

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas op. Microbiología

Caracterización de bacterias endófitas asociadas a variedades de arroz (*Oryza sativa*) y su comportamiento frente a BPCV

Nazarena Echevoyen Vila

Orientadora: Dra. Ana Fernández Scavino

Co-orientadora: Dra. Lucía Ferrando

Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental

Departamento de Biociencias, Facultad de Química y Unidad Asociada de
Microbiología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias. Udelar.

Montevideo, Uruguay

2015

Caracterización de bacterias endófitas de arroz y comportamiento frente a BPCV.

*“Toda situación es el símbolo de muchas, lo grande habla a través de lo chiquito
y el universo se ve por el ojo de la cerradura.”*

Eduardo Galeano,

Apuntes sobre la memoria y sobre el fuego.

ÍNDICE general

Pág.

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. La producción de arroz y sus implicancias.....	9
1.2. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).....	12
1.3. Microorganismos endófitos.....	14
1.3.1. Colonización de los tejidos vegetales.....	14
1.3.2. Mecanismos que promueven el crecimiento vegetal.....	18
1.3.2.1. Producción de sideróforos.....	19
1.3.2.2. Producción de ácido indolacético (AIA).....	21
1.3.2.3. Solubilización de fosfatos.....	22
1.4. Inoculantes....	24
1.4.1. Género <i>Azospirillum</i>	25
1.4.2. Género <i>Herbaspirillum</i>	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Caracterización endófitas aisladas de cultivo hidropónico.....	35
3.1.1. Estudio del potencial fijador de N ₂	36
3.1.1.1. Extracción de ADN y amplificación del gen <i>nifH</i>	37
3.1.1.2. Ensayo de reducción de acetileno (ARA).....	38
3.1.2. Solubilización de fosfato inorgánico.....	39
3.1.3. Producción de sideróforos.....	39
3.1.4. Producción de ácido indolacético.....	39
3.2. Búsqueda de cepas endófitas similares a G16.....	40
3.2.1. Desinfección de semillas.....	40
3.2.2. Aislamiento de bacterias endófitas y extracción de ADN.....	40
3.2.3. Amplificación del gen 16S.....	41
3.2.4. Secuenciación del gen 16S e identificación.....	41
3.3. Determinación de la abundancia de genes <i>nifH</i> en tejidos de plántulas de arroz.....	42
3.3.1. Extracción de ADN de plántulas de arroz.....	42
3.3.2. Amplificación y cuantificación de genes <i>nifH</i>	43

3.4.	Estudio de competencia entre bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y cepas endófitas o rizosféricas.....	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1.	Caracterización de cepas endófitas.....	47
4.2.	Selección de cepas endófitas similares a G16.....	51
4.3.	Abundancia de genes <i>nifH</i> en tejidos de arroz.....	53
4.4.	Competencia entre BPCV y cepas endófitas o rizosféricas.....	57
5.	CONCLUSIONES.....	60
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
7.	ANEXOS.....	70
7.1.	Composición de los medios de cultivo empleados.....	70
7.2.	Ejemplos de gráficos utilizados en la cuantificación de genes <i>nifH</i> por q-PCR.....	76
8.	AGRADECIMIENTOS.....	79

ÍNDICE de figuras

	Pág.
Fig. 1 Zonas arroceras del Uruguay.....	11
Fig. 2 Mecanismo de acción de la enzima nitrogenasa.....	13
Fig. 3 Tipos de endófitos y su proceso de colonización de la raíz.....	17
Fig. 4 Beneficios para la planta de la interacción con BPCV.....	18
Fig. 5 Microscopía electrónica de barrido (MEB) de <i>Azospirillum sp.</i>	26
Fig. 6 Micrografía electrónica de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	29
Fig. 7 Colonias productoras de sideróforos en medio R2A-CAS.....	49
Fig. 8 Colonias de bacterias endófitas de semillas de la variedad INIA Tacuarí.....	52
Fig. 9 Abundancia de copias de <i>nifH</i> / gramo de tejido vegetal, bloque I.....	54
Fig. 10 Abundancia de copias de <i>nifH</i> / gramo de tejido vegetal, bloque II.....	55
Fig. 11 Curva estándar para cuantificación de genes <i>nifH</i>	76
Fig. 12 Curva de cuantificación de <i>nifH</i> en escala lineal.....	77
Fig. 13 Curva de cuantificación en escala logarítmica.....	77
Fig. 14 Curva de melting.....	78

ÍNDICE de tablas

Tabla 1. Cepas potenciales promotoras del crecimiento vegetal (PCV) utilizadas.....	31
Tabla 2. Cepas asociadas a arroz aisladas en distintos experimentos y utilizadas en este trabajo.....	32
Tabla 3. Identificación de cepas endófitas de la variedad INIA Olimar caracterizadas en este estudio.....	36
Tabla 4. Primers usados en PCR.....	38
Tabla 5. Propiedades promotoras del crecimiento vegetal determinadas.....	50
Tabla 6. Características fenotípicas de las colonias seleccionadas.....	51
Tabla 7. Identificación y origen de cepas similares a G16.....	52
Tabla 8. Abundancia de copias de <i>nifH</i> / μ g de ADN extraído.....	56
Tabla 9. Inhibición del crecimiento de BPCV por cepas endófitas.....	59

RESUMEN

Los microorganismos endófitos son aquellos que, en alguna etapa de su vida, colonizan los tejidos internos de la planta, a veces en altos números, sin ocasionarle daño a su hospedador.

Éstos no sólo son inocuos para la planta, sino que además pueden tener efectos beneficiosos sobre la misma. Tales efectos se relacionan con la promoción del crecimiento mediante la secreción de factores reguladores del crecimiento, competencia con fitopatógenos por espacio y nutrientes, producción de sideróforos y antibióticos, solubilización de fosfatos inorgánicos y fijación biológica de nitrógeno (FBN), entre otros.

Si bien la FBN fue el mecanismo que atrajo en un principio el interés por el estudio de los microorganismos endófitos, actualmente se considera que otros mecanismos pueden contribuir al crecimiento y la salud vegetal, tanto o más que la FBN.

Estas propiedades han sido la base del desarrollo de inoculantes bacterianos. Actualmente se comercializan inoculantes para gramíneas que utilizan principalmente bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Los mismos deben ser aplicados a la semilla antes de la siembra para generar efectos beneficiosos sobre el desarrollo y rendimiento del cultivo.

Estudios recientes sugieren que es necesario conocer más acerca de los efectos de las interacciones biológicas entre las bacterias aplicadas como inoculantes y la comunidad microbiana nativa. El presente trabajo pretende aportar datos en esta línea de investigación.

Para ello, se caracterizaron cepas endófitas nativas asociadas al cultivo de arroz, estudiando el potencial diazotrofo, la capacidad de producir sideróforos y ácido indolacético (AIA) y de solubilizar fosfatos. Tanto la producción de sideróforos como la síntesis de AIA, fueron las propiedades promotoras del crecimiento vegetal más extendidas dentro del grupo de cepas analizado. Además se analizó la capacidad antagónica de las mismas frente a algunas BPCV.

Estudios previos han mostrado que la cepa G16, endófito de semilla de la variedad INIA-Olimar, inhibe el crecimiento de la cepa *Azospirillum brasilense* Az39 que es utilizada en formulaciones de inoculantes para arroz. Se realizó una selección de cepas similares a G16, posibles inhibidoras de BPCV, en otras variedades de semillas de arroz producidas en nuestro país, y se estudió su comportamiento frente a distintas cepas empleadas en formulaciones de inoculantes comerciales o con potencial para ello. Las cepas aisladas mostraron capacidad antagónica variada frente a las BPCV ensayadas.

Además se evaluó la abundancia de genes *nifH* en tejidos radiculares y parte aérea de plántulas de arroz cultivadas en condiciones hidropónicas bajo tres tratamientos diferentes: (A) inoculado con Az39, (B) co-inoculado con Az39+G16 y (C) control no inoculado. En general, en las raíces se detectó mayor abundancia de genes *nifH* que en los tejidos verdes, a excepción del tratamiento control.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La producción de arroz y sus implicancias.

El arroz (*Oryza sativa*) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), cuya semilla es comestible.

Es considerado el cereal más importante para la alimentación humana, proporcionando el 20 % del suministro de energía alimentaria del mundo (FAO, 2004).

Es un cultivo que exhibe gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, por lo que es el más extendido en el mundo. Puede crecer en condiciones de sequía o en aguas poco profundas (hasta 50 cm de profundidad), en una amplia gama de latitudes y hasta 3000 m de altitud. Por esta razón, es considerado un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria en el mundo por la FAO (Jiménez-Montaña *et al.*, 2014).

Uruguay es el sexto exportador a nivel mundial y el primero en Latinoamérica, participando con el 3 % del comercio de arroz a nivel internacional. Se producen aproximadamente 1.000.000 de toneladas anuales, de las cuales se exporta el 95 % (Aguerre, 2008). La zona arrocería se encuentra principalmente en el este, centro y norte de país (Figura 1), ocupando un área de 181.371 há (MGAP, 2012).

El nitrógeno (N) es el elemento más limitante para la producción de arroz (Prakamhang *et al.*, 2010). Forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, por lo que es esencial durante todo el ciclo del cultivo.

En suelos naturales, frecuentemente la concentración de N es un factor que limita el crecimiento vegetal, debido a que es removido en mayor cantidad que otros nutrientes y a su vez es escaso. La mayor proporción de nitrógeno en los suelos se

presenta en formas orgánicas (98%) y solo el 2% se encuentra en formas minerales inorgánicas que pueden servir a la nutrición vegetal (Frioni, 2006). Esta baja proporción es la razón por la que el empleo de fertilizantes nitrogenados ha sido una práctica recurrente en la agricultura extensiva. Los cultivos absorben sólo una parte del fertilizante aplicado que oscila entre el 10 y el 60% (Peña et al., 2001), dependiendo del cultivo, condiciones climáticas y características propias del suelo. De la fracción restante, una parte va a la atmósfera como N_2 o N_2O y otra es "lavada" por el proceso de lixiviación de nitratos (NO_3^-), produciéndose la contaminación de los acuíferos subterráneos, importantes fuentes de agua potable. El consumo de agua con altas concentraciones de nitrato se asocia a problemas de salud como metahemoglobinemia y algunos tipos de cáncer (Arumi et al., 2006).

En cuanto al efecto sobre el medio ambiente, las altas concentraciones de nitrógeno en las aguas pueden provocar eutrofización y favorecer la producción de óxido nitroso (N_2O), gas de efecto invernadero (Stoltzfus et al., 1997).

Además de los efectos ambientales y sobre la salud, se debe considerar también el aspecto económico, ya que los fertilizantes nitrogenados tienen costos elevados dado que son producidos mediante el proceso de Haber-Bosch, que requiere grandes cantidades de combustibles fósiles, fuentes de energía no renovables, y genera dióxido de carbono (CO_2), otro gas de efecto invernadero.

En Uruguay la fertilización nitrogenada del arroz se hace generalmente en forma fraccionada. Se realiza una aplicación a la siembra y otra cuando el cultivo está ya instalado, en las etapas de macollaje y de diferenciación del primordio floral. Las fuentes de N más usadas son las amoniacales, fosfatos mono y diamónico y amídicas, como urea (ACA, 2013).



Figura 1. Zonas arroceras de Uruguay.

Fuente: <http://www.aca.com.uy/oldsite/estadisticas/zonasarroceras.jpg>

Por otra parte, el N representa aproximadamente el 80% de la composición atmosférica, en forma de nitrógeno diatómico (N_2). El triple enlace de esta molécula la hace casi inerte y no aprovechable por la mayoría de los organismos. Sólo algunos microorganismos altamente especializados son capaces de metabolizarlo, entre los que se incluyen arqueas y bacterias (Mayz-Figueroa, 2004).

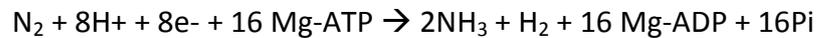
Se ha demostrado que ciertas bacterias, denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), son capaces de favorecer el crecimiento de las plantas, debido a que tienen la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico en formas metabolizables por los vegetales, entre otras propiedades que benefician a las plantas.

En busca de hacer a la producción de arroz más sustentable en términos ambientales y económicos, se han dirigido los esfuerzos al desarrollo de técnicas que permitan independizar al cultivo de la aplicación de fertilizantes químicos, haciendo foco en las BPCV para la formulación de inoculantes.

1.2. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

Para ser utilizado en el crecimiento vegetal, el N₂ debe ser reducido y combinado en forma de iones amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻). En la naturaleza esto ocurre mediante un proceso que se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Mayz-Figueroa, 2004).

El proceso de reducción es catalizado por el complejo nitrogenasa, bajo la reacción:



Para producir la reacción es necesaria la presencia de poder reductor y energía (ATP), con un mínimo de 1 mol de H₂ producido por mol de N₂ reducido (Halbleib y Luden, 2000).

La nitrogenasa (Figura 2) es un complejo enzimático formado por dos subunidades; dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. Ambas contienen hierro y la dinitrogenasa contiene además molibdeno. El hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor denominado FeMo-Co, que es el centro donde se produce realmente la reducción del N₂ (Madigan *et al.*, 2004).

Los genes *nif* son fundamentales, ya que determinan la estructura de la nitrogenasa y se encuentran muy conservados, *nifD* y *nifK* codifican para la dinitrogenasa, mientras que la dinitrogenasa reductasa es codificada por el gen *nifH* (Masterson *et al.*, 1982).

El oxígeno inhibe la actividad del complejo nitrogenasa, de manera que los microorganismos fijadores han desarrollado estrategias que les permiten mantenerlo en concentraciones bajas que no afectan el funcionamiento, como alta tasa respiratoria, compartimentaciones o protección conformacional (Ureta y Nordlund, 2002).

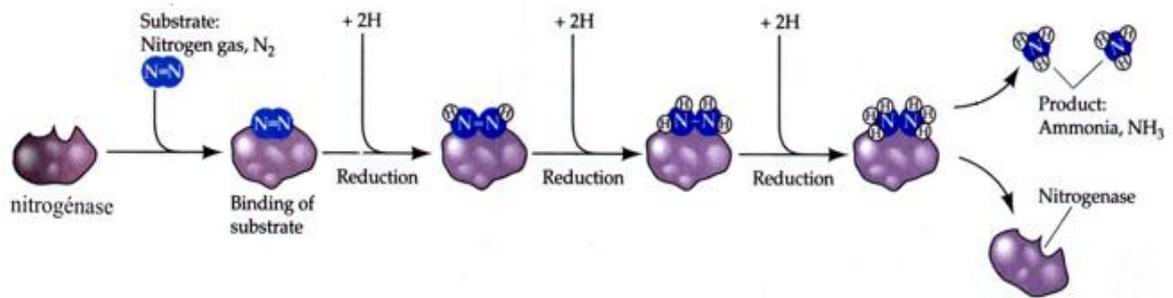


Figura 2. Mecanismo de acción de la enzima nitrogenasa. Modificado de: <http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/botanique/notesnutrition/notesnutrition4.htm>.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno son capaces de realizar este proceso en vida libre o en simbiosis con plantas, son capaces de realizar este proceso que, además de permitir la utilización del nitrógeno atmosférico por parte de las plantas, contribuye a reducir la degradación de los suelos y el uso de fertilizantes, beneficiando a los ecosistemas que son afectados por el exceso de residuos nitrogenados (Mayz-Figueroa, 2004).

