taulé et al., 2021).

Las comunidades son grupos de microorganismos que coexisten e interactúan en un entorno específico (Perry et al., 2008). Las comunidades microbianas endófitas están conformadas por los microorganismos que se desarrollan en los tejidos internos de la planta hospedera. Las comunidades pueden ser descritas en función de la diversidad de los organismos que las componen evaluando su composición usando descriptores como riqueza y abundancia: la riqueza es un descriptor que cuantifica el número de especies presentes en una comunidad y la abundancia cuantifica el número de individuos de cada una de las especies.

En las comunidades los organismos no sólo coexisten, sino que se relacionan interactuando entre individuos y entre especies de diferentes maneras tanto a la escala de los microorganismos como inter-escala. Es así que los microorganismos interactúan entre sí y con sus plantas hospederas, definiendo al holobionte como unidad funcional que incluye a la planta hospedera y toda su microbiota asociada (Lyu et al., 2021).

Las interacciones entre los organismos intra o inter escala se suelen catalogar en los estudios de ecología en base al tipo de retroalimentación que exista entre las partes, pudiendo ocurrir dos tipos de retroalimentación: positiva (+) y negativa (-). La retroalimentación positiva implica un beneficio para una de las partes y la retroalimentación negativa implica un perjuicio para una de las partes (Perry et al., 2008). Algunos de los tipos de interacciones interespecíficas en comunidades de microorganismos pueden ser competencia cuando los microorganismos compiten por recursos como nutrientes y espacio (-,-), mutualismo cuando los microorganismos tienen relaciones simbióticas beneficiosas para ambas partes (+,+), antagonismo cuando alguna especie produce compuestos que inhiben el crecimiento de otras especies (0,-), comensalismo cuando un microorganismo se beneficia sin afectar significativamente al otro (0,+) y parasitismo cuando uno de los microorganismos obtiene un beneficio de la interacción a expensas de producirle un efecto adverso al otro (+,-).

Las complejas interacciones entre los diferentes grupos de organismos que componen estas comunidades y de las interacciones entre estas comunidades y las plantas hospedadoras se configura el entorno en el que se desarrollan (Wani et al., 2015). Las estructuras de las comunidades microbianas están moldeadas por factores ambientales como la humedad, la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes (K. Zhang et al., 2020). Estos factores influyen en la composición, diversidad y funcionalidad de los microorganismos presentes en ecosistemas determinados (Berg & Smalla, 2009; K. Zhang et al., 2020).

El microbioma de la semilla tiene la particularidad de ser transmitido desde los organismos parentales hacia la progenie y entre sucesivas generaciones vía transmisión vertical, asegurando su presencia en la próxima generación de plántulas (Shahzad et al., 2018). Así, el holobionte podría pensarse que es resultado de la

coevolución entre ellos (Lyu et al., 2021). La presencia de microorganismos en las semillas y su dispersión junto con ellas es de particular importancia en moldear la comunidad de microorganismos en la planta juvenil, y podría ser visto como el inóculo inicial para la microbiota asociada a la planta adulta (Martinez-Rodriguez et al., 2019). Estos microorganismos pueden poseer rasgos beneficiosos que confieran ventajas a sus anfitriones (Vaz Jauri et al., 2020; K. Zhang et al., 2020; P. Zhang et al., 2019). Estos rasgos de los microorganismos pueden llevar a la promoción del crecimiento vegetal (PCV) y una mayor supervivencia de las plantas a través de la inhibición de organismos patógenos y plagas de invertebrados, la eliminación de contaminantes del suelo, incluidos los metales pesados, aumento de la tolerancia de las plantas a temperaturas extremas y baja disponibilidad de agua (Card et al., 2016).

La rizósfera es un ambiente complejo en el suelo, es la región del suelo bajo la influencia de las raíces de las plantas. En la rizósfera se da una interacción tripartita entre plantas, microorganismos y el suelo, donde cada una de las partes afecta a la otra (Berg & Smalla, 2009). Los suelos usualmente son pobres en cuanto al nivel de carbono disponible, por ende el estado natural de los microorganismos del suelo es la inanición (Terry J. Gentry et al., 2021). En este microecosistema, las raíces exudan una variedad de compuestos orgánicos que sirven como fuentes de nutrientes y señales químicas, fomentando una intensa competencia, cooperación y comunicación entre los microorganismos y la planta. Estas interacciones en la rizósfera no solo afectan la composición y función de las comunidades microbianas endofíticas, sino que también tienen implicancias directas en la salud y el crecimiento de las plantas, creando un ciclo de retroalimentación beneficioso para ambos (Berg & Smalla, 2009; Terry J. Gentry et al., 2021).

En la planta, los endófitos participan en un amplio espectro de funciones ecológicas. En particular, en la transformación y reciclado de nutrientes como la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de fósforo, en la producción de fitohormonas y sideróforos, en el control de fitopatógenos y en la tolerancia a diferentes formas de estrés abiótico (Card et al., 2016; Hardoim, 2019; Papik et al., 2020; Wallace, 2023)

Un mejor entendimiento del funcionamiento de los microbiomas endofíticos

representa una oportunidad para comprender y describir los procesos ecológicos que están en juego, y la posibilidad de desarrollar aplicaciones de campo para mejorar la productividad agrícola, desde estrategias de biofertilización hasta el diseño de nuevas formas de control de patógenos mediante mecanismos basados en la actividad de microorganismos PCV.

Los microorganismos y su participación en la disponibilidad de nutrientes

La solubilización y mineralización del fósforo

El fósforo es un macronutriente esencial para el desarrollo vegetal, pero en el suelo la mayoría del stock está presente en forma de fosfato formando complejos con metales, manteniéndolo ligado a minerales o materia orgánica, y no de formas solubles y disponibles para las plantas (Varga et al., 2020). Incluso ha sido descrito por Varga et al. (2020) que las formas de fosfato soluble pueden reaccionar y volverse insolubles e indisponibles una vez dentro de los tejidos vegetales. Una forma en la que los microorganismos pueden promover el crecimiento vegetal es accesibilizar fosfatos para las plantas (Corrales Ramírez et al., 2014). Las transformaciones del fósforo indisponible a formas disponibles para las plantas llevadas a cabo por microorganismos solubilizadores y mineralizadores de fósforo se dan a través de varios procesos químicos y enzimáticos como:

- Exudación de ácidos orgánicos: microorganismos solubilizadores de fósforo producen y exudan ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico y ácido glucónico, que liberan al fósforo de los compuestos insolubles como fosfatos de calcio, hierro y aluminio, formando complejos solubles.
- Liberación de enzimas fosfatasas ácidas y alcalinas: Estas enzimas hidrolizan enlaces éster fosfato en compuestos orgánicos, liberando fosfato inorgánico.
- Producción de ácidos minerales: Algunos microorganismos producen ácidos minerales como el ácido sulfúrico y el ácido nítrico que también pueden solubilizar fosfatos minerales por protonación, liberando iones fosfato.

(Corrales Ramírez et al., 2014)

La degradación de compuestos carbonados y la actividad pectinasa

La degradación de compuestos carbonados por microorganismos en el suelo es un proceso complejo y esencial para el ciclo del carbono en los ecosistemas terrestres. Este proceso implica la descomposición de materia orgánica, como restos de plantas y animales, en compuestos más simples que pueden ser utilizados como nutrientes por otros organismos. Los microorganismos mineralizan compuestos orgánicos, liberando dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo. En condiciones anaeróbicas, los microorganismos fermentan compuestos orgánicos, produciendo ácidos orgánicos, alcoholes y gases como metano (CH_4).

Las principales enzimas involucradas en la degradación de compuestos carbonados son las celulasas, que descomponen la celulosa en glucosa, hemicelulasas, que degradan hemicelulosa en azúcares simples como xilosa, arabinosa y ligninasas, que degradan lignina en compuestos aromáticos más simples (Chen et al., 2020). Las pectinasas son otra familia de enzimas degradadoras de compuestos carbonados. Las pectinas son polisacáridos complejos presentes en las paredes celulares de las plantas, especialmente en las láminas medias que mantienen unidas las células. La degradación de pectinas de las paredes celulares vegetales se ha sugerido como una adaptación a la vida endofítica (Walitang et al., 2017) y desempeña varias funciones en la fisiología vegetal, particularmente en el crecimiento y maduración así como en la adhesión y separación entre células (Bhadrecha et al., 2020).

El ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es muy abundante en la naturaleza y es un macronutriente esencial y a la vez limitante para el desarrollo vegetal. El aire de la atmósfera terrestre es un gran reservorio en forma de dinitrógeno (N_2) (78% de la composición de la atmósfera) y en el suelo se encuentra formando compuestos orgánicos y en forma mineral como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). A pesar de ser el reservorio más abundante, el N_2 no es aprovechable por las plantas, quienes son capaces de asimilar NO_3^- y NH_4^+ . La descomposición del material biológico y la fijación biológica

del nitrógeno son dos mecanismos en los cuales los microorganismos en la rizosfera y endosfera actúan reciclando el nitrógeno desde distintas fuentes, disponibilizándolos para la absorción por las plantas. Los microorganismos diazotrofos son aquellos capaces de fijar nitrógeno atmosférico, convirtiendo N_2 en NH_3^+ a través de reacciones catalizadas por el complejo enzimático nitrogenasa (Dai et al., 2014; Berais Rubio, 2023).

Otras funciones promotoras del crecimiento vegetal

Antagonismo frente a patógenos.

El antagonismo se refiere a la capacidad de ciertos microorganismos para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, actuando como una forma de control natural frente a patógenos. En el contexto de inoculantes para cultivos vegetales, el antagonismo es el fundamento que respalda el uso de microorganismos para reducir la incidencia o severidad de enfermedades causadas por patógenos, como *Fusarium* spp., reduciendo la utilización de fungicidas químicos. *Fusarium* es un género de hongos que incluye varias especies patógenas que afectan a cultivos como trigo, cebada, centeno, avena, maíz, entre otros (Stevens et al., 2004). Las especies incluidas en este género son causantes de enfermedades a diferentes estadios del desarrollo vegetal, como la pudrición de la espiga y la pudrición del oído, produciendo pérdidas económicas significativas en Uruguay y en el mundo y además pueden producir micotoxinas que representan un potencial peligro para los consumidores (Corallo et al., 2023; del Palacio et al., 2023). *Fusarium graminearum* es una especie que pasa parte de su ciclo de vida como saprófito descomponiendo la materia orgánica de sus hospederos. Las prácticas de siembra directa han contribuido al incremento de la intensidad de la infección por este patógeno en las regiones donde desarrollados estos cultivos (Stevens et al., 2004).

Los microorganismos antagonistas compiten con los patógenos por recursos y espacio, producen compuestos antibacterianos y antimicóticos (Schlatter et al., 2019). Otra forma de protección de las plantas frente a patógenos es la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Nourozian et al., 2006). Incorporar microorganismos antagonistas o inductores de resistencia en inoculantes ha demostrado ser una herramienta ecológica y efectiva para gestionar enfermedades

de plantas, mantener la salud de los cultivos en condiciones de laboratorio (Gimeno et al., 2020) y demuestra potencial para mejorar el rendimiento agrícola y promover prácticas agrícolas sostenibles reduciendo el impacto ambiental derivado del uso de pesticidas y el impacto económico de los métodos de control tradicionales.

Producción de indoles: mecanismos de producción a partir del triptófano

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales que juegan un papel crucial en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas hormonas promueven la elongación celular, la formación de raíces, y la diferenciación vascular, además de influir en procesos como la fototropía y la gravitropía. Se han descrito cuatro auxinas naturales sintetizadas por las plantas: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-ClAIA) y ácido fenilacético (PAA) (Vega-Celedón et al., 2016). Bacterias y hongos son capaces de sintetizar AIA, lo que puede afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas con las cuales interactúan. En bacterias el triptófano es el principal precursor de las vías de biosíntesis de AIA, siendo las vías de síntesis más ampliamente distribuidas las vías del indol-3-piruvato (IPA) y la vía indol-3-acetamida (IAM) (Vega-Celedón et al., 2016).

La vía del IPA tiene como primera etapa la conversión de triptófano a ácido indol-3-pirúvico (IPA) por una aminotransferasa. En una segunda etapa, el IPA se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído (AIAld) por la indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC). En la etapa final, el AIAld es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa. El gen *ipdC* que codifica para la enzima IPDC ha sido identificado y caracterizado en algunas bacterias como *Azospirillum brasilense*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, *P. agglomerans* y *Paenibacillus polymyxa* (Duca & Glick, 2020; Vega-Celedón et al., 2016; P. Zhang et al., 2019). La vía IAM es la ruta más caracterizada en bacterias y no ha sido descrita en plantas (Vega-Celedón et al., 2016). En la primera etapa de esta ruta, el triptófano es convertido en IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (*iaaM*), que está codificada en el gen *iaaM*. En la segunda etapa, el IAM es convertido a AIA y amonio, mediante una IAM hidrolasa (*iaaH*), codificada por el gen *iaaH*. Estos genes han sido descritos en bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas*

savastanoi, *Pseudomonas syringae*, *P. agglomerans*, *Rhizobium sp. NGR234* y *Bradyrhizobium japonicum* (Duca & Glick, 2020; Vega-Celedón et al., 2016; P. Zhang et al., 2019).

Ha sido planteado (Boschi, 2019) y demostrado que la aplicación de auxinas exógenas sobre el organismo vegetal genera acumulación endógena y desencadena respuestas fisiológicas en la planta (Flores-Ortiz et al., 2009; Juárez-Rosete et al., 2019). Esto ha sido demostrado también como una función PCV de microorganismos endófitos y del suelo (Duca & Glick, 2020; Shao et al., 2015; P. Zhang et al., 2019).

El modelo de estudio

El maíz, *Zea mays* L., representa no solo una de las plantas más emblemáticas en la historia de la agricultura, sino también un pilar fundamental en la seguridad alimentaria a nivel mundial. Su cultivo extendido y su adaptabilidad a distintos entornos han despertado un interés constante en mejorar su rendimiento y su resistencia a diversos factores bióticos y abióticos. En Uruguay el segundo cultivo de mayor importancia para el año agrícola 2022/2023, en términos de superficie sembrada, fue el maíz, con un 15,2 % de la superficie total sembrada de cultivos de verano y siendo éste el cultivo que presentó la mayor área bajo riego de los cultivos relevados (MGAP-DIEA, 2023).

Las variedades representan la forma que toman los cultivos posterior a la domesticación, donde son seleccionados fenotipos para la producción en determinados ambientes. Las diferentes variedades de un cultivo pertenecen todas a una misma especie pero presentan fenotipos claramente distinguibles (Al-Khayri et al., 2015). Éstas pueden surgir de forma natural debido a factores como la adaptación a diferentes condiciones ambientales o la evolución a lo largo del tiempo, así también como pueden ser seleccionadas y desarrolladas artificialmente a través de prácticas de cultivo y mejoramiento genético.

En los sistemas de producción de pequeña escala en Uruguay una parte significativa de la producción está basada en variedades criollas de maíz (Galván et al., 2015). Las variedades criollas de maíz en Uruguay se originaron a partir de la introducción realizada por diversas corrientes inmigratorias, y la subsecuente

multiplicación, conservación y selección de manera artesanal que han realizado productores en los predios durante décadas (Galván et al., 2015). Estas variedades presentan un valor como fuente de variabilidad para el mejoramiento convencional por su adaptación a las condiciones locales y características agronómicas favorables (Galván et al., 2015).

En los predios dónde se cultivan variedades criollas, cada productor utiliza su propia estrategia de conservación de los granos de una zafra a la siguiente. Algunos los conservan en heladera habiendo desgranado y secado previamente las espigas, otros secan las espigas a temperatura ambiente en forma de pirvas (Fig 6, anexo) al aire libre o en un galpón al amparo de la intemperie y luego son almacenadas las espigas sin desgranar a temperatura ambiente. Estas condiciones contrastantes de conservación podrían tener un efecto diferencial tanto sobre la composición y diversidad microbiana de los granos como sobre su viabilidad para la siguiente siembra.

Hipótesis

Este trabajo se basa en la hipótesis de que las variedades criollas de maíz, con una historia de cultivo prolongado en regiones específicas, han desarrollado vínculos con microorganismos propios de esas áreas. Esta interacción podría haber influido tanto en las características visibles de las plantas como en la composición y funcionalidad de sus microorganismos asociados.

Objetivos

Objetivo general

Conocer el efecto de diferentes estrategias de conservación de semillas de razas criollas sobre las comunidades microbianas endofíticas y la relación entre estas comunidades y las tasas de germinación.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la diversidad taxonómica de las comunidades bacterianas endofíticas cultivables asociadas a 3 estrategias de conservación en 3 genotipos hospederos.
2. Ampliar la colección de bacterias endófitas de semillas de maíz criollo.
3. Identificar taxonómicamente y caracterizar *in vitro* el potencial funcional PCV de las cepas añadidas a la colección.