La asociación simbiótica Rizobio-Leguminosa ha sido muy estudiada y es de gran uso en la práctica agrícola. Consiste en la infección de las células de la raíz por parte de los rizobios y la formación de estructuras tumorales características llamadas nódulos donde las bacterias llevan a cabo la FBN.

Posteriormente, fueron descubiertas bacterias capaces de realizar FBN no simbiótica asociadas a otras plantas de gran interés alimenticio y económico como las gramíneas, especialmente maíz y arroz. Estas bacterias pueden actuar en microaerobiosis y se establecen en los espacios intercelulares del córtex radicular en principio, pero también se han encontrado en otros tejidos.

1.3. Microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos son aquellos que en alguna etapa de su vida colonizan los tejidos internos de la planta, a veces en altos números, sin ocasionarle daño a su hospedador ni provocar respuestas defensivas (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011).

Han sido identificados en diferentes tipos de tejidos vegetales, aislándolos a partir de muestras esterilizadas en superficie. Hallmann et al. 1997, consideran endófitas a aquellas bacterias detectadas dentro de plantas cuya superficie ha sido esterilizada, y que no generan efectos nocivos sobre la salud de las mismas.

Pero estos microorganismos no sólo son inocuos para las plantas, sino que además pueden tener efectos beneficiosos sobre ellas. Tales efectos se relacionan con la promoción del crecimiento y salud de la planta mediante la secreción de factores reguladores del crecimiento, producción de ACC-desaminasa, competencia con fitopatógenos por espacio y nutrientes, producción de sideróforos y antibióticos, solubilización de fosfatos inorgánicos y FBN.

Los microorganismos se benefician del ambiente estable (en cuanto a temperatura, presión osmótica y radiación UV) y con mayor disponibilidad de nutrientes que brinda la planta, mientras que su presencia contribuye al crecimiento vegetal y a la reducción del estrés nutricional y patogénico, lo que tiene como consecuencia una mayor estabilidad en los ecosistemas (Hardoim *et al.*, 2008).

1.3.1. Colonización de los tejidos vegetales

Las bacterias endófitas ingresan a la planta principalmente vía raíz, a través de los pelos radiculares o de los sitios de daño epidérmico o exodérmico, que

aparecen naturalmente durante el desarrollo de las raíces laterales, así como también a través de la zona de diferenciación y elongación próxima a la punta de la raíz, donde los tejidos poco diferenciados facilitan la entrada (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011).

En un primer momento, las bacterias de la rizósfera pueden acercarse a las raíces de forma pasiva, por medio de flujos de agua, o en forma activa, por quimiotaxis y movimientos flagelares. El segundo paso involucra la adsorción a la superficie radicular en forma no específica, seguida del anclaje. Luego, la secreción de exudados por parte de la planta podría proveer nutrientes o inducir la expresión de ciertos genes en la bacteria, que le otorguen la capacidad de entrar a la raíz a través de los sitios de daño o los pelos radiculares (van der Lelie *et al.*, 2009).

Si bien los endófitos se distribuyen sobre todo en la raíz, hay estudios que indican que su densidad es mayor en las zonas de unión intercelular de la epidermis radicular (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001). Esto probablemente se deba al mayor espacio y posibilidad de movilidad que brindan estas regiones y a que la capa mucilaginosa que tapiza la epidermis tiene menor tensión en estas zonas (Bowen, 1979). Puede agregarse también que la concentración de carbono como fuente de energía es mayor en esta parte de la raíz lo que favorece el crecimiento de estos microorganismos (Bennet y Lynch, 1981).

Algunos autores proponen la degradación enzimática de la pared celular vegetal, por parte de enzimas celulolíticas o pectinolíticas, como mecanismo activo de entrada a la epidermis radicular, sólo en la fase de penetración temprana, pero se conoce poco acerca del origen y regulación de estas enzimas (Senthilkumar *et al.*, 2011). De todas maneras hay controversias sobre este mecanismo, dado que se han encontrado más enzimas hidrolíticas en las bacterias del suelo que en aquellas habitantes del xilema, lo que sugiere como poco probable que este mecanismo sea la principal vía de entrada (Bell *et al.*, 1995).

Además, la producción de enzimas degradadoras de la pared celular no es conveniente en estos microorganismos ya que les podría conferir patogenicidad. Se ha observado que también son capaces de ingresar a los tejidos de las plantas a través de estomas y lenticelas de tallos y hojas, aunque la raíz sigue siendo la principal vía de entrada (Mano *et al.*, 2008).

Una vez dentro de la planta, estos microorganismos migran a través del tejido vascular o del apoplasto para colonizar otros órganos, o bien pueden permanecer en el córtex radicular o establecerse en el mismo xilema (Compant *et al.*, 2010), pero no penetran en las células.

Se ha observado que algunas bacterias pueden formar microcolonias en la superficie radicular y ser capaces de colonizar heridas por eventos estocásticos, convirtiéndose en endófitos pasajeros, pero esta colonización se limita sólo al córtex de la raíz. Se reconocen también endófitos oportunistas (células coloreadas de azul en la Figura 3) que, al igual que los anteriores, limitan la colonización al córtex radicular. En este caso presentan respuestas quimiotácticas o electrostáticas que les permiten establecerse en el rizósfera en un primer momento y luego ingresar a los tejidos internos a través de los puntos de emergencia de las raíces laterales (Hardoim *et al.*, 2008).

Por último, los microorganismos endófitos propiamente dichos son llamados endófitos competentes, estos poseen todas las características de los endófitos oportunistas pero además se adaptan bien al medio interno de la planta, son capaces de invadir el tejido vascular y utilizarlo como vía de transporte para extenderse a los demás tejidos, manteniendo un equilibrio armonioso con el huésped, incluso cuando se encuentran presentes en alta densidad (Hardoim *et al.*, 2008) (Figura 3).

Se ha detectado que la composición de la comunidad endófitas microbiana varía según el estado de desarrollo de la planta y además difiere en los distintos órganos, ya sean raíces, tallos, hojas, flores e incluso frutas y semillas, lo que indica diversas capacidades de colonización. Sin embargo, la mayoría de las flores y frutas contienen endófitos en bajas densidades, alcanzando hasta $10^2 - 10^3$ UFC/g de peso fresco (Berg *et al.*, 2005).

Los primeros pasos de la colonización dependen de factores ecológicos propios de la comunidad de endofítica como son la abundancia inicial, diversidad, estado fisiológico y distribución en el suelo. También dependen de factores propios de la planta: genotipo, etapa de crecimiento y estado fisiológico, y características ambientales en cuanto a prácticas agrícolas, que determinan la estructura de la comunidad microbiana del suelo (Hardoim *et al.*, 2008).

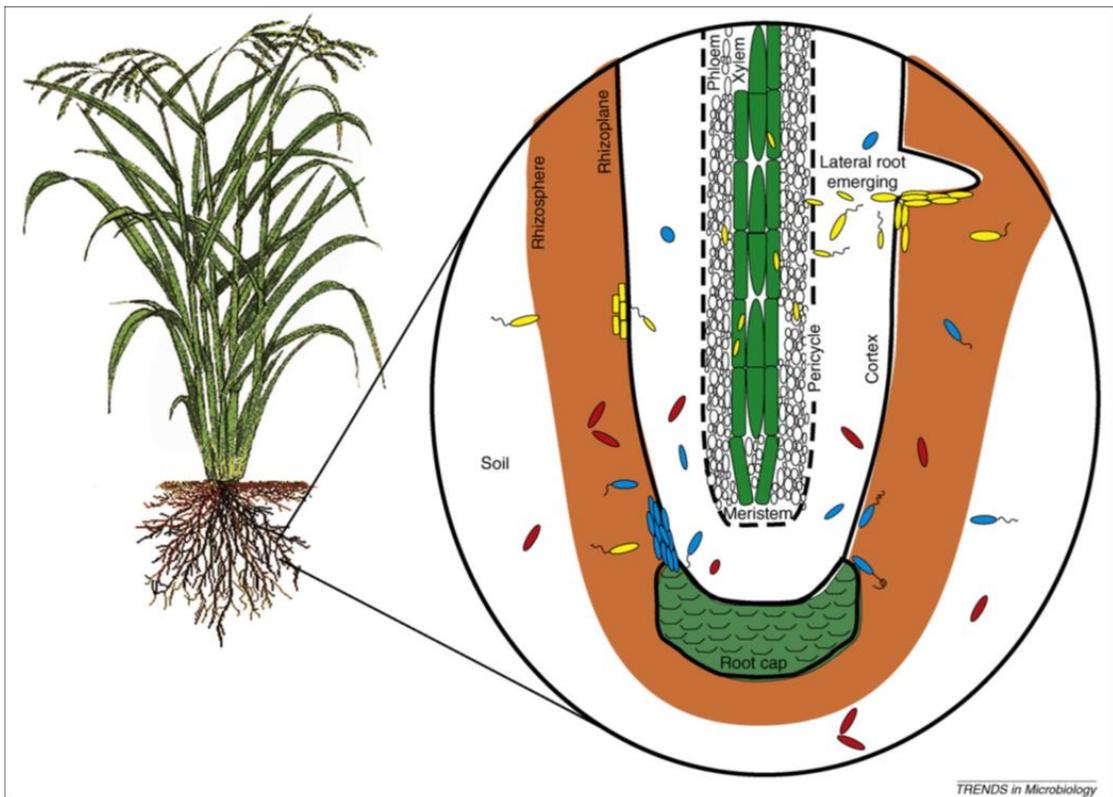


Figura 3. Tipos de endófitos y su proceso de colonización de la raíz. Se representan los endófitos pasajeros (células azules), endófitos oportunistas (células rojas) y endófitos competentes (células amarillas). Fuente: Hardoim *et al.*, 2008.

1.3.2. Mecanismos que promueven el crecimiento vegetal

Si bien la FBN fue el mecanismo que atrajo en un principio el interés por el estudio de los microorganismos endófitos, actualmente se considera que pueden contribuir al crecimiento y la salud vegetal a través de otros procesos, en forma directa como indirecta (Figura 4).

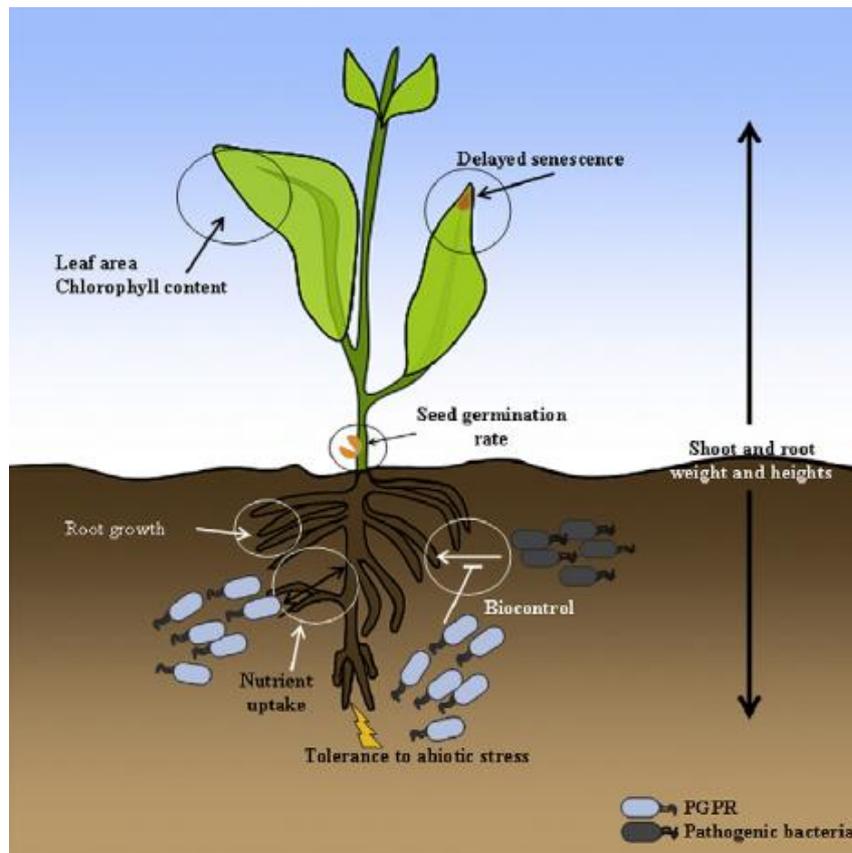


Figura 4. Beneficios para la planta de la interacción con BPCV. Fuente: Pérez-Montaña *et al.*, 2014.

Como beneficios directos para la planta se pueden señalar varios mecanismos como la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato ACC-desaminasa que reduce los niveles de etileno en las raíces principalmente, síntesis de reguladores del crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas, citoquininas), FBN, solubilización de fosfatos minerales y producción de sideróforos.

Los beneficios indirectos están relacionados al biocontrol, mediante la actividad antagonista frente a fitopatógenos, sea por producción de antibióticos o competencia por el nicho ecológico y la interferencia en los sistemas bacterianos de Quorum Sensing (QS) (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

La comprensión de todos estos mecanismos es fundamental para contribuir a mejorar la producción de alimentos en suelos agrícolas.

1.3.2.1. Producción de sideróforos

El hierro, a pesar de ser abundante en algunos suelos, puede convertirse en un factor limitante del crecimiento bacteriano y vegetal en suelos aeróbicos y con pH cercano a 7, dado que en estas condiciones forma complejos de hidróxido de hierro insolubles que no pueden ser utilizados por los microorganismos ni las plantas. Además, la concentración de hierro disminuye al aumentar el pH del suelo, principalmente en los de tipo calcáreo. En el caso de suelos con pH bajo, inferior a 6, el hierro disponible (ión ferroso, Fe^{2+}) aumenta.

Algunas bacterias endofíticas, en su mayoría Gram negativas, tienen la capacidad de producir y secretar sideróforos, moléculas de bajo peso molecular (de 500 a 1500 Da) que actúan como agentes quelantes de hierro, facilitando la solubilización y captación del metal porque poseen una elevada constante de afinidad por el ión férrico (Fe^{3+}).

Otras bacterias y las plantas han desarrollado la capacidad de utilizar los sideróforos producidos por especies bacterianas o fúngicas.

La regulación de la biosíntesis de estas moléculas ocurre en respuesta a las concentraciones ambientales de hierro, tanto estimulando como inhibiendo su producción, mediante la expresión de los genes adecuados. Se han identificado estos sistemas reguladores en *Pseudomonas* y en muchos otros géneros de bacterias (Atlas y Bartha, 2002).

En situaciones de altas concentraciones de hierro en el medio, los genes involucrados en la producción de sideróforos se encuentran reprimidos por la unión de proteínas dependientes de Fe^{3+} al ADN ubicado antes del sitio de inicio de la transcripción, lo que impide su síntesis. En condiciones de escasez de hierro, el Fe^{3+} se disocia de las proteínas represoras, lo que activa la transcripción de estos genes (Aguado y Santacruz, 2012).

Existen referencias que indican que la presencia de sideróforos bacterianos puede favorecer el crecimiento vegetal, tanto de manera directa como indirecta. Los sideróforos bacterianos pueden ser utilizados por parte de las plantas para favorecer la captación de hierro, favoreciendo la producción de clorofila y resultando en plantas más verdes y saludables. Esta propiedad ha sido de especial interés para el desarrollo de inoculantes (Welbaum *et al.*, 2004).