Materiales y métodos

Selección de las semillas de maíz

Este trabajo se encuentra enmarcado en el proyecto de investigación para el doctorado en ciencias biológicas de la Msc. Tania Trasante, titulado “*Diversidad taxonómica y funcional del microbioma endofítico promotor del crecimiento vegetal de semillas de maíz (Zea mays L.) para la conservación del germoplasma criollo en Uruguay*” (PEDECIBA Biología). A partir de este trabajo se seleccionaron tres variedades criollas de maíz, denominadas UYST1, UYST2 y UYST3. Las semillas fueron recolectadas en los predios donde se cultivan y mantienen (*in situ*) en 2022. En la Tabla 1 se detalla la lista de las semillas que fueron seleccionadas de la cosecha 2022 para evaluar en el presente estudio.

Tabla 1. Lista de las semillas analizadas en el presente estudio.

Colecta	Productor/Origen	Conservación	Variedad	Raza	Método de conservación
2022	SC-Canelones-Sur	<i>In Situ</i>	UYST1	Pisingallo redondo	Desgranado en heladera
	AL-Canelones- Sur	<i>In Situ</i>	UYST2	Amarillo dentado	Espiga a temperatura ambiente
	DG-Canelones-Sur	<i>In Situ</i>	UYST3	Blanco dentado	Espiga a Temperatura ambiente

Diseño experimental para evaluar las estrategias de conservación

Las 3 variedades colectadas en los predios de los productores fueron conservadas durante 1 año en 3 condiciones diferentes. Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio y por triplicado, a semejanza de las estrategias de conservación utilizadas por los propios productores, creando un tratamiento intermedio con el fin de evaluar el efecto del desgranado de la espiga. Luego de 1 año de almacenamiento se evaluó el efecto de la temperatura y del desgranado de las espigas sobre la sobrevivencia de la microbiota bacteriana endofítica de semillas.

Los métodos de conservación empleados fueron:

- Condición nº1- (E) - Temperatura ambiente en forma de espigas sin desgranar.
- Estrategia nº2- (T) - Temperatura ambiente, espiga desgranada.
- Estrategia nº3- (H) - Heladera (4°C), espiga desgranada.

Se analizó la diversidad bacteriana por métodos cultivables con el objetivo de estimar la población de bacterias viables, así como determinar la riqueza y abundancia relativa de los diferentes morfotipos detectados en los distintos medios de cultivo.

Preparación de las muestras: desinfección superficial y macerados

Se desinfectaron en superficie 30 semillas de maíz de cada variedad bajo cada tratamiento con el fin de seleccionar únicamente los microorganismos endófitos. La desinfección superficial se realizó sumergiendo las semillas en etanol 70% (v/v) por 3 minutos, realizando un enjuague con agua destilada estéril y luego sumergiéndose en una solución de hipoclorito de sodio 2.5 % (v/v) por 5 minutos y nuevamente en etanol por 30 segundos. Posteriormente se realizaron 7 lavados con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas las semillas, se verificó la ausencia de microorganismos contaminantes. Para esto se sembraron 100µL del agua del último enjuague en

medio rico TY sólido, se incubaron los cultivos 72hs a 28°C y se verificó la ausencia de crecimiento microbiano.

Las semillas se germinaron por 72 hs a 28°C en medio estéril Agar-Agua (agar, 1,5%). Se contaron las semillas germinadas para obtener un porcentaje de germinación y se seleccionaron 20 semillas aleatoriamente para el aislamiento de microorganismos endófitos. Para la extracción de microorganismos endófitos, se realizó un macerado de las semillas seleccionadas en un mortero estéril. Se pesaron 5 g en un frasco estéril y se añadieron 45 ml de buffer PBS adicionado de Tween 80 (2.5% v/v), permitiendo una recuperación de bacterias viables que fueron posteriormente sembradas en distintos medios de cultivo.

Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional del microbioma endófito de semilla

Se diseñó un marco metodológico en cuatro etapas sucesivas que permitieron estimar la diversidad microbiana endofítica cultivable de semilla en condiciones de laboratorio:

Cultivo de bacterias endófitas y determinaciones de abundancia

Para determinar la abundancia y diversidad de bacterias cultivables se realizaron diluciones seriadas de la muestra macerada en buffer PBS y se sembraron las diluciones por triplicado en dos medios de cultivo, uno para bacterias aerobias mesófilas (BT), y otro medio que favorece el crecimiento de actinobacterias (ACT). Para BT, se utilizó medio TY, un medio rico indefinido que contiene triptona y extracto de levadura (ver anexo). Para ACT se utilizó el medio SCA, un medio rico indefinido a base de almidón de papa (ver anexo). Ambos medios fueron adicionados de cicloheximida (100 mg/L) para limitar el crecimiento de células eucariotas.

Se estimó la abundancia de microorganismos crecidos en cada medio mediante recuentos en placa, luego de una incubación de 72 hs a 28°C, registrándose el valor de unidades formadoras de colonia por gramo de semilla (UFC/g), el valor de riqueza total de morfotipos observables por características macroscópicas, y la abundancia relativa por morfotipo bacteriano.

Aislamiento de morfotipos

Se realizaron aislamientos de los distintos morfotipos distinguibles. Los morfotipos observados en cada placa del paso 4.1 se estriaron a partir de colonias únicas en medio TY hasta lograr un cultivo axénico para cada morfotipo. Los aislamientos se cultivaron 48hs a 28°C. Los cultivos puros obtenidos fueron incluidos en la colección del laboratorio al ser pasados a criotubos con glicerol (20% v/v) en dos copias idénticas: una de ellas para ser conservada a -20 °C y otra a -80 °C.

Determinación de características de interés biotecnológico en aislamientos de la colección.

Los aislamientos de cada morfotipo bacteriano obtenido en el punto 4.2 se cultivaron en distintos medios en función de las distintas capacidades metabólicas a evaluar:

- Producción de auxinas: se cultivaron los aislamientos en medio triptófano (Sigma-Aldrich) líquido. Se evaluó la capacidad de los morfotipos para producir auxinas en este medio por colorimetría utilizando el reactivo de Salkowski (Anexo). Se usaron soluciones de concentraciones conocidas de AIA (Coleman chemical INC) como calibración según descrito por Glickmann & Dessaux, (1995).
- Producción de pectinasas: se utilizó el medio PSAM (Bibi et al., 2018) para la identificación de bacterias productoras de pectinasas. Se realizó un screening de la actividad pectinolítica de las cepas tal como se describe en Vaz Jauri et al., (2023). La degradación de la pectina se evidencia mediante la formación de un halo incoloro tras la adición de lugol 2%.
- Antagonismo frente a hongos fitopatógenos: Se sembraron los aislamientos en medio PDA (HiMedia Laboratories), que contiene carbohidratos complejos y sales minerales necesarios para el desarrollo de los hongos. Se realizaron cultivos duales con los aislamientos y un fragmento de cultivo fresco de *Fusarium graminearum*. Esto permitió identificar microorganismos que liberan compuestos difusibles o volátiles que inhiben el crecimiento del hongo patógeno mediante la visualización de una reducción en el radio de crecimiento del hongo frente al estriado de los microorganismos luego de una incubación de 7 días a 24°C. La cuantificación del antagonismo se realizó comparando el ensayo con un control de cultivo axénico del hongo.

- Solubilización de fosfato: Se evaluó en el medio NBRIP (Nautiyal, 1999), el cual contiene una fuente de fósforo insoluble que le brinda un color blanco opaco al medio, el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Esto permite identificar bacterias solubilizadoras de fósforo mediante la visualización de un halo de solubilización luego de una incubación de 72 hs a 28°C. La cuantificación de la capacidad de solubilización se realizó por la medida del diámetro (en cm) del halo generado en los cultivos positivos.

Identificación de aislamientos de la colección

Para la identificación molecular de los aislamientos se realizaron lisados a partir de cultivos en medio sólido según adaptación a el protocolo de Rivas et al. (2005) (anexo). En los aislamientos con los que el procedimiento de lisado no permitió una buena extracción de ADN, fueron realizadas extracciones con el kit DNeasy®, Ultraclean® microbial kit (250). La calidad de las extracciones fue verificada por corridas electroforéticas en geles de agarosa 0.8% (p/v) y cuantificadas por espectrofotometría (Nanodrop).