Investigaciones recientes proponen focalizar los estudios en los beneficios indirectos que proporciona a la planta la presencia de estas moléculas en el ambiente, en este sentido es interesante el hecho de que las bacterias productoras de sideróforos poseen una ventaja competitiva frente a ciertos patógenos, limitando su crecimiento, pero la inhibición puede ser revertida si se agrega hierro en el suelo. Por ejemplo, *Azospirillum brasilense*, capaz de fijar nitrógeno y producir ácido indolacético (AIA), también puede controlar al hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* en cultivos de fresa mediante la producción de sideróforos (Tórtora *et al.*, 2011).

En suelos uruguayos las mayores antagonistas de hongos fitopatógenos de arroz (*Rhizoctonia oryzae* y *Sclerotium oryzae*) resultaron ser bacterias productoras de sideróforos de los géneros *Burkholderia* y *Pantoea* (Loaces, 2011).

Las especies de *Pseudomonas* también son conocidas por su capacidad de producir sideróforos, incluso los pigmentos fluorescentes que permiten identificarlas son sideróforos, como la pioverdina o pseudobactina (Frioni, 1999).

Por otra parte, Loaces *et al.*, 2011, proponen estudiar la comunidad endófito nativa, ya que se han identificado cepas naturales productoras de sideróforos capaces de competir exitosamente, actuando de forma antagónica, frente a las bacterias inoculadas en cultivos de arroz en suelos uruguayos.

1.3.2.2. Producción de ácido indol acético (AIA)

El ácido indol acético (AIA) es la auxina más ampliamente distribuida en las plantas. Es una fitohormona, es decir, un compuesto regulador del desarrollo vegetal.

Beneficia a la planta de manera multidimensional ya que, entre varios efectos, influye en el crecimiento, la dominancia apical, el incremento de la división celular, y principalmente estimula el desarrollo de las raíces y el incremento de los pelos radiculares, aumentando la densidad radicular, lo que conlleva a una mayor absorción de nutrientes y mejor rendimiento de los cultivos (Lara *et al.*, 2011). Incluso algunos autores vinculan la producción a esta fitohormona con un aumento de la permeabilidad celular, que conlleva un incremento de la exudación a nivel de raíz.

Algunas auxinas, como el AIA, son sintetizadas por bacterias pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc. (Castillo *et al.*, 2005). El aporte exógeno de auxinas en las plantas superiores corresponde en un 80% a las bacterias rizosféricas. Un aumento de la concentración de la hormona en los tejidos vegetales debido a la actividad microbiana, puede compensar niveles sub-óptimos y modificar el metabolismo celular, con efectos beneficiosos fundamentalmente en el desarrollo del sistema radicular (Cassan *et al.*, 2004). Además se han observado los mismos beneficios con la adición de giberelinas o AIA que con la inoculación de bacterias productoras como *Azospirillum*, lo que indica que el incremento en los rendimientos se debe a estas sustancias (Fulcheri, 1992).

En el contexto de una agricultura basada en prácticas sustentables, la producción microbiológica de fitohormonas es una alternativa interesante.

1.3.2.3. *Solubilización de fosfato*

El fósforo (P) es un elemento esencial para todos los sistemas vivos, dado que forma parte de los fosfolípidos, los ácidos nucleicos y el ATP, entre otras moléculas fundamentales. Sin embargo su disponibilidad en la biósfera es baja, y frecuentemente es un factor limitante para el crecimiento microbiano.

Además, la disponibilidad en los suelos se ve aún más restringida por su tendencia a precipitar y volverse insoluble en presencia de metales bivalentes como calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) y el ion férrico (Fe^{3+}) a pH neutro o alcalino (Atlas y Bartha, 2002). Esta característica le confiere baja movilidad y limita su transporte hacia la raíz, por lo que una mayor densidad radicular es fundamental para lograr un mayor aprovechamiento del nutriente.

Frente a este panorama la alternativa ha sido principalmente la aplicación de fertilizantes fosfatados, pero se sabe que una porción del fósforo soluble aplicado en forma de fertilizantes es rápidamente inmovilizado en el suelo luego de su aplicación, y volviéndose inaccesible para las plantas. Por esto, la liberación de las formas insolubles y fijas del fósforo es fundamental para incrementar la disponibilidad del nutriente en el suelo (Nautiyal, 1999).

Algunos microorganismos son capaces de solubilizar estas formas insolubles del fosfato, aprovechándolas o haciéndolas accesibles para otros microorganismos e incluso para los vegetales. Esta capacidad les confiere una ventaja competitiva frente a otros microorganismos.

La capacidad bacteriana de solubilizar P mineral está relacionada con la liberación de ácidos orgánicos como el oxálico, malónico, succínico o glucónico, que

incrementan la concentración de protones en el suelo, capaces de desplazar iones de Ca^{2+} , Fe^{2+} y Al^{3+} que se encuentran unidos al fósforo inorgánico.

Por otra parte, el fósforo orgánico puede ser mineralizado reduciéndolo a moléculas más pequeñas, por acción de enzimas microbianas como fosfatasas y fitasas (Patiño, 2010).

Un aspecto que ha cobrado interés recientemente es la posibilidad de que este mejor aprovechamiento de los recursos limitantes por parte de las bacterias solubilizadoras les permita, en algunos casos, actuar como agentes de biocontrol, compitiendo exitosamente frente a otros microorganismos fitopatógenos, inhibiendo su crecimiento (Khan *et al.*, 2009)(Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

Actualmente, el foco de interés se sitúa en los microorganismos que además de solubilizar fosfato, son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante otros mecanismos, como puede ser la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico o la producción de fitohormonas. Bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum* poseen ambas propiedades (Kennedy *et al.*, 2001).

1.4. Inoculantes

Desde 1950 la producción agrícola ha ido aumentando enormemente, en pos de aumentar la producción de alimentos para una población mundial creciente. La aplicación de fertilizantes químicos, pesticidas y herbicidas, la técnica del monocultivo y el desarrollo de nuevas variedades de semillas permitió multiplicar la producción sin aumentar las extensiones de cultivos, a razón de incrementar el rendimiento por hectárea, lo que se conoce como Revolución Verde. Con estas técnicas se logró que países que eran deficitarios en la producción de alimentos, principalmente en América Latina y Asia, lograran convertirse en exportadores.

En los años 70 comenzaron a surgir críticas al modelo, sobre todo en base a los daños ambientales y a la dependencia del petróleo que crea esta forma de producción agrícola.

Hoy en día es necesario mantener estos altos niveles de producción, pero además es urgente encontrar caminos que reduzcan el impacto negativo sobre el ambiente (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). La creciente preocupación por la búsqueda de formas de producción sostenibles ha ido favoreciendo el empleo de microorganismos benéficos en los cultivos de interés comercial. Así, la producción y comercialización de inoculantes está encaminada en el fortalecimiento de estos sistemas de producción (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000).

Los inoculantes bacterianos son concentrados de ciertas bacterias específicas que se aplican a la semilla antes de la siembra y tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo y rendimiento del cultivo, su acción se ejerce a través de los diferentes mecanismos mencionados; ya sea por FBN, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas y/o biocontrol de fitopatógenos. Es deseable que un inoculante actúe de manera multidimensional.

Desde hace varias décadas se conocen los beneficios de la asociación Rizobio-Leguminosa, donde la FBN aporta casi la totalidad del N necesario para la producción de leguminosas.

En comparación con la FBN simbiótica, el aporte de N fijado por microorganismos no es tan eficiente en el caso de la asociación de especies no-leguminosas con bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum*. Sin embargo, el desarrollo de inoculantes con bacterias diazótrofes endófitas permite suplir parte del N necesario para el desarrollo del cultivo de arroz, entre otros beneficios, contribuyendo a hacer más sustentable su producción, reducir los costos y disminuir la contaminación ambiental (Silva Ferreira *et al.*, 2010).

1.4.1. Género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* pertenece a la familia *Rhodospirillaceae*, subclase de las *Alfaproteobacterias*. Fue descrito inicialmente por Dobernenier en 1984, incluyendo a la primer bacteria endófitas aislada, denominada *Spirillum lipoferum* por Beijerinck en 1925 (Tarrand *et al.*, 1979).

Son bacterias fijadoras de nitrógeno, aerobias y se clasifican como endófitos facultativos, ya que son capaces de colonizar tanto la superficie como el interior de las raíces, dependiendo de la cepa (Baldani *et al.*, 1997).

Morfológicamente son bastones ligeramente curvados, gram-negativos, que pueden acumular gránulos de poli-B-hibroxibutirato, y presentan un flagelo polar que les brinda movilidad en medio líquido (Figura 5). Son positivos para las pruebas de oxidasa y catalasa (Tarrand *et al.*, 1978).

Se observan asociados generalmente a raíces de cereales y gramíneas, aunque también se los ha encontrado dentro de tallos, hojas y semillas (Grifoni *et al.*,

1995). La ocurrencia de *Azospirillum* está muy extendida en el medio ambiente, las bacterias de este género han sido aisladas de varias especies cultivadas en distintos tipos de suelos y en diferentes latitudes (Eckert *et al.*, 2001). Se encuentran especialmente en suelos tropicales y subtropicales, aunque también aparecen en regiones templadas (Lavrinenko *et al.*, 2010).

Actualmente, *Azospirillum* es uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados, debido a su capacidad de mejorar el crecimiento, desarrollo y rendimiento de especies vegetales de interés agrícola.



Figura 5. MEB (Microscopía Electrónica de Barrido) de *Azospirillum sp.* donde se puede observar la morfología característica. Fuente: http://www.visualphotos.com/image/1x8467155/azospirillum_sem

En un principio, la capacidad de promover el crecimiento vegetal de estas bacterias se vinculó a la fijación biológica de nitrógeno en vida libre y/o al incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas.

Sin embargo, investigaciones más recientes consideran que la capacidad de estos microorganismos de producir compuestos similares a fitohormonas explicaría mejor su efecto sobre el crecimiento vegetal (Cassan *et al.*, 2004).

Las especies del género *Azospirillum* tienen la capacidad de sintetizar varios reguladores del crecimiento vegetal como: ácido abscísico, etileno, ácido giberélico y ácido indolacético (Tien *et al.*, 1979). Son reconocidas por producir altos niveles de auxinas *in vitro* mediante distintas vías (Zhou *et al.*, 2013). Se conocen al menos tres vías de síntesis de auxinas dentro del género, dependientes de triptófano (Trp); indol 3-piruvato (AIP), indol 3-acetamida (AIM) y triptamina (Tam) y una que no lo utilizaría como precursor (Prinsen *et al.*, 1993). La magnitud de la expresión de cada una está relacionada al estado del crecimiento bacteriano y principalmente ligada a la disponibilidad de Trp en el medio. Si el aminoácido se encuentra disponible se favorece la vía AIPy en forma secundaria la AIM. Frente a concentraciones adecuadas de Trp, aumenta la expresión del gen *ipdC* en *Azospirillum*, que tiene como consecuencia un incremento en la biosíntesis de AIA (Van de Broek *et al.*, 1999).

Otros autores consideran que la acción beneficiosa de *Azospirillum* se debe a varios mecanismos que sumados promueven el crecimiento vegetal, lo que han llamado hipótesis aditiva (Bashan y Hoguein, 1997).

En cuanto al aporte de N, la inoculación de las semillas con *Azospirillum* no puede sustituir completamente el empleo de fertilizantes nitrogenados, pero permite reducir en un 40-50% la utilización de los mismos sin disminución en el rendimiento (Itzigsohn *et al.*, 2000).

La inoculación de especies vegetales con *Azospirillum* genera beneficios en varios aspectos, como aumento del desarrollo y ramificación de los pelos radicales que conllevan un incremento en la absorción de nutrientes y agua, aumento de la parte aérea de la planta, mejora la floración e incrementa el número de plantas por m², aumentando el rendimiento de la producción tanto en cereales como en forraje (Okon y Kapulnik, 1986).

1.4.2. Género *Herbaspirillum*

Inicialmente *Herbaspirillum* fue clasificado dentro del género *Azospirillum*, debido a similitudes morfológicas y de comportamiento, pero en 1986 Falk *et al.* realizaron estudios de hibridación ADN/ADN demostrando que se trataba de un nuevo género (Schmid *et al.*, 2006). La primer especie descrita fue *Herbaspirillum seropedicae* por Baldani *et al.* en 1986. El nombre del género hace referencia al hábitat de estos microorganismos, que fueron aislados por primera vez de raíces de plantas herbáceas en Seropédica, Brasil.

El género está representado por bacterias diazótrofes endófitas capaces de colonizar raíces y tejidos aéreos de diversas plantas, incluyendo arroz, sorgo, maíz y caña de azúcar (Punschke y Mayans, 2011). Al microscopio se observan como bacilos muy largos y delgados, con escasa movilidad que presentan flagelación variable, con uno a tres flagelos en uno a ambos polos (Figura 6). Son Gram negativos (Baldani *et al.*, 1986).

Son consideradas BPCV, debido a su capacidad para realizar fijación biológica de nitrógeno y a la producción de fitohormonas como AIA y giberelinas (Figueiredo *et al.*, 2008).

Ingresa a la raíz de la plántula de arroz a través de grietas en los puntos de aparición de las raíces laterales y posteriormente coloniza raíces, espacios intercelulares, aerénquima y células corticales. Además pueden penetrar el tejido vascular y a partir de entonces colonizar las células epidérmicas, los espacios intercelulares y cavidades subestomáticas de las hojas y el tallo (Mano *et al.*, 2008).

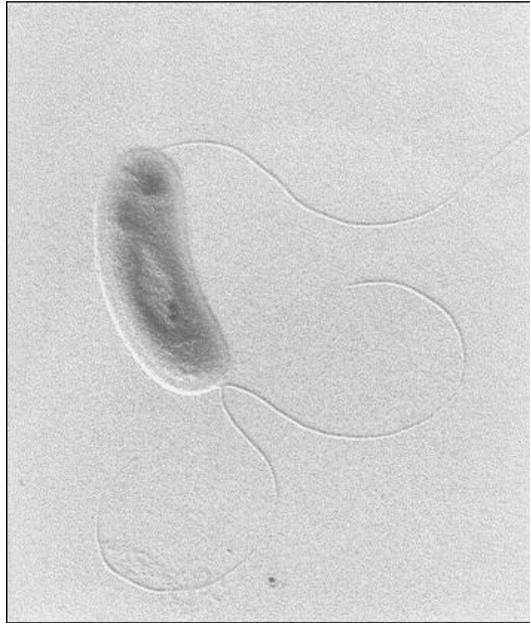


Figura 6. Micrografía electrónica de *H. seropedicae* donde se observa la flagelación característica. Fuente:

http://www.funpar.ufpr.br:8088/funpar/index.php?option=com_content&view=article&id=73

El medio interno de la planta les brinda protección frente a las fluctuaciones del ambiente y ventajas frente a la intensa competencia por nutrientes de la rizósfera, por lo que el género ha sido de gran interés para el desarrollo de inoculantes.

Experimentos de inoculación con diferentes cepas de *H. seropedicae* realizados en plántulas de arroz, cultivadas en macetas con suelos enriquecidos en ^{15}N , muestran que el aporte de N a través de FBN varía de 54 a 31% según la cepa inoculada. Pero en todos los casos las plántulas muestran incrementos medios y altos en su peso fresco en respuesta a la inoculación (Baldani *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo general:*

Estudiar cepas endófitas nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*).

2.2. *Objetivos específicos:*

- a) Caracterizar cepas endófitas asociadas al cultivo de arroz aisladas de un ensayo controlado en cultivo hidropónico.
- b) Determinar la abundancia de *nifH* en raíces y hojas de plántulas de arroz provenientes de un ensayo controlado en cultivo hidropónico.
- c) Aislar e identificar cepas endófitas potencialmente antagonistas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en semillas de las variedades INIA El Paso 144 e INIA Tacuarí.
- d) Determinar la capacidad antagonista *in vitro* de cepas endófitas nativas asociadas a arroz frente a bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A modo de resumen, las Tablas 1 y 2 muestran la totalidad de las cepas empleadas en este trabajo. Se señala el origen de las mismas y los análisis realizados para cada una, que serán detallados más adelante.

Tabla 1. Cepas de BPCV utilizadas en la región.

Cepa	Especie	Origen (Referencia)	Análisis realizados en este trabajo	
			Propiedades PCV (FBN, sideróforos, AIA, solubilización de fosfatos)	Inhibición del crecimiento por cepas endófitas
42M	<i>Azospirillum brasilense</i>	Rizósfera de maíz, Argentina (García de Salomone <i>et al.</i> , 2010)	√	
40M	<i>A. brasilense</i>	Rizósfera de maíz, Argentina (García de Salomone <i>et al.</i> , 2010)	√	√
Sp7	<i>A. brasilense</i>	Aislada de caña de azúcar, Brasil (Levanov y Bashan, 1991)	√	
Az39	<i>A. brasilense</i>	Asociada a trigo, Argentina (Rodríguez Cáceres, 1982)	√	√
CFN	<i>A. brasilense</i>	Cepa de uso comercial en Uruguay (Dobbelaere <i>et al.</i> , 2001)		√
AL	<i>A. brasilense</i>	Cepa de uso comercial en Uruguay		√
EMBRAPA	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Asociada a caña de azúcar, EMBRAPA, Brasil		√

HL	<i>H. seropedicae</i>	Endófitas de arroz, Uruguay (Punschke y Mayans, 2011)*	√
----	-----------------------	--	---

* Cepa proporcionada por la firma Lage & Cía. S.A.

Tabla 2. Cepas asociadas a arroz aisladas en distintos experimentos y utilizadas en este trabajo

Cepa	Especie	Origen (Referencia)	Análisis realizados en este trabajo	
			Propiedades PCV (FBN, sideróforos, AIA, solub. fosfatos)	Antagonismo de BPCV
G16	<i>Pseudomonas oryzae</i>	Grano de arroz desinfectado, variedad Olimar (Loaces <i>et al.</i> , 2011)	√	√
B11	<i>Pseudomonas sp.</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento B (Rariz, 2012) ^a	√	√
C10	<i>Pantoea ananatis</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento C (Rariz, 2012) ^b	√	√
C9	<i>P. oryzae</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento C (Rariz, 2012) ^b		√
EC4	<i>P. oryzae</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento C (Rariz, 2012) ^b		√
DR11	<i>Sphingomonas sp.</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento D (Rariz, 2012) ^c	√	√
KD4	<i>Methylobacterium sp.</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento D (Rariz, 2012) ^c	√	

Caracterización de bacterias endófitas de arroz y comportamiento frente a BPCV.

D10	<i>Pantoea sp.</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento D (Rariz, 2012) ^c	√	√
D5	<i>Microbacterium testaceum</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento D (Rariz, 2012) ^c	√	√
ED1	<i>P. oryzihabitans</i>	Tejidos de plántulas de ensayo hidropónico. Tratamiento D (Rariz, 2012) ^c	√	√
1b	<i>P. oryzihabitans</i>	Semillas de arroz desinfectadas variedad Tacuarí (*)		√
2a	<i>P. oryzihabitans</i>	Semillas de arroz desinfectadas variedad Tacuarí (*)		√
4 ^a	<i>P. oryzihabitans</i>	Semillas de arroz desinfectadas variedad Tacuarí (*)		√
G1C	<i>P. oryzihabitans</i>	Semillas de arroz desinfectadas variedad El Paso 144 (*)		√
G4	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	Semillas de arroz desinfectadas variedad El Paso 144 (*)		√
G7C	<i>P. psychrotolerans</i>	Semillas de arroz desinfectadas variedad El Paso 144 (*)		√
T3A	<i>Burkholderia ubonensis</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Rariz et al., 2013)		√
T3C	<i>Burkholderia cepacia</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Rariz et al., 2013)		√
T7B	<i>B. cepacia</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Rariz et al., 2013)		√

T7C	<i>Burkholderia ubonensis</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Rariz <i>et al.</i> , 2013)	√
T3G	<i>B. cepacia</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Rariz <i>et al.</i> , 2013)	√
B3	<i>Burkholderia latens</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Martínez, 2012)	√
B5	<i>Burkholderia tropica</i>	Solubilizadoras de fosfato en rizósfera de arroz (Martínez, 2012)	√
16	<i>H. seropedicae</i>	Diazótrofa endófitas de parte aérea de arroz, Uruguay (Rariz <i>et al.</i> , 2013)	√

(*) Cepas aisladas e identificadas en este trabajo

^a Tratamiento B= co-inoculado con *A. brasilense* y *P. oryzihabitans*

^b Tratamiento C= inoculado con *P. oryzihabitans*

^c Tratamiento D= no inoculado

3.1. Caracterización de cepas endófitas asociadas al cultivo de arroz aisladas de un ensayo controlado en cultivo hidropónico

Las cepas endófitas a estudiar se obtuvieron en un trabajo previo, a partir de un ensayo de cultivo hidropónico de arroz en condiciones controladas de humedad y temperatura (Rariz, 2012).

En el ensayo se utilizaron semillas desinfectadas de la variedad INIA Olimar, las cuales fueron inoculadas con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense*, que forma parte de la formulación de inoculantes comerciales, y la cepa G16 de *Pseudomonas oryzae*, aislada como endófito de esta variedad y antagonista de Az39 *in vitro*.

Las semillas fueron sometidas a cuatro tratamientos de inoculación con una concentración de 1×10^8 células/ml; A (inoculado con *Azospirillum brasilense*, cepa Az39), B (co-inoculado con Az39 y la cepa G16 de *Pseudomonas oryzae*), C (inoculado solo con G16) y D (tratamiento control no inoculado), durante 10 días. De los tratamientos inoculados con una sola cepa se recuperaron mayoritariamente las bacterias inoculadas. En cambio, cuando se co-inoculó con Az39 y G16 sólo se recuperó ésta última. En las plantas no inoculadas se aislaron bacterias de los géneros *Sphingomonas*, *Pantoea*, *Microbacterium*, *Methylobacterium* y también bacterias de la especie *P. oryzae*. El estudio fue realizado en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental de la Facultad de Química (Udelar), por Rariz (2012).

A partir del mencionado ensayo, se aislaron una variedad de cepas heterótrofas y/o productoras de sideróforos, endófitas de la variedad INIA Olimar (Rariz, 2012). Las mismas se encontraban viables, congeladas o en cultivos frescos en tubos de agar inclinado. De estas fueron seleccionadas seis cepas por ser representativas del conjunto y por la pureza de los cultivos obtenidos al realizar los reaislamientos, denominadas B1, C10, DR11, KD4, D10 y D5 e identificadas por secuenciación del

gen 16S rDNA por Rariz en 2012 (Tabla 3). Además de las cepas inoculadas, *Azospirillum brasilense* Az39 y *Pseudomonas oryzae* G16, el presente estudio se complementó incluyendo otras cepas potenciales promotoras del crecimiento vegetal de *Azospirillum brasilense* (Sp7, 40M, 42M).

Tabla 3. Identificación de cepas endófitas de la variedad INIA Olimar caracterizadas en este estudio (Rariz, 2012).

Cepa aislada	Cepa más relacionada	N° de acceso de la cepa más cercana	% similitud	Ubicación ^a	Condiciones ^b
B11	<i>Pseudomonas oryzae</i>	JF496264.1	99	R, V	H
ED1	<i>P. oryzae</i>	JF496264.1	99	R, V	H
C10	<i>Pantoea ananatis</i>	HM591488.1	99	R, V	H, S
DR11	<i>Sphingomonas sp. Ang S-26</i>	FR696370.1	100	R, V	H, S
KD4	<i>Methylobacterium sp. 189</i>	FN868943.1	99	R, V	H
D10	<i>Pantoea sp. P12</i>	GQ253926.1	100	R, V	H, S
D5	<i>Microbacterium testaceum</i>	AP012052.1	100	R, V	H

^a Tejido del cual se aislaron las cepas. R: Raíz, V: parte verde

^b Condiciones de cultivo en que se recuperó la cepa; H: Heterótrofo, S: Productor de sideróforos

Para realizar la caracterización fisiológica se analizó en primer lugar el potencial de fijación de N₂, y luego se estudiaron otras propiedades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal como solubilización de fosfatos y producción de sideróforos y de AIA.

3.1.1. Estudio del potencial fijador de N₂

Para determinar si las cepas endófitas obtenidas eran potenciales fijadoras de N₂ se buscó amplificar un fragmento del gen *nifH*. Posteriormente se evaluó esta capacidad mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA).

3.1.1.1. Extracción de ADN y amplificación de *nifH*

En primer lugar se realizó extracción de ADN por lisis alcalina a partir de cultivos en placas de R2A (Difco™) (Anexo I), frescos y puros. El procedimiento fue realizado según Jan *et al.*, 1998, de la siguiente forma: se tomó una colonia, se agregaron 100 µl de NaOH 0,05 M, se incubó a 95°C durante 15 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos, se descartó el pellet y a partir de 1 µl del sobrenadante se realizó la amplificación.

El ADN de las cepas conocidas se extrajo utilizando el kit para cepas Gram positivas y negativas de Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit), según el protocolo proporcionado por el fabricante. El producto se resuspendió en 50 µl de agua milliQ.

Para amplificar el gen *nifH* se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de una mix compuesta por (expresado en concentración final en el volumen de reacción): buffer para Taq polimerasa 1x, MgCl₂ 25 mM, BSA 20 mg/ml, dNTPs 2.5 mM cada uno, primers PolF y PolR (Tabla 4) 10 µM cada uno, Taq DNA polimerasa 5 u/µl y agua milliQ hasta completar 20 µl. Se amplificó 1 µl de producto de sobrenadante de lisis alcalina o de solución de ADN.

La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems, empleando el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 57°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto; y una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos y una etapa final a 4°C durante 15 minutos.

Finalmente, a partir de los productos de amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE 0.5x, al cual se agregó 2 µl de BrEt. En cada carril se cargaron 3 µl de muestra y 1 µl de buffer de corrida. El marcador de peso molecular empleado fue de 50 pb (Fermentas). La corrida del gel se realizó a

100 mV durante 30 minutos. El revelado de los fragmentos amplificados se realizó con un transiluminador UV/vis por la presencia de BrEt intercalado en el ADN.

Tabla 4. Primers usados en PCR

Gen blanco	Nombre	Secuencia 5' →3'	Referencia
<i>nifH</i>	PolF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	Poly <i>et al.</i> , 2001
	PolR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA	Poly <i>et al.</i> , 2001
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Lane <i>et al.</i> , 1991
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Turner <i>et al.</i> , 1999

3.1.1.2. Ensayo de reducción de acetileno (ARA)

Para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno, se realizó el ensayo de reducción de acetileno (A.R.A., Tripathi y Klingmueller, 1992).

Las cepas fueron sembradas en tubos con medio RMR modificado carente de N (Elbeltagy *et al.*, 2001) (Anexo I) en condiciones aerobias, se incubaron a 30°C durante 72 horas. Se agregó un volumen del 10% de la atmósfera del tubo de acetileno (AGA, 99.5% de pureza) y nuevamente se incubó a 30°C durante 72 horas.

Posteriormente fue evaluada la producción de etileno mediante cromatografía gaseosa, utilizando un cromatógrafo SRI 8610 con detector de ionización de llama y columna Porapak R (80/100 mesh, 6 feet x 1/8 inch), empleando N₂ como gas carrier y temperatura de horno 45 °C. Los cromatogramas fueron analizados con el software Peaksimple 2. Como control positivo se utilizó la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense*. Se consideraron positivos los tubos que dieron áreas de etileno 100 veces mayores que los controles con acetileno no inoculados.

3.1.2. Solubilización de fosfato inorgánico

La competencia de los aislamientos para solubilizar fosfatos fue analizada sembrando repiques de las cepas desde medio agar R2A a medio agar Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) (Anexo I) con cicloheximida 0.05 g/l, e incubándolas a 30°C durante 7 días. Se consideró como resultado positivo la aparición de un halo de solubilización alrededor de las colonias.

3.1.3. Producción de sideróforos

Para evaluar la capacidad de producir sideróforos, las cepas fueron sembradas por repiques desde medio R2A agar a medio R2A-CAS agar (modificado de Schwyn *et al.*, 1987) (Anexo I). Se incubaron hasta 7 días a 30°C. Se constató la producción de sideróforos por la presencia de un halo amarillo en torno a las colonias.

3.1.4. Producción de ácido indolacético

Las cepas fueron inoculadas en tubos con 5 ml de medio Try (modificado de Glikmann, 1984) (Anexo I) e incubadas en oscuridad a 30°C durante 12 horas. Se midió la Densidad Óptica (DO) de cada cultivo a 600 nm.

Luego se centrifugó y se conservó el sobrenadante. A partir del mismo se realizó la cuantificación de ácido indolacético, agregando previamente 1 ml de reactivo colorimétrico, composición: FeCl₃ 12g/l y H₂SO₄ 7.9 M (Glikmann y Dessaux, 1994). Se incubó en oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 530 nm.

Se estandarizó la producción de indoles por unidad de biomasa tomando la medida de DO₆₀₀ para cada cepa. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Se realizó una curva con estándar de AIA (Sigma). La cantidad de ácido indolacético producida fue expresada como mg de AIA.ml⁻¹.DO⁻¹.

3.2. Búsqueda de cepas endófitas similares a G16

La búsqueda de cepas similares a G16, identificada como *P. oryzihabitans*, se realizó a partir de semillas de las variedades INIA Tacuarí (T) y El Paso 144 (EP).

3.2.1. Desinfección de semillas

Para la desinfección de las semillas se utilizaron 5 g de las variedades T y EP sin cáscara. Las mismas fueron hidratadas en 80 ml de agua destilada durante 1h. Se agregó HClO 2%, dejando reposar 5 minutos antes de escurrir. Luego se realizaron 4 lavados con 200 ml de agua destilada esterilizada cada uno, con agitación fuerte durante 1 minuto. Se escurrió el agua y el excedente fue retirado colocando las semillas sobre gasa estéril.

Se comprobó la efectividad de la desinfección colocando semillas tratadas en placas de medio R2A que fueron incubadas durante 5 días a 30°C.

3.2.2. Aislamiento de bacterias endófitas y extracción de ADN

Las semillas desinfectadas fueron maceradas en morteros esterilizados. A partir del producto obtenido se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en solución de suero fisiológico (NaCl 0.9%), que fueron sembradas con rastrillo en placas de R2A y R2A-CAS (Anexo I). Se incubaron a 30 °C por 5 días.