Análisis de datos

Se evaluaron parámetros de diversidad alfa (riqueza, índices de diversidad), y se realizaron análisis estadísticos de los resultados (ANOVA, Spearman correlation) utilizando los paquetes del software R car (Fox & Weisberg, 2019), vegan (Oksanen et al., 2023), FactoMineR (Lê et al., 2008) y MASS (Venables & Ripley, 2002). Las estimaciones de abundancia en unidades formadoras de colonia por gramo de semilla (UFC/g) en los ensayos cultivables se analizaron con el paquete MPN, previsto tanto para número más probable como para recuentos en placa (Ferguson & Ihrie, 2019). Las correlaciones entre riqueza y tasas de germinación y diversidad y tasas de germinación se estudiaron removiendo los datos atípicos según el modelo de distancias de Cook y aplicando tests de correlación de Spearman y Pearson. Los gráficos se construyeron con el paquete ggplot2 (Wickham et al., 2021)

Resultados

Recuentos en placa

Los resultados obtenidos muestran una respuesta diferencial de cada variedad a los métodos de conservación de grano aplicados. En cuanto las BT, evaluadas en el medio TY, en la variedad ST1, el método E resultó en la recuperación de $1,33 \times 10^2$ UFC/g en promedio, mientras que los métodos H y T resultaron en $1,69 \times 10^6$ UFC/g y $3,83 \times 10^4$ UFC/g en promedio, respectivamente, siendo el método H significativamente mayor que el valor observado por el método E. Para la Variedad ST2, los tratamientos E, H y T resultaron en la recuperación de $3,26 \times 10^5$ UFC/g, $6,78 \times 10^5$ UFC/g y $1,75 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. Estos resultados no muestran diferencias significativas en la abundancia de BT entre métodos de almacenamiento. Finalmente, la variedad ST3 mostró una recuperación de $6,83 \times 10^5$ UFC/g, $6,65 \times 10^3$ UFC/g y < 1 UFC/g para los tratamientos E, H y T, en promedio, respectivamente, con el valor de abundancia de BT por el método E siendo significativamente mayor que por los otros métodos.

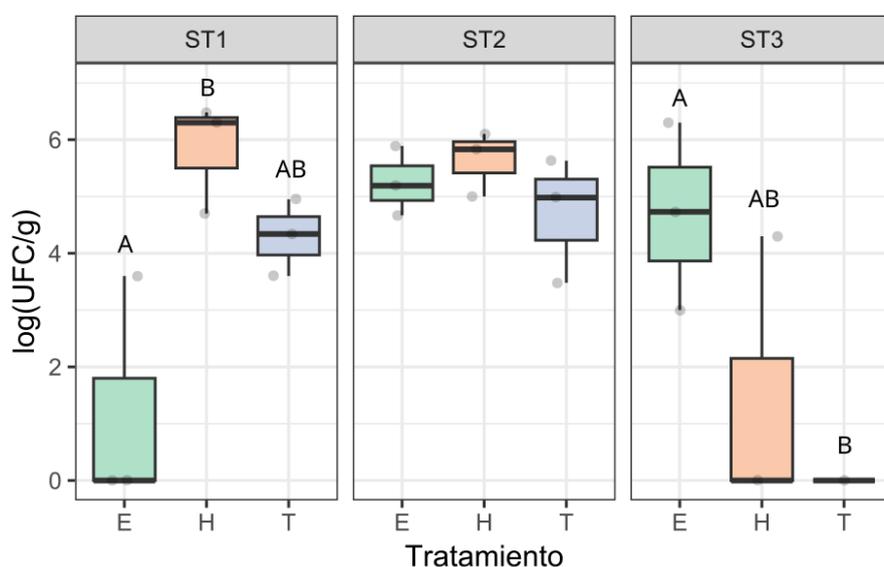


Fig 1. Abundancia de BT. Microorganismos endófitos cultivados en medio TY para cada método de conservación en cada variedad (ST1, ST2 y ST3): E, espiga a temperatura ambiente; H, desgranado 4°C; T, desgranado a temperatura ambiente. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos muestran una respuesta diferencial de cada variedad a los métodos de conservación de grano aplicados también respecto a la abundancia de ACT. En la variedad ST1, el método E resultó en la recuperación de < 1 UFC/g, mientras que los métodos H y T resultaron en $7,55 \times 10^5$ UFC/g y $2,42 \times 10^4$ UFC/g en promedio, respectivamente, ambos significativamente mayores que el valor obtenido para E. Al igual que para ST1, en la variedad ST2 el método E resultó en la recuperación de < 1 UFC/g, mientras que los métodos H y T resultaron en $1,25 \times 10^6$ UFC/g y $8,75 \times 10^4$ UFC/g en promedio, respectivamente, ambos significativamente mayores que los valores obtenidos para E. Finalmente, para la variedad ST3 los métodos E, H y T resultaron en la recuperación de $2,77 \times 10^5$ UFC/g, $4,30 \times 10^5$ UFC/g y < 1 UFC/g, respectivamente. Estos resultados no mostraron diferencias significativas entre sí.

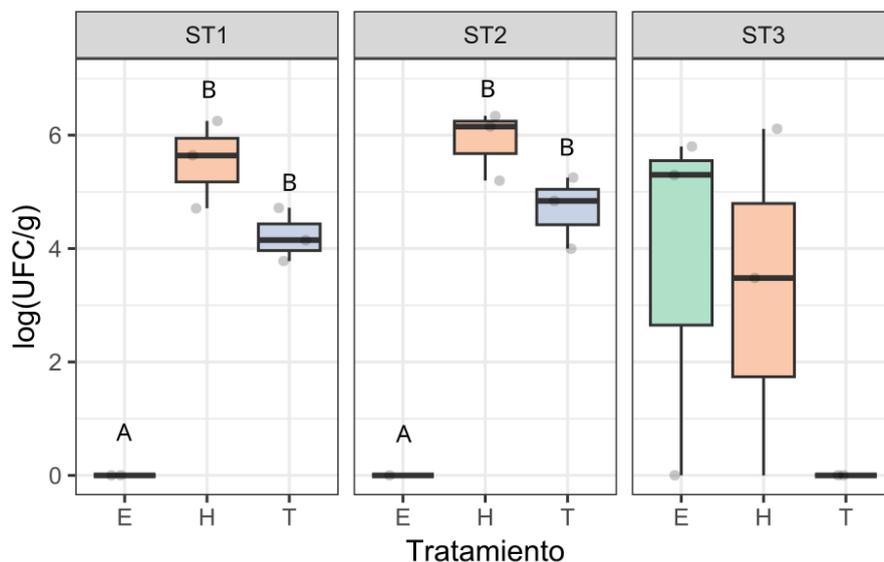


Fig 2. Abundancia de ACT. Microorganismos endófitos cultivados en medio SCA para cada método de conservación en cada variedad (ST1, ST2 y ST3): E, espiga a temperatura ambiente; H, desgranado 4°C; T, desgranado a temperatura ambiente. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Diversidad microbiana

La riqueza de las BT varía significativamente con la variedad (ANOVA, $p=0.047$), siendo significativamente mayor en ST2 que en ST3 (Tukey, $p=0.038$), pero no varía con los métodos de conservación. La riqueza de ACT varió significativamente con los métodos de conservación (ANOVA, $p=8,6 \times 10^{-5}$) y con la variedad (ANOVA,

$p=0,013$), siendo mayor para los métodos H y T que para el método E (Tukey, $p=8,3 \times 10^{-4}$ y $p=0,020$, respectivamente), si bien el comportamiento de las variedades no fue homogéneo, y estas diferencias no se vieron reflejadas en la variedad ST3 (Figura 3).

La diversidad de BT medida según el índice de Simpson no varía significativamente con los métodos de conservación empleados. En cuanto a ACT, la diversidad varía significativamente con los métodos de conservación empleados (ANOVA, $p=0,007$) considerando todas las variedades, siendo estadísticamente mayor para los métodos H y T que para el método E (Tukey, $p=0,01$ y $p=0,026$, respectivamente). Sin embargo, para cada variedad no se encontraron diferencias significativas en la diversidad de ACT según los métodos de almacenamiento.