Se observó la morfología de las colonias obtenidas y se aislaron nuevamente en placas de R2A aquellas que presentaron morfología similar a G16 (*P. oryzihabitans*).

Una vez obtenidos los cultivos puros se realizó extracción de ADN mediante lisis alcalina siguiendo el mismo procedimiento que se describió anteriormente.

3.2.3. Amplificación del gen 16S rDNA

Se realizó PCR para amplificar el gen 16S rDNA, se preparó una mezcla conteniendo (en sus concentraciones finales en el volúmen de reacción): buffer para Taq polimerasa 1x, MgCl₂ 25 mM, BSA 20 mg/ml, dNTPs 2.5 mM cada uno, primers 27F (Lane *et al.*, 1991) y 1492R (Turner *et al.*, 1999) (Tabla 2) 6.3 µM cada uno, Taq DNA polimerasa 0,5u y agua milliQ hasta completar 25 µl. Se amplificó 1 µl de los productos de extracción de ADN.

La amplificación del gen de interés se realizó en un termociclador (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, Singapur), empleando el siguiente programa de temperaturas: 94°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial), seguido de 20 ciclos que comprenden; 94°C durante 1 minuto (desnaturalización), 55°C durante 1 minuto (hibridación) y 72°C durante 3 minutos (extensión), una etapa de 72°C durante 15 minutos (extensión final) y otra de 4°C durante 15 minutos (enfriamiento).

3.2.4. Secuenciación del gen 16S rDNA e identificación filogenética

El gen 16S rDNA fue secuenciado a partir del producto del amplicón obtenido en el laboratorio por el Servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (Korea), en un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL, utilizando el primer 27F. Las secuencias obtenidas fueron editadas en el software libre Chromas Lite.

La identificación filogenética de las cepas se realizó comparando las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank, usando la herramienta Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

3.3. Determinación de la abundancia de genes *nifH* en tejidos de plántulas de arroz

Mediante la técnica de PCR cuantitativa o en tiempo real (q-PCR) se buscó determinar la abundancia de los genes *nifH* relacionados con la FBN, a partir del material genético extraído semillas de la variedad Olimar y de tejidos vegetales de hojas y raíces de plántulas de arroz, provenientes de los tratamientos A (inoculado con Az39), B (co-inoculado Az39 + G16) y D (sin inocular) del ensayo en cultivo hidropónico y semillas de la variedad INIA Olimar (O). Se contó con dos replicados (muestras de raíz y hoja) de cada tratamiento (A, B o D), pertenecientes a dos bloques (I y II) que se diferenciaron por la ubicación de las plántulas en el ensayo de cultivo controlado en fitotrón.

3.3.1. Extracción de ADN de plántulas de arroz

Las hojas y raíces desinfectadas y congeladas a -70°C, fueron molidas en morteros estériles utilizando nitrógeno líquido.

Las semillas O fueron peladas y desinfectadas como se describió anteriormente, para luego ser molidas.

A partir del material vegetal pulverizado, se realizó la extracción de ADN, utilizando buffer CTAB 2x, cloroformo, isopropanol, etanol 70%, buffer TE, ARNasa 10 mg/ml, NaCl 4 M y etanol absoluto, según el procedimiento de Doyle y Doyle (1987).

Previamente se determinó la masa en gramos de todas las muestras de raíces y hojas para ambos bloques.

También se cuantificó el ADN presente en las muestras utilizando el kit de alta sensibilidad para cuantificación de ADN QubitTM y fluorómetro Qubit 2.0

(Invitrogen). Se emplearon dos soluciones estándar que permitieron un rango de detección de 10 pg/ μ l a 100 ng/ μ l.

3.3.2. Amplificación y cuantificación de genes *nifH*

Para amplificar y cuantificar los genes *nifH* presentes en las muestras, se empleó la técnica de real time PCR o PCR cuantitativa (q-PCR). La reacción se llevó a cabo empleando una mezcla compuesta por: mix Rotor-Gene SYBRGreen PCR Kit (Quiagen) y primers PolF y PolR 5 μ M cada uno. Se amplificó 1 μ l de cada muestra. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se utilizó como estándar un fragmento del gen *nifH* de *Methylogaea oryzae* con 3.38×10^{10} copias/ μ l, del que se emplearon las diluciones 10^{-5} hasta 10^{-10} por triplicado y como control negativo se incluyó la mix sin ADN.

Se utilizó un termociclador Rotor Gene 6000 model 5-Plex (CORBETT Research, Alemania) con detección por SYBR Green, que fue programado de la siguiente forma: un primer paso a 95°C durante 5 minutos y a continuación 40 ciclos de 5 seg a una temperatura de desnaturalización 94°C, 10 segundos a una temperatura de hibridación y extensión de 60°C y 1 segundo a una temperatura de 82°C para la adquisición de la fluorescencia.

Utilizando el software Rotor-Gene 6000 Series 1.7, se realizó para cada corrida una curva estándar con los triplicados de las diluciones 10^{-5} a 10^{-10} , a partir de la cual se determinó la eficiencia de cada reacción. También se registraron las curvas de melting y de cuantificación (Anexo II).

Los valores obtenidos para los duplicados técnicos de las muestras fueron corregidos por el factor de dilución y promediados. Se expresaron como número de copias de *nifH* por μ g de ADN extraído (n° copias *nifH*/ μ g ADN) y como número de copias de *nifH* por gramo de tejido vegetal fresco (n° copias *nifH*/g tejido). Los resultados obtenidos para los bloques I y II (replicados biológicos) se trataron por separado y se graficaron utilizando el software Microsoft Excel 2010.

3.4. Estudio de competencia entre BPCV y cepas endófitas o rizosféricas.

El estudio de competencia se realizó *in vitro*, analizando el crecimiento de distintas BPCV, cepas utilizadas o potencialmente utilizables en formulaciones de inoculantes comerciales, frente a bacterias endófitas o a bacterias rizosféricas del género *Burkholderia*. Se utilizaron placas de medio NFbI (Loaces *et al.*, 2011) (Anexo I), que permite el crecimiento de todas las cepas.

Para la inoculación fueron utilizadas BPCV en fase de crecimiento exponencial que se encontraban en tubos de medio NFbI líquido, con 12 horas de incubación a 30°C y 100 rpm. Las mismas fueron sembradas por siembra incorporada en placas de NFbI agar. Las cepas utilizadas fueron: Az39, CFN y 40M de la especie *Azospirillum brasilense*, y tres cepas de *Herbaspirillum seropedicae*: cepa de referencia de EMB, 16 y AL.

La densidad de las suspensiones de BPCV se ajustó para que la concentración final en el agar fuera de 10^6 células por ml de medio NFbI Agar. Para el ajuste del inóculo se usó la escala de Mc Farland y se diluyó con medio estéril para que todos los inóculos tuvieran la misma concentración al momento de sembrarlos. Sin embargo, para las cepas de *Azospirillum* (Az39, 40M y CFN) fue necesario aumentar la densidad de células incorporadas (10^7 por ml de medio NFbI Agar) para lograr mejor resolución dado que el crecimiento de estas bacterias era más lento en esas condiciones. Se incorporaron en cada placa 200 μ l de suspensión de BPCV y 20 ml de medio NFbI agar.

Luego de la solidificación del agar, se sembraron en la superficie de las placas suspensiones de las cepas posibles inhibidoras realizando una estría recta con tip de aproximadamente 5 cm de longitud sobre la cual se descargaron 10 μ l de la suspensión de bacterias. Dicha suspensión fue ajustada para sembrar 10^5 células por ml de medio NFbI líquido. Todas las cepas se sembraron por duplicado y las

placas fueron incubadas durante 48 hs a 30°C. Se analizó el potencial para antagonizar las BPCV de las cepas: similares a la cepa G16 de *Pseudomonas oryzae* aisladas de grano en este trabajo, y de cepas aisladas previamente (cepas rizosféricas de *Burkholderia* y algunas cepas endófitas aisladas por Rariz en 2012) (Tabla 2).

La ausencia de crecimiento de colonias incorporadas alrededor de la estría, indica que la cepa en estudio es capaz de inhibir a la PCV que se utilizó como base. Se estimó cualitativamente la capacidad antagónica entre las cepas a partir del tamaño del halo de inhibición alrededor de la estría.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron cepas aisladas de arroz (*Oryza sativa*) en nuestro laboratorio obtenidas en tres experimentos diferentes y se realizaron los análisis que se indican en la Tabla 2:

De acuerdo a los experimentos realizados se pueden clasificar estos aislamientos en:

1) bacterias endófitas aisladas de plántulas de arroz (variedad INIA Olimar) crecidas en cultivo hidropónico (Rariz, 2012). Se aislaron bacterias de plántulas en tres tratamientos: semillas sin inocular (Tratamiento D) y semillas inoculadas (Tratamiento C: inoculado con *Pseudomonas oryzae*; Tratamiento B: inoculado con *P.oryzae* y *Azospirillum brasilense* Az39). Se trata entonces de cepas nativas que crecen con las plántulas desarrolladas en condiciones axénicas a partir de semillas desinfectadas (Tratamiento D) o de cepas que co-existen con otras bacterias inoculadas en altas concentraciones en la semilla (Tratamientos B y C) (Rariz, 2012).

2) bacterias rizosféricas de plántulas de la variedad El Paso 144 crecidas en condiciones controladas en suelos diferentes. Estas cepas fueron seleccionadas por su condición de solubilizar fosfato.

3) bacterias del género *Pseudomonas* aisladas en este trabajo a partir de granos de arroz de las variedades INIA Tacuarí y El Paso 144.

4.1. Caracterización de cepas endófitas

Se realizó la caracterización de un grupo de cepas aisladas en el Experimento 1 y de algunas BPCV que se emplean o podrían emplearse en inoculantes comerciales. En la Tabla 5 se muestra que la amplificación del gen *nifH* fue positiva para 4 de las 12 cepas estudiadas, todas las cepas *nifH*⁺ corresponden a cepas de referencia de *Azospirillum brasilense*, lo que se encuentra dentro de lo esperado ya que se trata de cepas diazótrofes.

El ensayo de A.R.A., que fue realizado para todas las cepas, arrojó resultados positivos coincidentes con las cepas *nifH*⁺. La prueba de reducción de acetileno a etileno se utiliza para evaluar la capacidad fijadora de N₂, por lo que es consistente que las cepas capaces de reducir acetileno sean aquellas en las que se detectó la presencia del gen *nifH*, y demuestra que el mismo se puede expresar en las condiciones adecuadas en todos los casos.

El estudio no reveló diferencias importantes en los niveles de reducción de acetileno entre las cepas de referencia (no se muestra en tabla).

Algunos estudios muestran que las bacterias endófitas de los géneros *Pseudomonas* y *Pantoea* pueden ser capaces de fijar N₂ (Burdman et al., 2000; Schoebitz, 2005). En este caso los resultados obtenidos muestran que las cepas de los géneros *Pantoea* (C10 y D10) y *Pseudomonas* (B11 y ED1) que hemos aislado (Tabla 2) no son diazótrofes. Sin embargo, en otro trabajo (Loaces, 2011) se aisló la cepa G6 de *Pseudomonas* que redujo acetileno, aunque con poca eficiencia.

Es importante tener en cuenta que se trata de un método indirecto para detectar fijación de nitrógeno que está muy lejos de simular las condiciones naturales, y que además las cepas pueden variar, aún dentro de la misma especie, en su capacidad de fijar N₂.

En cuanto a la solubilización de fosfato, no se observaron cepas con esta capacidad en las condiciones estudiadas. Hay referencias de otros estudios que

indican que cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Pantoea* poseen esta capacidad. Por ejemplo, una cepa de *Pseudomonas fluorescens* es capaz de solubilizar fosfato in vitro a las 48 hs de inoculación a 30°C y pH 7 (Katiyar y Goel, 2003). Tilak *et al.*, 2005 consideran a *Pseudomonas* dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSP) más eficientes. También se ha observado que cierta cepa de *Pantoea agglomerans*, aislada de rizósfera de soja, solubiliza fosfatos a los 5 días de inoculada a 30°C, tanto en medio ácido como alcalino, aunque los mejores resultados se obtuvieron a pH 7 (Son *et al.*, 2006).

El análisis de la capacidad para producir sideróforos bacterianos reveló que 10 de los aislamientos fueron capaces de producirlos y 3 no crecieron en el medio de cultivo empleado en el ensayo. Dentro de los positivos se incluyen todas las cepas de referencia *nifH*⁺, por lo que se puede concluir que las cepas patrón incluidas en este estudio además de tener la capacidad de fijar N₂, también son productoras de sideróforos bacterianos.

Se observó una diferencia en el tiempo de aparición del halo amarillo alrededor de las colonias; para las cepas de referencia del género *Azospirillum*, la producción de sideróforos se evidencia claramente a los 7 días de cultivo, mientras que G16 (*P. oryzihabitans*) y seis de las cepas endófitas provenientes del cultivo hidropónico mostraron esta capacidad a las 24 hs de cultivo. Esto le brinda a G16 y a las cepas endófitas analizadas una posible ventaja competitiva en etapas tempranas de la colonización radicular.

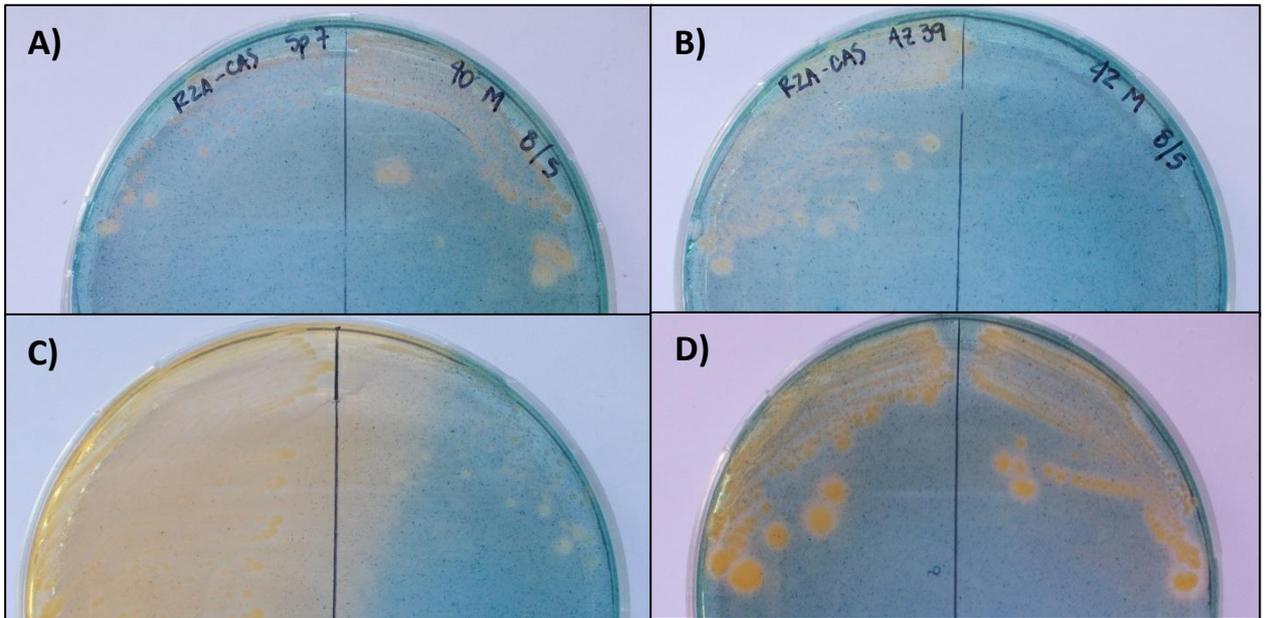


Figura 7. Colonias productoras de sideróforos en medio R2A-CAS.