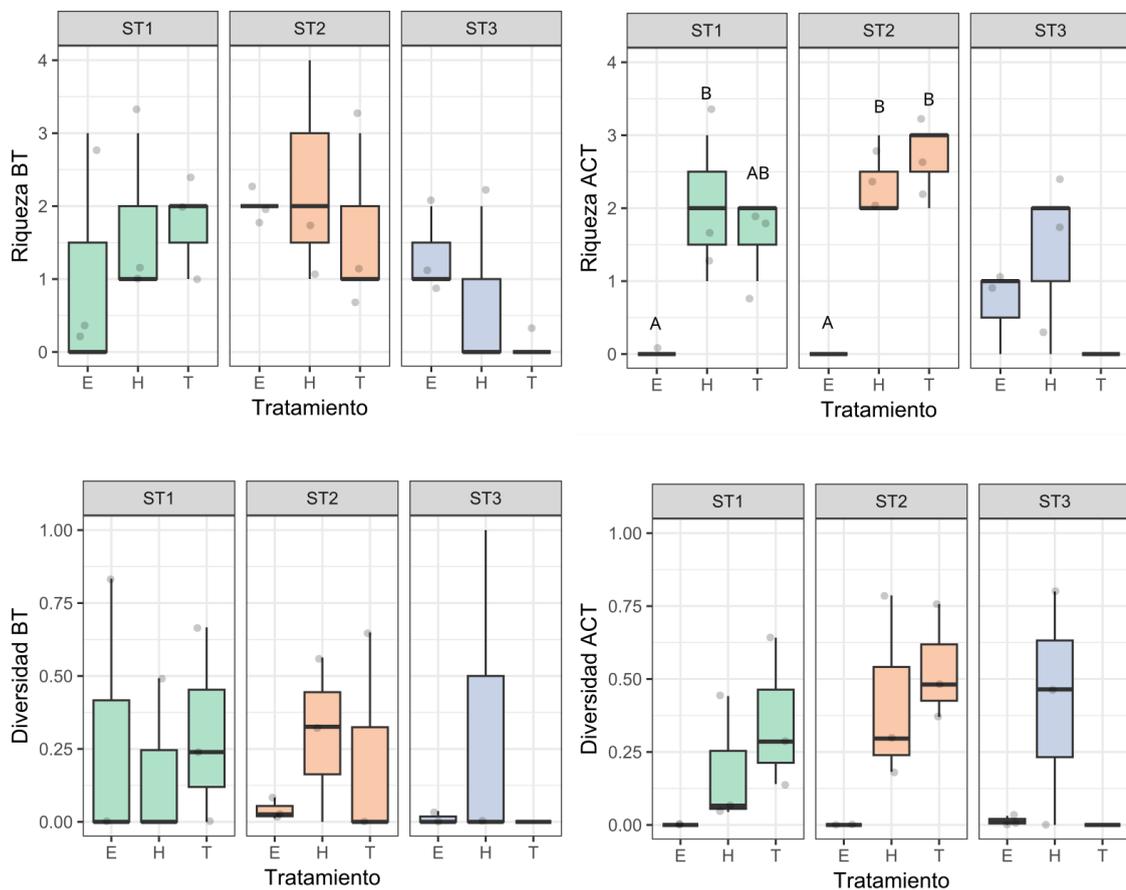


Fig 3. Riqueza y diversidad para cada método de conservación en cada variedad (ST1, ST2 y ST3): E, espiga a temperatura ambiente; H, desgranado 4°C; T, desgranado a temperatura ambiente. Diversidad calculada como 1- Índice de Simpson. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Tasa de germinación

Los resultados obtenidos muestran una respuesta diferencial de cada variedad a los métodos de conservación del grano aplicados en términos de tasa de germinación. La variedad ST1 presentó una tasa de germinación consistentemente alta independientemente del tratamiento aplicado (E, H, y T). Para la variedad ST2, la tasa de germinación fue mayor con los tratamientos H y T que con el tratamiento E, aunque sólo el primero fue significativamente diferente (Tukey, $p=0,069$ y $p=0,535$). De manera similar, la variedad ST3 también mostró una tasa de germinación alta con los tratamientos H y T, y significativamente menor con el tratamiento E (Tukey, $p=0,006$ y $p=0,03$, respectivamente). Se observa que la tasa de germinación está influenciada por la variedad (ANOVA, $p=6.02 \times 10^{-6}$) y por el método de conservación (ANOVA, $p=0.0002$).

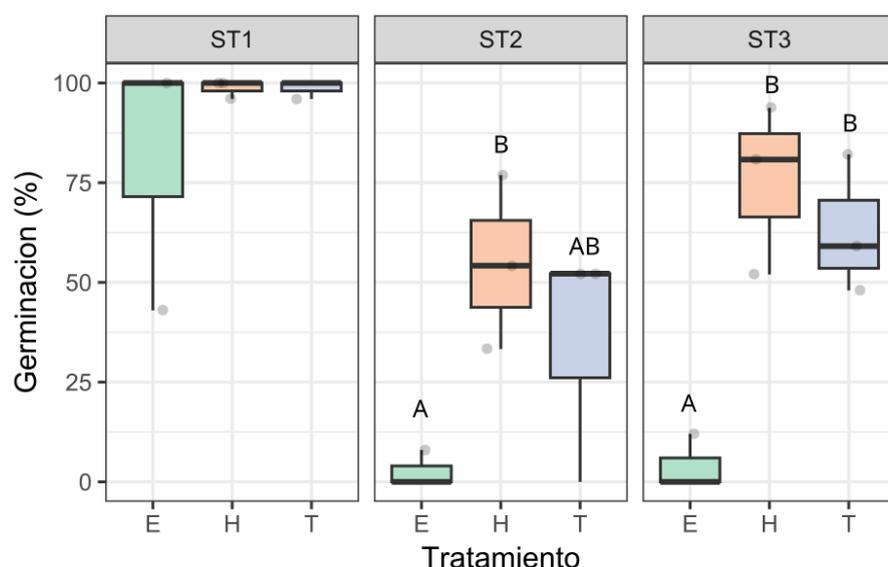


Fig 4. Tasa de germinación. Para cada método de conservación en cada variedad (ST1, ST2 y ST3): E, espiga a temperatura ambiente; H, desgranado 4°C; T, desgranado a temperatura ambiente. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,07$).

Se encontró una correlación significativa entre las variables Riqueza ACT, Diversidad ACT y Diversidad BT con la tasa de Germinación al aplicar el test de correlación de Pearson. La correlación entre riqueza ACT y germinación fue $r = 0.38$, con un p-valor $p = 0.053$, la correlación entre Diversidad ACT y germinación arrojó un valor de Pearson de $r = 0.38$ con un p-valor de $p = 0.053$ y la correlación entre

diversidad BT y germinación mostró un coeficiente de pearson de $r = 0.38$, con un p-valor de $p=0.056$.

Determinación de propiedades metabólicas de interes biotecnologico

Se observa que los microorganismos tienen una tendencia a poseer al menos una de las propiedades metabólicas evaluadas. Solo 2 de las 36 cepas evaluadas no demostraron ninguna de las propiedades metabólicas evaluadas (cepas 14 y 35) (Tabla 2). Diecinueve de los 36 aislamientos demostraron poseer por los menos 3 propiedades metabólicas simultáneamente, 13 de los 36 poseyeron 2 propiedades metabólicas simultáneamente y sólo 2 mostraron poseer una única propiedad de las evaluadas (Fig 5). Ninguna cepa demostró únicamente ser productora de AIA, sino que fue la propiedad más compartida por todas las cepas y en todos los casos se presentó en conjunto con alguna otra propiedad metabólica. La capacidad de antagonizar el crecimiento del hongo *Fusarium graminearum* demostró ser otra característica común entre los aislamientos. La actividad pectinasa y la solubilización de fósforo fueron las propiedades metabólicas menos frecuentes entre los aislamientos. Todas las propiedades metabólicas demostraron un amplio rango de expresión.

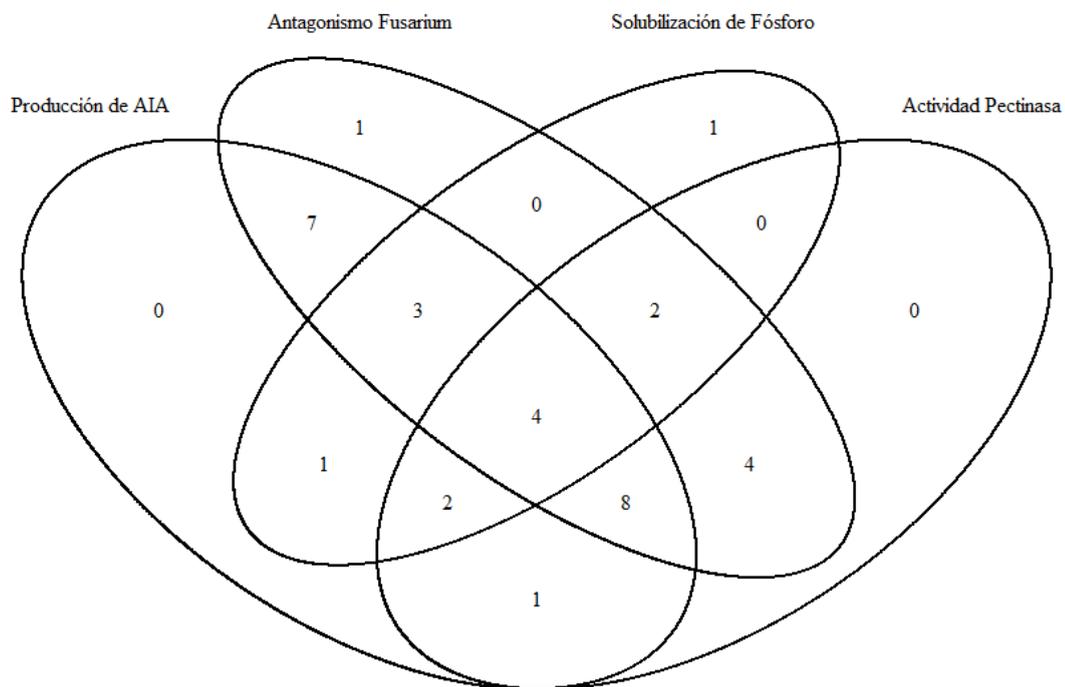


Fig 5. Diagrama de Venn de las propiedades metabólicas evaluadas. Se indica el número de cepas que presenta cada combinación de funciones metabólicas.

Tabla 2. Valores de actividad metabólica. La tabla muestra los valores promedio para cada determinación.

Cepa	producción AIA (mg/ml)	Actividad pectinasa (cm)*	Antagonismo Fusarium (cm)	Solubilización de fósforo (cm)
1	5,261	-	0,9	0
2	2,235	-	0,95	0
3	3,647	-	1	0
10	1,404	-	0,67	0
11	4,151	-	0,72	0
12	4,202	-	0,55	0
13	1,000	2,1	0,55	0
14	0,000	-	0	0
15	0,000	-	1	0

16	6,244	0	1,09	0
17	4,303	2,325	0,47	0
18	0,000	0	1,03	0
19	0,000	0	0,96	0
20	0,042	-	1,12	0
21	1,782	0	1,09	0
22	0,446	1,95	0,47	0
23	9,874	1,95	0,5	0
24	5,164	0	0,51	0,97
25	0,000	1,975	0,51	0,47
26	0,32	-	1,11	0,67
27	0,000	1,35	0,83	0,63
28	0,042	0,175	0,98	0,9
29	1,429	0,925	1,18	0
30	3,269	-	1	0,6
31	0,067	1,15	0	0,77
32	0,000	-	0	0,57
33	1,782	0	0	0
34	0,000	0	0,52	0
35	0,000	-	0	0
36	0,143	0	0,48	0
37	0,000	0	0,52	0
38	1,025	-	0,56	0,47
39	1,53	0	0,47	1,83
40	1,706	-	0	0,63
41	1,025	0	0	0,53
42	6,875	0	0,57	0,8

*El valor 0 en actividad pectinasa indica que hubo actividad pectinasa restringida dentro de los bordes de la colonia, “-” denota la ausencia de actividad pectinasa.

Identificación de aislamientos de la colección

La secuenciación del gen codificante para ARNr 16S, ni la amplificación del gen *nifH* pudieron ser llevadas adelante como planificado por dificultades experimentadas en el proceso de extracción de ADN genómico. Se pudo extraer exitosamente y amplificar por PCR el gen codificante para ARNr 16s para 12 de las 36 cepas.

Discusión y perspectivas

Recuperación de microorganismos cultivables

Se observó que cada variedad respondió de manera única a los métodos de conservación de granos. Para la recuperación de BT, mientras que los métodos que implican desgranado fueron más efectivos para la variedad ST1, resultaron ser menos efectivos para la variedades ST3 y no hubo diferencias para la variedad ST2. En cuanto para la recuperación de ACT, los métodos de conservación que implican desgranado fueron más efectivos para las variedades ST1 y ST2, no siendo estadísticamente relevante el método de conservación para ST3. Esto sugiere que las características específicas de cada variedad influyen en la recuperación de microorganismos bajo diferentes condiciones de conservación.

Estos resultados indican que no existe un tratamiento único que optimice la recuperación de microorganismos en todas las variedades de cultivos estudiadas. En cambio, cada variedad presenta una interacción específica con los tratamientos aplicados, lo cual resalta la importancia de considerar las características particulares de cada variedad al diseñar estrategias de manejo para la recuperación de microorganismos. Zhang et al., (2020) plantea que los datos geográficos son el principal responsable de definir las estructuras de las comunidades microbianas en el suelo. Las semillas utilizadas en este experimento surgieron de distintas localidades, quizá por eso se observa que la variedad explica en gran medida la riqueza y diversidad de especies cultivables recuperadas.

Diversidad de microorganismos cultivables recuperados

No hubo variaciones en la diversidad de BT aislados en relación a los métodos de conservación empleados. Sin embargo, la riqueza y la diversidad de ACT varió significativamente con los métodos de conservación empleados (ANOVA, $p=8,6 \times 10^{-5}$ y $p=0.007$ respectivamente). Estos resultados sugieren que los tratamientos aplicados influyeron principalmente en la composición y abundancia de actinobacterias, ya que éste es grupo principalmente seleccionado en este medio. Esto sugiere que las actinobacterias son particularmente sensibles a los métodos de conservación de grano empleados. Esto es acorde con los resultados hallados por Shi et al., (2021), donde demuestran que las composiciones de las comunidades microbianas son sensibles a las prácticas de uso y manejo de suelo y en particular las actinobacterias son buenas indicadoras del estado de salud del suelo en respuesta a las prácticas de uso.

Tasas de germinación

Se observó que la variedad ST1 mantiene una alta tasa de germinación independientemente del método de conservación de grano aplicado, lo que sugiere una robustez propia de la variedad e independiente a las condiciones de tratamiento. En contraste, las variedades ST2 y ST3 mostraron sensibilidad a los tratamientos, con mayores tasas de germinación en H y T, y una baja tasa en E. Esto indica que el factor de desgranado y la conservación a bajas temperaturas (4°C) influye positivamente/promueve la viabilidad del grano en la conservación de una temporada a la siguiente y para estas variedades podría mejorar la germinación.

Los resultados sugieren que la variedad ST1 podría ser una opción más estable para condiciones variables de conservación de grano, mientras que las variedades ST2 y ST3 requieren de cuidados específicos para optimizar la germinación. La variabilidad en la respuesta de las variedades ST2 y ST3 resalta la importancia de personalizar los tratamientos para mejorar los resultados de germinación.

No se observó una correlación directa entre la abundancia de BT y las tasas de germinación. Se encontró una correlación positiva moderada entre riqueza ACT y

germinación, diversidad ACT y germinación y diversidad BT y germinación, con coeficientes de correlación de Pearson y p-valor de $r = 0.38$ $p = 0.053$, $r = 0.38$ $p = 0.053$ y $r = 0.38$ $p = 0.056$, respectivamente. Aunque estas correlaciones no alcanzan significancia estadística al nivel del 95%, están muy cerca del umbral convencionalmente aceptado. Estos resultados sugieren una tendencia a que una mayor riqueza y diversidad de ACT y una mayor diversidad de BT se asocian con mayores tasas de germinación.

El medio SCA utilizado en el experimento favorece el crecimiento de actinobacterias (Nithya et al., 2015), un grupo de microorganismos conocido por sus funciones en la promoción del crecimiento vegetal. Las actinobacterias pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes mediante la producción de hidrolasas, producir fitohormonas y proteger las plantas contra patógenos por antagonismo por metabolitos secundarios (Evangelista-Martínez et al., 2024), lo cual podría explicar la correlación observada entre la diversidad microbiana y la tasa de germinación. La diversidad de actinobacterias podría crear un ambiente más favorable para la germinación de las semillas, mejorando su desarrollo inicial.

Metabolismo de microorganismos

Los microorganismos estudiados demostraron poseer varias combinaciones de propiedades metabólicas que influyen sobre el ciclo de nutrientes y ofrecen funciones PCV, sin embargo cabe recalcar que estas funciones fueron evaluadas en cultivos *in vitro* y de manera aislada, tanto de la planta hospedera como del resto de los microorganismos que conforman las comunidades de las cuales fueron aislados. Estas condiciones presentan un sesgo y a la hora de la evaluación en planta se podrían observar funciones que se desarrollan únicamente en condiciones naturales, donde se producen interacciones entre todos los componentes del holobionte, como planteado por Wani et al., (2015).

En todas las variedades y bajo todos los tratamientos se encontraron microorganismos que cumplieran con todas las propiedades metabólicas evaluadas. de esta manera ni las altas ni las bajas tasas de germinación pueden explicarse por las propiedades metabólicas conferidas al holobionte por los microorganismos. Queda abierta la posibilidad de realizar posteriores experimentos donde se usen

estos aislamientos como inoculantes para evaluar su efecto en la promoción del crecimiento vegetal tanto de forma aislada, como en distintas combinaciones.