A) cepas de referencia de *A. brasilense* Sp7 y 40M, B) cepas de referencia de *A. brasilense* Az39 y 42M, C) C10 (*P. ananatis*), D) ED1 y G16 (*P. oryzae*).

Las cepas nativas revelaron capacidad de producir AIA, lo que es otra característica importante para conservar las cepas autóctonas de la semilla que reportan beneficios al crecimiento y desarrollo de las plantas. A la hora de inocular las semillas es importante tener en cuenta los beneficios de la comunidad autóctona y conocer más acerca de las interacciones biológicas de ésta con las cepas que sean inoculadas.

Respecto a los niveles de producción, los resultados muestran que las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (ED1 y G16) son las mejores productoras de AIA, siendo superadas sólo por la cepa endófito DR11 que fue identificada como *Sphingomonas* sp.

Se han aislado cepas de *Azospirillum* capaces de producir ácido indol-3-acético en concentraciones realmente importantes para las plantas, que tienen efectos de inducción del crecimiento de la raíz y aumento de la absorción de agua y nutrientes (Roesch *et al.*, 2007).

Sin embargo, la producción de AIA para las cepas de referencia no fue determinada en este estudio. Según trabajos de Loaces en 2011, ninguna cepa de las ensayadas presentó mayor producción de AIA que *H. seropedicae* (EMBRAPA), mientras que la cepa de referencia Az39 de *A.brasilense* produjo menor cantidad de AIA que las del género *Pseudomonas* (G6) y *Burkholderia* (I20).

Según Okon y Labandera (1994), si bien la FBN por parte de *Azospirillum* no es altamente significativa, la importancia agronómica radica principalmente en la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. La intensidad de los efectos dependerá de la especie vegetal, el cultivar y la concentración del inóculo.

Tabla 5. Propiedades promotoras del crecimiento vegetal determinadas para las cepas

Cepa	Detección gen <i>nifH</i>	Ensayo A.R.A. ^a	Producción de sideróforos	Prod. de A.I.A. ^b
42M	+	+	+ (7 días)	Nd
Sp7	+	+	+ (7 días)	Nd
40M	+	+	+ (7 días)	Nd
Az39	+	+	+ (7 días)	Nd
ED1	-	-	+ (24 hs)	17.0 ± 9.1
B11	-	-	+ (24 hs)	13.9 ± 1.7
G16	-	-	+ (24 hs)	19.3 ± 5.9
DR11	-	-	+ (24 hs)	26.0 ± 1.7
KD4	Nd	-	Nd	9.8 ± 6.9
D10	-	-	+ (24 hs)	15.7 ± 2.4
D5	-	-	Nd	Nd
C10	-	-	+ (24 hs)	9.1 ± 0.6

Nd= No determinado porque no se pudo extraer ADN o porque la cepa no creció en el medio de cultivo del ensayo.

^a A.R.A.: Ensayo de reducción de acetileno

^b La producción de A.I.A. (ácido indol-3-acético) se expresa en µg de AIA/ml con el error estándar.

4.2. Selección de cepas endófitas similares a G16 (*Pseudomonas oryzihabitants*)

Se realizó este experimento porque se había observado previamente que la cepa G16 proveniente de semillas de la variedad Olimar era capaz de inhibir *in vitro* a Az39 (Loaces *et al.* 2011). Con el propósito de determinar si en las semillas de las otras variedades se podrían encontrar cepas con las mismas características se realizó este análisis.

A partir de las semillas desinfectadas de las variedades T y EP se obtuvieron colonias que fueron seleccionadas por sus atributos morfológicos similares a la cepa G16, caracterizando 6 morfologías distintas, de potenciales *Pseudomonas oryzihabitans* (Tabla 6, figura 8).

Tabla 6. Características fenotípicas de las colonias seleccionadas.

Características fenotípicas	
Morfotipo 1	amarillas brillantes, chatas, secas, borde irregular
Morfotipo 2	amarillas brillantes con centro oscuro, chatas, centro seco y borde cremoso, borde entero
Morfotipo 3	amarillas brillantes, elevadas, cremosas, borde entero
Morfotipo 4	amarillas brillantes, elevadas, centro seco y borde cremoso, borde irregular
Morfotipo 5	amarillas claras, elevadas, cremosas, borde entero

Una vez obtenidos los cultivos puros a partir de estas colonias, se realizó extracción de ADN y se amplificó el gen 16S rDNA para posteriormente secuenciarlo y llegar a la identificación las cepas aisladas (Tabla 7). Efectivamente el estudio mostró que todas las colonias seleccionadas por su fenotipo pertenecían al género *Pseudomonas*. Por tanto, las variedades de semillas estudiadas poseen bacterias similares a G16 (*P. oryzihabitans*).

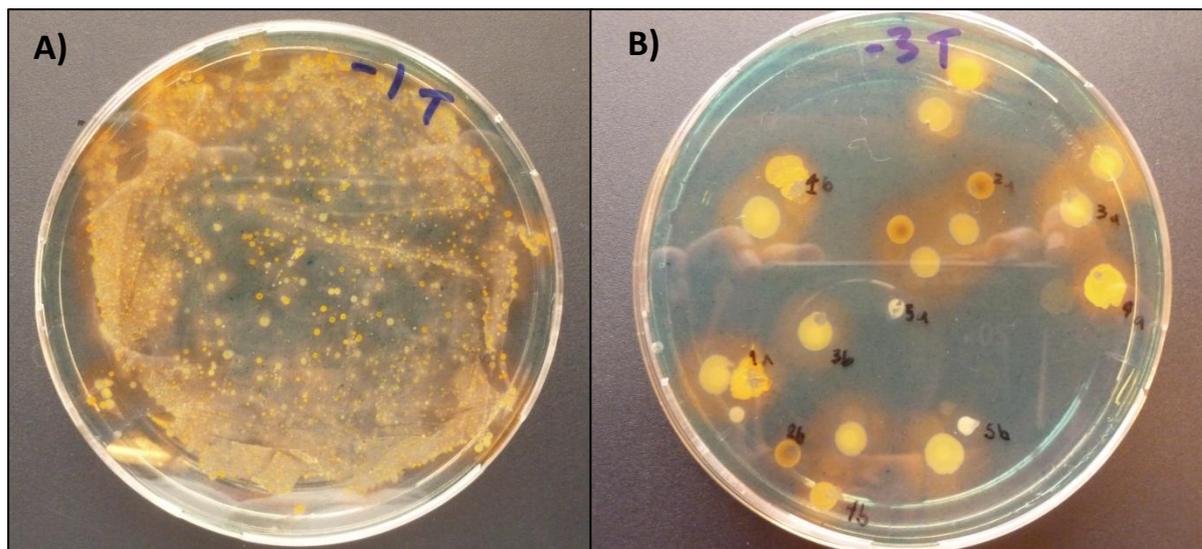


Figura 8. Colonias de bacterias endófitas de semillas de la variedad INIA Tacuarí para detección de producción de sideróforos (R2A-CAS).

A) dilución 10^{-1} , B) dilución 10^{-3} donde se distinguen colonias con diferentes morfologías.

Tabla 7. Origen de las cepas similares a G16 e identificación por secuenciación del gen 16S rDNA.

Cepa	Nº de acceso	Especie más cercana (Nº acceso)	% similitud	Origen ^a
1b	KM225652	<i>P. oryzihabitans</i> MCp3 (KJ009241.1)	100	T
2a	KM225653	<i>P. oryzihabitans</i> MCp3 (KJ009241.1)	100	T
4a	KM225654	<i>P. oryzihabitans</i> MCp3 (KJ009241.1)	100	T
G1c	KM225655	<i>P. oryzihabitans</i> 32.1 (JX286674.1)	100	EP
G4	KM225656	<i>P. psychrotolerans</i> TPs-O4 (KF612320.1)	100	EP
G7c	KM225657	<i>P. psychrotolerans</i> TPs-O4 (KF612320.1)	100	EP

^aT= semilla de arroz variedad INIA Tacuarí; EP= semilla de arroz variedad INIA El Paso 144.

4.3. Abundancia de genes *nifH* en tejidos de arroz

Este análisis se realizó sobre las plántulas del cultivo hidropónico (Experimento 1) con el fin de determinar los potenciales diazótrofos que están en la semilla y acompañan el crecimiento de la plántula (Tratamiento D) o como evidencia indirecta de la presencia de *A. brasilense*.

La cuantificación del ADN producto de la extracción, muestra que el procedimiento empleado no fue apropiado para las semillas, y además sugiere que la eficiencia del mismo fue distinta según el tejido vegetal del que se partiera, dado que las muestras de hoja contenían una cantidad de ADN que fue un orden superior al de las raíces. También es posible que, efectivamente las hojas tuviesen más ADN que las raíces, por lo que a la hora de determinar la abundancia de genes *nifH*, es importante considerar que se está partiendo de muestras con diferente concentración de ADN al momento de amplificar en la q-PCR.

Por esta razón, los resultados obtenidos en la q-PCR se expresaron como número de copias de *nifH* por gramo de tejido vegetal (nº copias *nifH*/g tejido) y como número de copias de *nifH* por ng de ADN extraído (nº copias *nifH*/ng ADN) para expresar la abundancia de modo de eliminar los errores que pueden introducirse de la extracción de ADN (Ferrando, 2013).

Se realizaron varias corridas de q-PCR, seleccionándose las que presentaron eficiencias de 0.94 y 0.96.

Los datos obtenidos a partir de los bloques I y II, aunque se trata de replicados biológicos, fueron graficados por separado, buscando una mejor visualización de los resultados ya que los valores fueron muy distintos entre bloques. Estas diferencias pueden deberse a diferentes eficiencias de extracción de ADN o a que se contaba con muy poco material vegetal de partida, ya que las plántulas eran muy pequeñas.

Analizando los gráficos correspondientes a las figuras 9 y 10 se puede ver que de las muestras correspondientes a raíces de plántulas de arroz, las inoculadas con Az39 (tratamiento A) son las que contienen mayor número de copias del gen *nifH* por gramo de tejido vegetal, seguido por las raíces del tratamiento de inoculación dual con Az39+G16 (B) y siendo las raíces no inoculadas (tratamiento D) las que presentan menor número de copias del gen de interés.

Para el caso del bloque II, es necesario señalar que la abundancia de copias del gen *nifH* no pudo ser detectada en la muestra de raíz del tratamiento D (RDII), debido a que se no se obtuvo cantidad suficiente de ADN para realizar la q-PCR. Esto puede deberse a que la muestra realmente contenía muy poco ADN o a un error durante la etapa de extracción. Otro resultado que cabe destacar en este bloque es que la muestra de raíz del tratamiento A presenta una abundancia de copias de *nifH* ampliamente mayor a la muestra del mismo tratamiento en el bloque I.

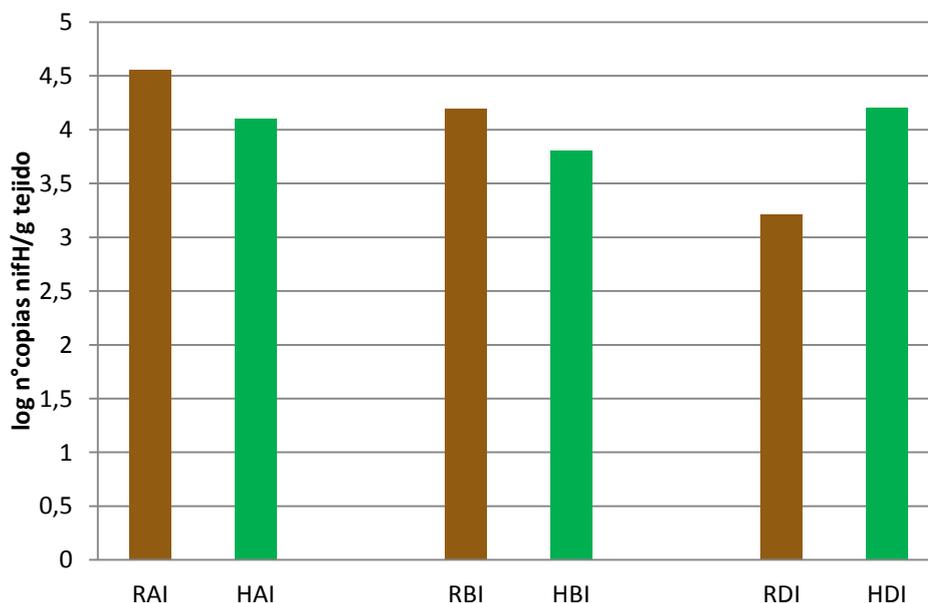


Figura 9. Abundancia de copias del gen *nifH* por gramo de tejido vegetal, correspondientes al bloque I. Se muestra la media entre dos corridas de eficiencias 0.94 y 0.96. R= tejido de raíz. H= tejido de hoja. Las letras A, B y D indican a que tratamiento corresponden las muestras. A= inoculado con Az39 (*A. brasilense*), B= co-inoculado con Az39 y G16 (*P. oryzae*), D= no inoculado.

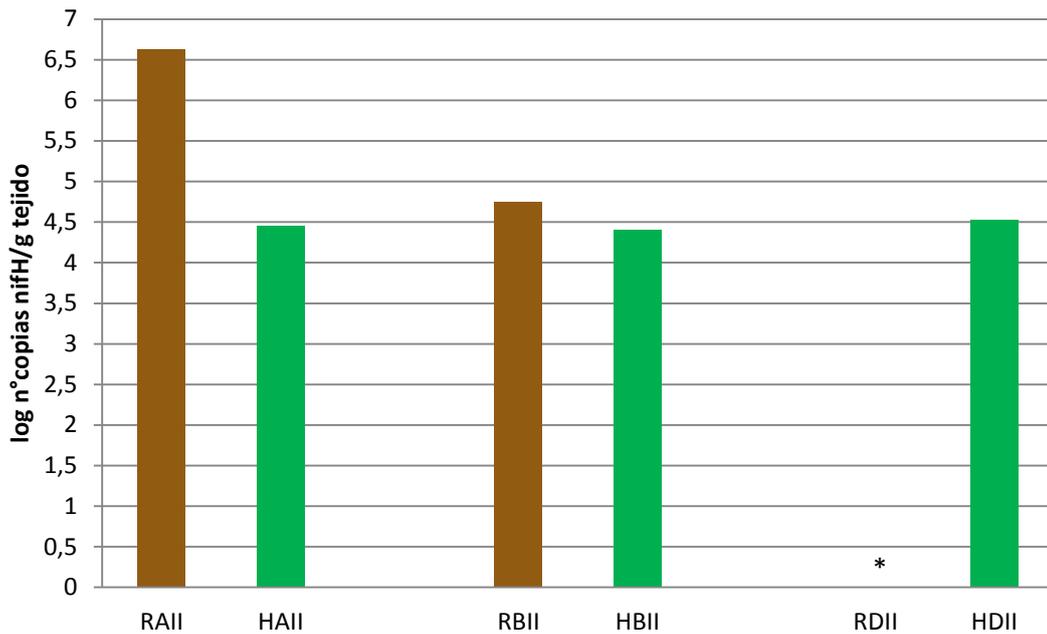


Figura 10. Abundancia de copias del gen *nifH* por gramo de tejido vegetal, correspondientes al bloque II.