Estos microorganismos, podrían ser incorporados en formulaciones de biofertilizantes y bioplaguicidas, ofreciendo soluciones ecológicas para mejorar la fertilidad del suelo y controlar patógenos en los cultivos. Además, podrían contribuir a la reducción de la dependencia de productos químicos, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles. Un análisis cuantitativo más detallado de estas propiedades podría proporcionar información más precisa sobre su eficacia y mecanismos de acción. Además, sería valioso realizar estudios que relacionen estas propiedades metabólicas con la filogenia de los microorganismos, para entender mejor las asociaciones evolutivas y funcionales entre las características metabólicas y los grupos microbianos.

Pérdida de cepas

Algunas de las cepas aisladas fueron perdidas al realizar pasajes axénicos. Una de las explicaciones posibles es de que los microorganismos perdidos eran endófitos obligados, que requieren de la planta hospedera para su viabilidad, y suelen perderse luego de realizados algunos pasajes en cultivo axénico, tal como descrito por Wani et al., (2015).

Fallos en la extracción de ADN

Los intentos de extracción de ADN genómico mediante métodos de lisis alcalina y extracción con kits pueden haber fallado por varias razones. Considerando las condiciones de los cultivos utilizados, éstos ya habían pasado la fase de crecimiento exponencial y se encontraban en fase estacionaria. En cultivos densamente poblados o frente a estrés nutricional (Baysse et al., 2005), por mecanismos de quorum sensing se desencadena la producción de metabolitos secundarios y cambia sustancialmente el perfil metabólico del organismo (Davenport et al., 2015). Estos cambios pueden desencadenar modificaciones en las composiciones de las paredes y membranas celulares (Gogos et al., 2018), las cuales pueden dificultar la lisis celular (Gogos et al., 2018). Además, los métodos de lisis alcalina pueden ser menos efectivos en romper las paredes celulares en microorganismos Gram +, por la naturaleza estructural de sus paredes celulares. También, los componentes del medio sólido pueden interferir con los reactivos del kit de extracción, inhibiendo las

enzimas necesarias para la purificación del ADN y dificultando la obtención de ADN limpio.

Dado que no fue posible extraer ADN de los microorganismos aislados, no fue posible la amplificación del gen codificante para ARNr 16S impidiendo la reconstrucción de filogenias que podrían haber proporcionado una comprensión más profunda de las relaciones evolutivas y la clasificación taxonómica de los microorganismos aislados.

Perspectivas

Como perspectiva queda la oportunidad de poner a punto la extracción de ADN de las cepas aisladas, para realizar la secuenciación del gen codificante para ARNr 16S y realizar ensayos de PCV de estos microorganismos para evaluar su eficiencia como potenciales bioinsumos.

Conclusiones

En conclusión, la respuesta variable de las diferentes variedades de maíz a los tratamientos sugiere que la selección de estrategias de conservación de grano desde la cosecha a la próxima siembra debe ser específica para cada variedad. Estos hallazgos tienen implicancias importantes para la optimización de prácticas agrícolas y la mejora del rendimiento tanto en cuanto a la conservación del microbioma endófito como para la tasa de germinación de los diferentes cultivos.

El papel de las actinobacterias en la promoción del crecimiento vegetal podría ser clave en la relación con las tasas de germinación. Estudios futuros con muestras más grandes y diseños experimentales robustos podrían clarificar la naturaleza de esta relación y su potencial aplicación en prácticas agrícolas.

La correlación observada entre tratamientos y la diversidad de microorganismos indica que los tratamientos no solo afectan la viabilidad de los cultivos vegetales, sino también las estructuras de las comunidades microbianas asociadas.

Bibliografía

- Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., & Johnson, D. V. (Eds.). (2015). *Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools*. Springer international publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0>
- Baysse, C., Cullinane, M., Dénervaud, V., Burrowes, E., Dow, J. M., Morrissey, J. P., Tam, L., Trevors, J. T., & O'Gara, F. (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology*, *151*(8), 2529-2542. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28185-0>
- Berais Rubio, A. 2023. Rizobios eficientes y parásitos que nodulan alfalfa en suelos ácidos del Uruguay . Tesis Magister en Ciencias Biológicas, Fagro, Montevideo.
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: plant species, soil type and rhizosphere communities. *FEMS microbiology ecology*, *68*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bhadrecha, P., Bala, M., Khasa, Y. P., Arshi, A., Singh, J., & Kumar, M. (2020). *Hippophae rhamnoides* L. rhizobacteria exhibit diversified cellulase and pectinase activities. *Physiology and molecular biology of plants*, *26*(5), 1075-1085. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00778-2>
- Boschi, C. L. (2019). Fitohormonas involucradas en la restricción radical de plantas creciendo en contenedores de bajo volumen. *AIA avances en investigación agropecuaria*, *23*(2), 15-22.
- Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., & Caradus, J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS microbiology ecology*, *92*(8), fiw114. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw114>
- Chen, J., Elsgaard, L., Van Groenigen, K. J., Olesen, J. E., Liang, Z., Jiang, Y., Lærke, P. E., Zhang, Y., Luo, Y., Hungate, B. A., Sinsabaugh, R. L., & Jørgensen, U. (2020). Soil carbon loss with warming: new evidence from carbon-degrading enzymes. *Global*

- change biology*, 26(4), 1944-1952. <https://doi.org/10.1111/gcb.14986>
- Corallo, A. B., del Palacio, A., Oliver, M., Tiscornia, S., Simoens, M., Cea, J., de Aurrecoechea, I., Martínez, I., Sanchez, A., Stewart, S., & Pan, D. (2023). Fusarium species and mycotoxins associated with sorghum grains in Uruguay. *Toxins*, 15(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/toxins15080484>
- Corrales Ramírez, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 68-79.
- Dai, Z., Guo, X., Yin, H., Liang, Y., Cong, J., & Liu, X. (2014). Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage. *Plos one*, 9(2), e87976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087976>
- Davenport, P. W., Griffin, J. L., & Welch, M. (2015). Quorum sensing is accompanied by global metabolic changes in the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 197(12), 2072-2082. <https://doi.org/10.1128/jb.02557-14>
- del Palacio, A., Corallo, B., Simoens, M. et al. Major Fusarium species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay. *Mycotoxin Res* 39, 379–391 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00498-y>
- Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(20), 8607-8619. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5>
- Evangelista-Martínez, Z., Gastélum-Martínez, E., Uc Varguez, A., Quiñones Aguilar, E. E., Rincon-Enriquez, G., ELORZA, A., Vaz Jauri, P., Taulé, C., Siri, M., & Battistoni, F. (2024). *Inoculantes microbianos*.
- Flores-Ortiz, C. M., Cabañas-Cabrera, A., Peñalosa-Castro, I., Quintanar-Zúñiga, R. E., Vázquez-Medrano, J., & Urzúa-Meza, M. A. (2009). Auxinas endógenas, AIA-oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(1), 61-66.

<https://doi.org/10.35196/rfm.2009.1.61-66>

- Galván, G., Porta, B., Vidal, R., Rivas, M., Peluffo, S., González, H., de Souza, M. G., & Bellenda, B. (s. f.). *Valoración de las semillas criollas y recursos genéticos nativos del Uruguay*.
- Gimeno, A., Kägi, A., Drakopoulos, D., Bänziger, I., Lehmann, E., Forrer, H. -R., Keller, B., & Vogelgsang, S. (2020). From laboratory to the field: biological control of *Fusarium graminearum* on infected maize crop residues. *Journal of applied microbiology*, 129(3), 680-694. <https://doi.org/10.1111/jam.14634>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61, 793-796. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.793-796.1995>
- Gogos, A., Jimenez, J. C., Chang, J. C., Wilkening, R. V., & Federle, M. J. (2018). A quorum sensing-regulated protein binds cell wall components and enhances lysozyme resistance in streptococcus pyogenes. *Journal of bacteriology*, 200(11), 10.1128/jb.00701-17. <https://doi.org/10.1128/jb.00701-17>
- Hardoim, P. (2019). The ecology of seed microbiota. En S. K. Verma & J. F. White, Jr (Eds.), *Seed endophytes* (pp. 103-125). Springer international publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_6
- Harrell FE Jr, with contributions from many others (2023). Hmisc: harrell miscellaneous. R package version 5.1-0. Available from <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>.
- Juárez-Rosete, C. R., Aguilar-Castillo, J. A., Bugarín-Montoya, R., Aburto-González, C. A., & Alejo Santiago, G. (2019). Medios de enraizamiento y aplicación de auxinas en la producción de plántulas de fresa. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(1), 1-13. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1319
- Lyu, D., Msimbira, L. A., Nazari, M., Antar, M., Pagé, A., Shah, A., Monjezi, N., Zajonc, J., Tanney, C. A. S., Backer, R., & Smith, D. L. (2021). The coevolution of plants and microbes underpins sustainable agriculture. *Microorganisms*, 9(5), 1036.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9051036>

Martinez-Rodriguez, A., Gloria Macedo-Raygoza, Aurora X. Huerta-Robles, Ileana Reyes-Sepulveda, Jhovana Lozano-Lopez, Evelyn Y. García-Ochoa, Luis Fierro-Kong, Marisa H. G. Medeiros, Paolo Di Mascio, James Francis White, Jr, & Miguel J. Beltran-Garcia. (2019). Agave seed endophytes. *Google Docs*.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_8

MGAP-DIEA, 2023. Encuesta agrícola Invierno 2023. Serie Encuestas, 370.