R= tejido de raíz. H= tejido de hoja.

Se muestra la media entre dos corridas de eficiencias 0.94 y 0.96.

Las letras A, B y D indican a que tratamiento corresponden las muestras. A= inoculado con Az39 (*A. brasilense*), B= co-inoculado con Az39 y G16 (*P. oryzihabitans*), D= no inoculado.

(*) No se realizó la determinación para la muestra RDII.

Las muestras de hojas no presentaron diferencias importantes en el número de copias de *nifH* por gramo de tejido. Para el tejido de hoja, los resultados son similares en ambos bloques.

Es interesante el hecho de que en las muestras de la parte verde no exista diferencia en la abundancia en el tratamiento no inoculado y los tratamientos con inoculación, una explicación posible es que a los 15 días de germinación las bacterias inoculadas aún no han sido capaces de establecerse en estos órganos y lo detectado corresponda a diazótrofes propias de la semilla, además algunos reportes indican que, si bien los endófitos diazótrofes han sido detectados en todos los tejidos vegetales, su diversidad y abundancia, y por tanto la presencia del gen *nifH*, va cambiando según el estadio de desarrollo de la planta, el tipo de tejido vegetal o el contenido de N del suelo (Prakamhang *et al.*, 2009). También podría pensarse que la inoculación temprana inhibe en cierta medida el desarrollo

de las comunidades autóctonas de hoja por competencia, o tal vez la planta haya desarrollado algún tipo de respuesta defensiva.

Otro punto a considerar es que tratándose de un experimento hidropónico, se deja fuera la influencia de algunos factores propios del suelo natural, como la disponibilidad de nutrientes, o las interacciones con la comunidad biológica del suelo.

Tabla 8. Número de copias del gen *nifH* por μg de ADN extraído y logaritmo, para las muestras de los bloques I y II.

Muestra	n° copias <i>nifH</i> / μg de ADN	Log n° copias <i>nifH</i> / μg de ADN
RAI	7,04E+02	2,85
HAI	1,70E+01	1,23
RBI	2,90E+01	1,46
HBI	4,14E+00	0,62
RDI	6,68E+00	0,82
HDI	8,00E+00	0,90
RAII	1,17E+04	3,07
HAI	7,00E+00	0,86
RBII	7,63E+01	1,88
HBII	4,00E+00	0,60
RDII	nd	nd
HDII	3,00E+00	0,48

R= tejido de raíz. H= tejido de hoja.

Las letras A, B y D indican a que tratamiento corresponden las muestras.

Como se muestra en la Tabla 8, el número de copias de genes *nifH* por μg de ADN extraído sugiere, al igual que la anterior, que los tejidos de raíz contienen mayor abundancia que las hojas, a excepción del tratamiento D. Este resultado está en consonancia con estudios de Muthukmarasamy *et al.*, 2005, en los que se señala que, generalmente, las poblaciones bacterianas son mayores en las raíces que en los tallos y hojas.

Si bien la tendencia mostrada en la medida expresada por gramo de tejido vegetal se mantiene, la abundancia de *nifH* por μg de ADN extraído de la muestra de raíz inoculada con Az39, es al menos un orden mayor que la observada para los otros tratamientos. Los tejidos de la parte aérea mostraron un comportamiento más estable frente a los tratamientos, la tendencia no es la misma que al expresar el número de copias del gen por gramo de tejido, ya que las hojas del tratamiento A presentan mayor abundancia de diazótrofos que las del tratamiento control.

4.4. Competencia entre BPCV y cepas endófitas o rizosféricas

El estudio de la capacidad antagonista de cepas endófitas similares a G16 o cepas rizosféricas del género *Burkholderia* frente a una variedad de BPCV fue realizado *in vitro*, evaluando el crecimiento en placas de NFbI agar. Se consideró que la cepa endófitas o rizosférica, según el caso, es capaz de inhibir, *in vitro*, el crecimiento de la BPCV cuando se observó ausencia de crecimiento de esta última alrededor de la estría correspondiente a la cepa posible inhibidora.

La Tabla 9 muestra que las cepas rizosféricas T y B, pertenecientes al género *Burkholderia*, son fuertemente antagonistas de las cepas con propiedades PCV ensayadas. Es importante señalar que las cepas T3A, T3C, T7C y B3 inhibieron el crecimiento de la gran mayoría de las BPCV ensayadas. En cambio, la cepa B5 no presentó antagonismo frente a las PCV ensayadas.

Por otra parte, las cepas identificadas como *P. oryzihabitans*; EC4, C9, ED1 y G16, presentaron antagonismo principalmente frente a las cepas de *Azospirillum brasilense* Az39 y L, pero no inhibieron a las cepas 40M ni CFN.

Cabe destacar que las cepas aisladas similares a G16 (1b, 2a, 4a, G1c, G7c y G4) presentaron un comportamiento concordante (a excepción de la cepa 1b), inhibiendo en el ensayo *in vitro* el crecimiento de la cepa L de *Azospirillum*

brasilense, e incluso 2 de ellas, G7C y G4, también fueron capaces de inhibir a la cepa 40M.

En general, las cepas de *Pseudomonas sp.* no fueron antagonistas de *H. seropedicae*. Sin embargo, EC4, C9 y ED1 inhibieron el crecimiento de la cepa de *H. seropedicae* de referencia.

Las cepas del género *Pantoea* (C10 y D10) ensayadas fueron antagonistas de la cepa de *A. brasilense* AL, pero no se comportaron como inhibitorias frente a ninguna de las cepas de *H. seropedicae*.

Estos resultados pueden complementarse con trabajos en los que se evidencia que *A. brasilense* es también inhibido por otras bacterias endófitas de arroz pertenecientes a los géneros *Corynebacterium* y *Bacillus* (Bacilio *et al.*, 2001).

El presente estudio muestra resultados consistentes con ensayos similares realizados por Loaces en 2011, en los que, de 15 aislamientos evaluados, dos resultaron ser antagonistas de Az39 (G16 y la cepa G7; *Cronobacter sakazakii*) y tres de la cepa Z94 de *H. seropedicae* (*Burkholderia cepacia* i20, *Pseudomonas* G16, *P. ananatis* m8), siendo G16 la cepa con mayor actividad inhibitoria.

Teniendo en cuenta que en los ensayos *in vitro* se dejan afuera variables propias del ambiente, es importante considerar que *in vivo*, en el suelo, intervienen una multiplicidad de factores por lo que estos resultados pueden variar.

En condiciones naturales el antagonismo puede deberse a competencia por nutrientes o modificaciones del ambiente, como por ejemplo acidificación, o producción de antibióticos (Frioni, 1999). En este trabajo, las cepas de los géneros *Pantoea* y *Pseudomonas* que resultaron con capacidad de inhibir el crecimiento de las BPCV, mostraron también ser buenas productoras de sideróforos, lo que podría brindarles una ventaja competitiva en ambientes donde el hierro sea escaso. Otros trabajos han mostrado que las cepas del género *Burkholderia* son también buenas

productoras de sideróforos (Rariz et al., 2013). Si excepcionalmente, el ambiente es rico en nutrientes, la competencia puede darse por otros recursos como el espacio.

Tabla 9. Inhibición del crecimiento de BPCV por cepas endófitas.

Cepa posible antagonista ^a	Cepa con propiedades PCV ^b						
	<i>Azospirillum brasilense</i>				<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
	Az39	AL	CFN	40M	EMB	16	HL
T3A	+	+	+	+	+	+	+
T3C	+	+	+	+	+	+	+
T7B	+	Nd	Nd	+	+	+	Nd
T7C	+	+	+	+	+	+	+
B3	+	+	+	+	+	+	+
B5	-	-	-	-	Nd	Nd	-
T3G	+	+	+	+	-	+	+
B11	-	+	-	+	+	-	-
DRII	Nd	+	-	-	Nd	Nd	Nd
C10	-	+	+	-	-	Nd	-
D5	Nd	-	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
D10	-	+	-	-	-	Nd	-
EC4	+	+	-	-	+	-	-
C9	+	+	-	-	+	-	-
ED1	+	Nd	-	-	+	-	Nd
G16	+	+	-	-	-	-	-
1b	Nd	-	-	-	Nd	-	Nd
2a	Nd	+	-	-	Nd	-	-
4a	Nd	+	-	-	Nd	-	-
G1C	Nd	+	-	-	Nd	-	-
G7C	Nd	+	-	+	Nd	Nd	-
G4	Nd	+	-	+	Nd	-	-

^aCepas endófitas estudiadas, a excepción de las cepas T y B las cuales son rizosféricas.

^bEl signo + indica inhibición del crecimiento de la BPCV por las cepa endófito o rizosférica según el caso. El signo - indica que no hay antagonismo entre las cepas. Nd indica no determinado.

5. CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado se pueden extraer algunas ideas que contribuyen a ampliar el conocimiento generando en los últimos años acerca de las bacterias endófitas autóctonas las variedades de arroz cultivadas en nuestro país.

En primer lugar y respecto a las propiedades promotoras del crecimiento vegetal, se pudo observar que la capacidad para producir sideróforos está muy extendida, presentándose en casi la totalidad de los aislamientos caracterizados, así como también la síntesis de ácido indol-3-acético. En contraste, las cepas de *A. brasilense* fueron las únicas capaces de reducir acetileno, a pesar de que hay referencias que indican que cepas del género *Pseudomonas* también poseen esta capacidad.

Se encontraron cepas endófitas similares a G16 en las semillas de las variedades INIA-Tacuarí y El Paso 144. Las cepas aisladas mostraron tener *in vitro* un diverso espectro de inhibición del crecimiento frente a las BPCV ensayadas, pero en general inhiben a algunas cepas de *A. brasilense* pero no a las cepas de *H. seropedicae* ensayadas.

Las antagonistas de la mayoría de las cepas promotoras del crecimiento vegetal resultaron ser las bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato del género *Burkholderia*, excepto por la cepa B5. Esta última cepa, podría tener un potencial biotecnológico interesante debido a que además de presentar propiedades PCV, como la solubilización de fosfato, es rizosférica y no inhibe el crecimiento de la mayoría de las BPCV ensayadas.

En cuanto a la abundancia del gen *nifH* en los tejidos de las plántulas sometidas a los tratamientos de inoculación antes mencionados, tanto al expresar los resultados en nº de copias de *nifH*/g de tejido o en nº de copias/ µg de ADN, los tejidos de raíz resultaron tener, en general, mayor cantidad de genes *nifH* que los tejidos de la parte verde en cada tratamiento. La variación del nivel de detección

del gen fue mayor en las raíces, mientras que en las hojas se mantuvo más estable, lo que sugiere que las comunidades diazótroficas de hoja son más constantes numéricamente y se ven menos afectadas por la inoculación, al menos en etapas tempranas del desarrollo de la planta.

El mayor nivel de detección en los tejidos del tratamiento inoculado con Az39 sobre el co-inoculado (Az39+G16) tanto en raíz como parte aérea, confirma *in planta*, la capacidad antagonista de G16 sobre Az39. De todas formas se puede decir que la inhibición no es total, ya que la abundancia de diazótroficos sigue siendo mayor que en el tratamiento sin inocular, tanto al determinar la abundancia de copias de *nifH* por gramo de tejido vegetal como por μg de ADN extraído.

La presencia de genes *nifH* en las plántulas no inoculadas permite afirmar que existen endófitos potencialmente diazótroficos que son nativos en las semillas de arroz.

Para complementar este trabajo sería necesario realizar ensayos en suelo, ya que en los ensayos *in vitro* se dejan fuera múltiples variables.

El suelo constituye un ambiente altamente heterogéneo y complejo donde conviven variadas poblaciones que interactúan entre sí y con el ambiente. En este contexto, las interacciones biológicas pueden diferir considerablemente del comportamiento mostrado en las condiciones del laboratorio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACA (2013) Guía de Buenas Prácticas en el Cultivo de Arroz en Uruguay. Disponible en: http://www.aca.com.uy/images/stories/GUIA_DE_BUENAS_PRACTICAS_marzo_2013.pdf (con acceso 30/03/2014).
- Aguado-Santacruz G., Moreno-Gómez B., Jiménez-Francisco B., García-Moya E., Preciado-Ortiz R. (2012) Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Fitotecnia Mexicana*. 35 1: 9 – 21.
- Aguerre T. (2008) Uruguay: país arrocero. Disponible en internet desde: <http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%20la%20Oficina/CoyunturaAgropecuaria/coy-diciembre2008.pdf> (con acceso 30/03/2014)
- Alarcón A., Ferrera Cerrato R. (2000) Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México* [en línea]. [Fecha de consulta: 22 de mayo de 2014] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60826207>> ISSN 0568-2517
- Arumi JL, Núñez J, Salgado L, Claret M. (2006) Evaluación del riesgo de contaminación con nitrato de pozos de suministro de agua potable rural en Chile. *Revista Panamericana Salud Pública* 20(6):385–92.
- Atlas R. M., Bartha R. (2002) *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. PEARSONS Educación S.A., Madrid.
- Bacilio-Jiménez M., Aguilar-Flores S., del Valle M., Pérez A., Zepeda A., Zenteno E. (2001) Endophytic Bacteria in rice seed inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 167-172.
- Baldani V., Baldani J I., Dobereiner J. (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* *Biology and fertility of Soils*, 30: 485-491.
- Baldani J I., Caruso L., Baldani V., Goi S R., Dobereiner J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 911-922.
- Baldani J I., Baldani V., Seldin L., Dobereiner J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36: 86-93.
- Bashan Y., Holguin G. (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Journal of Microbiology*. 43: 103-121.

- Bell C., Dickie G., Harvey W., Chan J. (1995) Endophytic bacteria in grapevine. *Journal of Microbiology* 41: 46-53.
- Bennett, R.A., Lynch, J.M., (1981) Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. *Journal of General Microbiology* 125, 95-102.
- Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R., Ulrich A., Hallmann J. (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 215-229.
- Bowen, G.D. (1979) Integrated and experimental approaches to the study of growth of organisms around roots. In: Schippers, B., Gams, W. (Eds.). *Soil-borne Plant Pathogens*, Academic Press, London, 207-227.
- Burdman S., Jurkevitch E., Okon Y. (2000) Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. En *Microbial interactions in agriculture and forestry* Subba Rao N., Dommengues, Y. (eds); Science Publishers Inc. (editorial); vol II; 29-250 pp.
- Cassan F., Sgroy V., Perrig D., Masciarelli O., Luna V. (2008) Producción de fitohormonas por *Azospirillum sp.* Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. En: *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Argentina: AAM.
- Castillo G., Altuna B., Michelena G., Sánchez-Bravo J., Acosta M. (2005) Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27: 137-142.
- Compant S., Clément C., Sessitsch A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 669-678.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Amber T., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre J., Kapulnik Y., Shimon B., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Austral Journal of Plant Physiology* 28: 1-9.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) *Phytochemical Bulletin*, vol 19 (1): 11-15.
- Eckert B., Weber O., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A. (2001) *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 17-26.
- Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a

Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5285-5293

FAO (Food and Agriculture Organization) (2004) El arroz y la nutrición humana. Disponible en internet desde: <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf> (con acceso 27/03/2014).