Nithya, K., Muthukumar, C., Duraipandiyan, V., Dharumadurai, D., & Thajuddin, N. (2015).

Diversity and antimicrobial potential of culturable actinobacteria from desert soils of Saudi Arabia. 7, 117-122.

Nourozian, J., Etebarian, H. R., & Khodakaramian, G. (s. f.). Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. 2006.

Pal, G., Kumar, K., Verma, A., White, J., & Verma, S. K. (2019). *Functional roles of seed-inhabiting endophytes of rice* (pp. 213-236).

https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_11

Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., & Uhlík, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity.

Biotechnology Advances, 44, 107614.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107614>

Perry, D., Oren, R., & Hart, S. (2008). *Forest ecosystems*.

Rivas R, Velázquez E, Valverde A, Mateos PF, Martínez-Molina E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22(2): 1086- 1089.

Schlatter, D., Song, Z., Vaz Jauri, P., & Kinkel, L. (2019). Inhibitory interaction networks among coevolved *Streptomyces* populations from prairie soils. *PLOS ONE*, 14, e0223779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223779>

Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., & Lee, I.-J. (2018). What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant

- growth. *Frontiers in plant science*, 9, 24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00024>
- Shao, J., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2015). Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and fertility of soils*, 51(3), 321-330. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0978-8>
- Shi, G., Sun, H., Calderón-Urrea, A., Li, M., Yang, H., Wang, W., & Su, G. (2021). Bacterial communities as indicators of soil health under a continuous cropping system. *Land degradation & development*, 32(7), 2393-2408. <https://doi.org/10.1002/ldr.3919>
- Stevens, E., Armstrong, K., Bezar, H., Griffin, W., & Hampton, J. (2004). Fodder oats: an overview.
- Taulé, C., Vaz Jauri, P., & Battistoni, F. (2021). Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. *World journal of microbiology and biotechnology*, 37. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02966-4>
- Terry J. Gentry, Jeffrey J. Fuhrmann, & David A. Zuberer (Eds.). (2021). *Principles and applications of soil microbiology* (3.^a ed.).
- Varga, T., Hixson, K. K., Ahkami, A. H., Sher, A. W., Barnes, M. E., Chu, R. K., Battu, A. K., Nicora, C. D., Winkler, T. E., Reno, L. R., Fakra, S. C., Antipova, O., Parkinson, D. Y., Hall, J. R., & Doty, S. L. (2020). Endophyte-promoted phosphorus solubilization in populus. *Frontiers in plant science*, 11, 567918. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.567918>
- Vaz Jauri, P., Taulé, C., Santos, M., Fernández, B., Di Paolo Forne, A., Sotelo-Silveira, J., & Battistoni, F. (2020). Interactions between putatively endophytic bacteria and tall fescue (*Festuca arundinacea*): plant growth promotion and colonization in host and non-host cultivars. *Plant and Soil*, 451, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04359-5>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.

- Walitang, D. I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y. K., Kang, Y., & Sa, T. (2017). Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC microbiology*, 17(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>
- Wallace, J. G. (2023). Maize seed endophytes. *molecular plant pathology*, 24(7), 801-810. <https://doi.org/10.1111/mpp.13278>
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-UI-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(7), 2955-2965. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6487-3>
- Wickham H (2016). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-verlag new york. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Zhang, K., Delgado-Baquerizo, M., Zhu, Y.-G., & Chu, H. (2020). Space is more important than season when shaping soil microbial communities at a large spatial scale. *Msystems*, 5(3), 10.1128/msystems.00783-19. <https://doi.org/10.1128/msystems.00783-19>
- Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The distribution of tryptophan-dependent Indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. *Molecules*, 24(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>

ANEXO

Composición de los medios de cultivo utilizados:

Tabla 3. Composición del medio Tryptone Yeast (TY)

Reactivo	g/l
Triptona	5
Extracto de levadura	3
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9
Agar	16

Tabla 4. Composición del medio Starch Casein Agar (SCA)

	Reactivo	g/l
	Almidón	10
	Caseína	0,3
	CaCO ₃	0,02
	Agar	15
	Solución A	100ml
	Solución B	100ml
Solución A	Reactivo	g/l
	KNO ₃	20
	NaCl	20
	K ₂ HPO ₄	20

Solución B	Reactivo	g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,02

Tabla 5. Composición del medio Pectinase screening agar medium (PSAM)

Reactivo	g/l
NaNO ₃	2
KCl	0,5
MgSO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	1
Triptona	0,5
Pectina	10
Agar	16

Tabla 6. Composición del medio Papa dextrosa agar (PDA)

Reactivo	g/l
Extracto de papa	200
Dextrosa	20
Agar	15

Tabla 7. Composición del medio National botanical research institute's phosphate growth medium (NBRIP)

Reactivo	g/l
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5

MgCl ₂ .6H ₂ O	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
KCl	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
Agar	16

pH ajustado a 7.0 previo al autoclavado

Tabla 8. Composición del medio triptófano

Reactivo	g/l
L-Triptófano	10
NaCl	5

Calibración de curva de absorbancia a 536 nm para AIA

Tabla 9. Valor de absorbancia a 536 nm para soluciones de concentración conocida de AIA (Glickmann & Dessaux, 1995)

Concentración (mg/ml)	ABS
0,1	2,091
0,08	1,789
0,06	1,434
0,04	0,856
0,02	0,333
0,005	0,368
0,001	0,085
0,0005	0,014

Protocolo de extracción de ADN (Rivas et al., 2005):

- Centrifugar células en suspensión a 13000 rpm por 2 minutos
- Extraer sobrenadante
- Resuspender precipitado en 100 uL de NaOH 0,05 M, en incubar a 100°C por 4 minutos.
- Llevar a hielo por 2 minutos
- Agregar 500 uL H₂O_{mq}
- Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
- Extraer sobrenadante y descartar pellet.

Tabla 10. Tasas de germinación, riqueza (R), Abundancia* (UFC) y Diversidad de microorganismos recuperados en cada medio de cultivo para cada una de las réplicas experimentales

Germinación (%)	UFC BT	R BT	Diversidad BT	UFC ACT	R ACT	Diversidad ACT
96,0	6,48	1	0,0000	5,64	1	0,0444
100,0	6,30	3	0,4918	4,71	3	0,4416
100,0	4,70	1	0,0000	6,25	2	0,0660
100,0	0,00	0	0,0000	0,00	0	0,0000
43,0	0,00	0	0,0000	0,00	0	0,0000
100,0	3,60	3	0,8333	0,00	0	0,0000
96,0	4,34	1	0,0000	4,15	2	0,6417
100,0	4,95	2	0,2392	3,78	1	0,2857
100,0	3,60	2	0,6667	4,72	2	0,1401
54,2	5,00	1	0,0000	5,20	2	0,1823
33,3	6,10	2	0,3260	6,34	2	0,2961
76,9	5,83	4	0,5631	6,15	3	0,7868

8,0	5,89	2	0,0256	0,00	0	0,0000
0,0	5,19	2	0,0129	0,00	0	0,0000
0,0	4,67	2	0,0833	0,00	0	0,0000
52,2	4,98	1	0,0000	4,84	2	0,4813
0,0	5,63	3	0,6489	4,00	3	0,7564
52,2	3,48	1	0,0000	5,25	3	0,3701
52,0	0,00	0	0,0000	0,00	0	0,0000
80,8	4,30	2	1,0000	3,48	2	0,8000
93,8	0,00	0	0,0000	6,11	2	0,4646
12,0	6,30	1	0,0000	5,80	1	0,0313
0,0	3,00	1	0,0000	0,00	0	0,0000
0,0	4,73	2	0,0370	5,30	1	0,0099
48,0	0,00	0	0,0000	0,00	0	0,0000
82,1	0,00	0	0,0000	0,00	0	0,0000
59,1	0,00	0	0,0000	0,00	0	0,0000

* Las abundancias están expresadas como Log10 de la abundancia de microorganismos recuperados por cultivo (UFC/g)



Fig 6. Pirvas construidas *in situ* para el secado de las espigas.