Ferrando L. (2013). *Factores que afectan la composición y diversidad de la comunidad de bacterias endófitas en arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de doctorado en Química). Facultad de Química, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Figueiredo M., Burity H., Stamford N., Santos C. (2008) Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros. 568 p.

Frioni, L. (1999) Procesos Microbianos, (Ed. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto). Argentina, Tomo I: pp. 92. Tomo II: 35-183.

Frioni, L. (2006). Ciclo biológico del nitrógeno. En *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. Departamento de publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Ed.); pp. 169-190.

Fulchieri, J. (1992) *Producción de giberelinas por Azospirillum spp. y efecto de la inoculación sobre el contenido de giberelinas en la raíz y la promoción del crecimiento en maíz (Zea mays, L)*. (Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.

García de Salomone IE, Di Salvo LP, Escobar Ortega JS, Boa Sorte MP, Urquiaga S, Dos Santos Teixeira KR (2010) Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil* 336:351-362.

Glickmann E., Dessaux Y. (1994) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 793-796.

Grifoni A., Bazzicalupo M., Di Serio C., Farcelli S., Fani R. (1995) Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and the histidine operon. *FEMS Microbiology Letters*. 127: 85-91.

Halbleib C., Ludden P. (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Journal of Nutrition*. 130: 1081-1084.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W., Kleopfer J. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 895-914.

Hardoim P., Van Overbeek L., an Elsas J. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 16 10: 463-471.

- Hardoim, P. R., Hardoim, C. C. P., van Overbeek, L. S., van Elsas, J. D. (2012) Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLoS One*. 7: e30438.
- Hernández-Rodríguez A., Heydrich-Pérez. (2006) Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24: 42-49.
- Hernández-Rodríguez A., Rives N., Acebo Y., Díaz A., Heydrich M., Diva V. (2014) Potentialities of associated diazotrophic bacteria in plant growth promotion and biocontrol of *Pyricularia oryzae* (Sacc.) in rice (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*. 29 (1). [online]. 2014, vol.29, n.1 [citado 2015-07-16], pp. 1-10
- Itzigsohn R., Burdman S., Okon J., Zaady E., Yonatan R., Perevolotsky A. (2000) Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 13: 151-158.
- Katiyar V., Goel R. (2003) Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological Research*. 158: 163-168.
- Kennedy, I. R. e Islam, N. (2001) The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41: 447-457.
- Khan A., Jilani G., Akhtar M., Naqvi S., Raheed M. (2009) Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 1(1):48-58.
- Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (Eds.). John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 115-175
- Lara C., Oviedo L., Alemán A. (2011) Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9 1: 17 – 23.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. (2010) *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2832–2837.
- Levanov, H. y Y. Bashan (1991). Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil* 137: 91-97.
- Loaces I., Ferrando L., Fernández Scavino A. (2011) Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microbial Ecology* 61: 606-618.

- Madigan M., Martinko J., Parker J. (2004) Diversidad metabólica. Capella I. *Brock. Biología de los microorganismos*. (598-601) Madrid: Pearson Educación S.A.
- Mano H., Morisaki H. (2008) Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes and Environments*, 23: 109-117.
- Martínez A. (2012) Aislamiento y caracterización de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de rizófera de arroz. *Informe para beca de iniciación de ANII*.
- Masterson R., Russell P., Atherly A. (1982) Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 152: 928:931.
- Mayz-Figueroa J. (2004) Fijación Biológica de Nitrógeno. *UDO Agrícola*, 4 1: 1-20.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) (2012) Recopilación de las Estadísticas Básicas del Sector Arrocerero. Período 1998-2012. Disponible en internet desde:
<http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,115,O,S,0,5527%3BS%3B3%3B120>, (con acceso 30/03/2014).
- Muthukumarasamy R., Cleenwerck I., Revathi G., Vadivelu M., Janssens D., Hoste B., Uigum K., Park K.-D., Young Son C., Sa T., Caballero-Mellado J. (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Systematic and Applied. Microbiology*. 28: 277–286
- Nautiyal S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- Oliveira A., Urquiaga S., Dobereiner J., Baldani J. (2002) The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*. 242: 205-215.
- Okon Y., Kaplunik Y. (1986) Development and function of *Azospirillum*- inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3-16.
- Okon Y., Lavandera-González C. (1994) Agronomic applications of *Azospirillum* of 20 years worldwide field inoculation, *Soil Biology & Biochemistry*. 26(12): 1591-1601.
- Patiño C. (2010) *Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. Colombia.
- Peña J., Grageda O., Vera J. (2001) Nitrogen Fertilizer Management in Mexico: Use of Isotopic Techniques (15N). *Terra* 20: 51-56.
- Pérez-Montaña F., Alías-Villegas C., Bellogín R., del Cerro P., Espuny M., Jiménez-Guerrero I., López-Baena F., Ollero F., Cubo T. (2014) Plant growth promotion in cereal and

- leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169: 325–336.
- Pikosvkaya R.I. (1948) Mobilization of phosphates in soil in relation with vial activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N., Teaumroong N. (2009) The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology* 42: 141–149.
- Prakamhang J., Boonkerd N., Teaumroong. (2010) Rice Endophytic Diazotrophic Bacteria. *Diversity Diazotrophic Bacteria*.318:329.
- Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H. (1993) *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant- Microbe Interactions Journal*. 6:609-615.
- Punschke K., Mayans M. (2011) Selección de cepas de *Herbaspirillum spp.* promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15 1: 19-26.
- Rariz G. (2012) Competencia entre *Azospirillum brasilense* y bacterias endófitas nativas de semilla de arroz (*Oryza sativa*). (Tesis de licenciatura en Bioquímica). Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Rariz G., Martínez A., Ferrando L., Menes J., Fernández Scavino A. (2013) Caracterización e interacciones entre bacterias con propiedades promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo de arroz. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 33 (2): 13-24.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in Plant Biology*, 14: 435-443.
- Rodríguez Cáceres, E. (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991
- Roesch L., De Quadros P., Camargo F., Triplett E. (2007) Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum spp.* for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 10: 1377-1383.
- Schmid M., Baldani J., Hartmann A. (2006) The Genus *Herbaspirillum*. *Prokaryotes*, 141-150.
- Schoebitz M. (2005) *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la rizósfera de Lolium perenne L. (modelo género*

Azospirillum spp.). (Tesis Lic. Agrono). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Schwyn B., Neilands J. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.

Senthilkumar M., Anandham R., Madhaiyan M., Venkateswaram V., Tongmin S. (2011) Endophytic Bacteria: Applications in Agricultural Crop Production. En: Maheshwari D., *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Berlín: Springer-Verlag.

Silva Ferreira J., Baldani J., Divan Baldani J. (2010) Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bacterias diazotróficas em duas variedades de arroz. *EMBRAPA. Acta Scientiarum. Agronomy*, 32: 179-185.

Son H., Park G., Cha M., Heo M. (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel -salt and pH- tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97: 204-210.

Stoltzfus J., So R., Malarvithi P., Ladha J., de Rrujin F. (1997) Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil* 194: 25-36.

Tarrand J., Krieg N., Dobereiner J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 24:967–980.

Tarrand J., Krieg N., Dobereiner J. (1979) Validation of the publication of new names and new combinations previously published outside the IJSB. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29:967–980.

Tilak N., Ranganayki K., Pal R., De A., Saxena N., Shekar M., Shipi A., Tripathi A., Johiri B. (2005) Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89: 136-142.

Tien T., Gaskins M., Hubbell D. (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Applied and Environmental Microbiology* 37:1016–1024

Tortora M., Díaz-Ricci J., Pedraza R. (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*. 193:275-286.

Tripathi A., Klingmueller W. (1992) Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum spp.* *Canadian Journal of Microbiology* 38: 1238-1241.

- Turner S., Pryer K.M., Miao V.P.W., Palmer J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327–338.
- Ureta A., Nordlund S. (2002) Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *Journal of Bacteriology*, 184(20): 5805-5809.
- Van der Lelie D., Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Wu X., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L. (2009) Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. *Critical Reviews in Plant Science*, 28: 346-358.
- Vande Broeck A., Lambrecht M., Kristel E., Vanderleyden J. (1999) Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*. 181: 1338-1342.
- Welbaum G., Sturz A., Dong Z., Nowak J. 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Science*. 23:175-193.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P. (2013) *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:2618–2624.

7. ANEXOS

7.1. Anexo I: Composición de los medios de cultivo empleados

Medio R2A para bacterias heterótrofas (Difco™)

Composición	Para 1 Litro
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Piruvato de Sodio	0,3 g
MgSO ₄	0,05 g
Almidón soluble	0,5 g
Glucosa	0,5 g
YE (Difco)	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Peptona proteosa N°3	0,5 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	15 g

pH 7,2 ± 0,2

Medio R2A-CAS para bacterias productoras de sideróforos (modificado de Schwyn *et al.*, 1987)

Composición	Para 450 ml
Pipes	7,5 g
Agua Destilada*	450 ml
Casaminoácidos	1,25 g
R2A Deshidratado	9,1 g

*Ajustar pH a 6,8 de la solución Pipes + Agua Destilada.

Colorante	Para 45 ml
CAS (Chrome Azurol S)	0,0302 g
Agua Destilada	20 ml
FeCl ₃ *	5,0 ml
CTAB	0,0365 g
Agua Destilada	20 ml

*FeCl₃ 1mM en HCl 10 mM (27 mg de FeCl₃ en 100 ml de HCl 10 mM)

Suplemento

Solución vitaminas BCyT 10x5ml/45ml de solución colorante.
(Previo a su uso, mantener las vitaminas en ausencia de luz para que no se degraden).

Procedimiento:

- 1) Para la preparación del medio base, primero disolver el buffer Pipes en agua calentando sobre la plancha y con ayuda de una espátula. Es recomendable no verter el volumen total del agua a la preparación del medio ya que hay que tener en cuenta el volumen de NaOH utilizado para ajustar el pH a 6,8. Una vez ajustado el pH, la solución se vuelve límpida. Llevar a volumen con agua destilada.
- 2) Fundir el medio base y se repartir en 5 frascos por 90 ml cada uno.
- 3) Para preparar la solución colorante es recomendable hacerlo por separado: Por un lado, mezclar el CAS con agua destilada y una vez que está disuelto se le agrega la solución de FeCl₃. Por otra parte, se mezcla el CTAB con agua destilada proporcionándole calor y agitación magnética con la plancha, (tener cuidado de agitar a baja velocidad para que no forme espuma). Juntar ambas preparaciones.
- 4) Autoclavar por separado el medio base y la solución colorante. Luego de templar las soluciones agregar 5 ml de vitaminas BCyT 10x filtrada al colorante y 10 ml del mismo a cada frasco de medio base (agregarle vitaminas al medio templado solo si se va a usar, ya que después no se

puede re-fundir para evitar la degradación de las vitaminas). Repartir en placas por 20 ml.

El producto final debe ser un medio sólido, de color azul oscuro; si quedara verde puede deberse a un mal ajuste del pH.

Medio agar Pikovskaya para detección de solubilizadores de fosfato (Pikovskaya, 1948)

Composición	Para 1 litro
Extracto de levadura	0,5 g
Dextrosa	10,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0,0001 g
FeSO ₄	0,0001 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

Medio RMR modificado para diazótrofos (Elbeltagy *et al.*, 2001)

Solución A	Para 900 ml	Concentración final
K ₂ HPO ₄	0,80 g	0,8 g/l
KH ₂ PO ₄	0,20 g	0,2 g/l
NaCl	0,10 g	0,1 g/l
Na ₂ FeEDTA (sol)*	16,50 ml	28 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O (sol)**	9,00 ml	25 mg/l
Extracto de levadura	0,10 g	0,1 g/l
Manitol	3,00 g	3,0 g/l
Sacarosa	5,00 g	5,0 g/l
Lactato de K 3M (sol)***	0,90 ml	3,0 mM
Ácido málico	1,72 g	1,72 g/l
Agua destilada	900 ml	---
Agar	2,50 g	2,5 g/l

Ajustar pH a 7,0 con NaOH antes de agregar el agar.

*solución stock: 149 mg/100ml Na₂EDTA + 108 mg/100ml FeCl₃.6H₂O.

**solución 100x.

***solución stock 3M = 0,5 ml de solución 60% Lactato de Sodio.

Solución B	Para 100 ml	Concentración final
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,216 g	2,16 g/l
CaCl.2H ₂ O	0,060 g	0,6 g/l
Agua destilada	100 ml	---

Suplemento:

Solución vitaminas BCyT 1000x *: 2 ml/100 ml de solución B.

(Mantener las vitaminas a oscuras. Esterilización por filtración por membrana). *Solución 1000x: Biotina 2 mg y ácido para-aminobenzoico en 1 litro de agua destilada. Se filtra por membrana y se conserva en oscuridad.

Procedimiento: (ejemplo en viales de 25 ml)

- 1) Preparar la solución A, ajustar a pH 7 y repartir 16 ml en cada vial.
- 2) Tapar con algodón y esterilizar en autoclave, luego se recomienda comprobar pH con tira de papel.
- 3) Preparar la solución B y esterilizar en autoclave.
- 4) Luego de termostatizada la solución B, agregar la cantidad de vitaminas filtradas correspondientes y luego de esta solución B con vitaminas agregar 1,8 ml a cada vial con solución A (volumen final de RMR modificado en cada vial= 17,8 ml).
- 5) Sembrar el medio, incubar 7 días a 30°C.
- 6) Quitar el tapón de algodón asepticamente, tapar con septos (estériles) y precintar.

7) Agregar 10% de acetileno del volumen vacío del vial (1 ml de acetileno) e incubar 24-48 horas.

8) Medir etileno mediante cromatografía gaseosa.

Medio NFbl para ensayo de competencia (Loaces *et al.*, 2011)

Composición	Para 1 Litro
Ac. málico	2,5 g
Glucosa	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Micronutrientes (sol)*	2,0 ml
Fe-EDTA (sol)**	4,0 ml
Vitaminas (sol)***	1,0 ml
Agar	17,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 6,0.

*CuSO₄.5H₂O, 0,4 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,12 g; H₂BO₃, 1,4 g; NaMoO₄.2H₂O, 1,0 g; MnSO₄.H₂O, 1,5 g; en 1 litro de agua destilada.

**Solución 1.64 % de Fe-EDTA (p/v).

***Biotina 10 mg y clorhidrato de pyridoxal 20 mg en 100 ml de agua destilada. Se filtra por membrana y se conserva en oscuridad.

Colorante:

Cloruro de trifenil-tetrazolio (C₁₉H₁₅ClN₄) 1,0 ml cada 100 de medio NFbl. (Agregar inmediatamente antes de repartir el medio en las placas).

Medio TRY (modificado de Glikmann y Dessaux, 1995)

Composición Para 1 litro

Peptona de carne	20 g
K ₂ HPO ₄	1,15 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50 g

Ajustar a pH 6,8.

Buffer CTAB 2X

Composición	Para 100 ml	Conc. Final
Tris.HCl pH 8.0	1,6 g	100 mM
EDTA	0,75 g	20 mM
NaCl	8,2 g	1,4 M
CTAB	2 g	2 %
B-mercaptoetanol*	200 µl	0,2 %

*(agregar después de autoclavar)

Buffer TE

Composición	Para 50 ml	Conc. Final
Tris.HCl	0,079 g	10 mM
EDTA	0,02 g	1 mM

7.2. Anexo II: Ejemplos de gráficos utilizados para la cuantificación de genes *nifH* por q-PCR

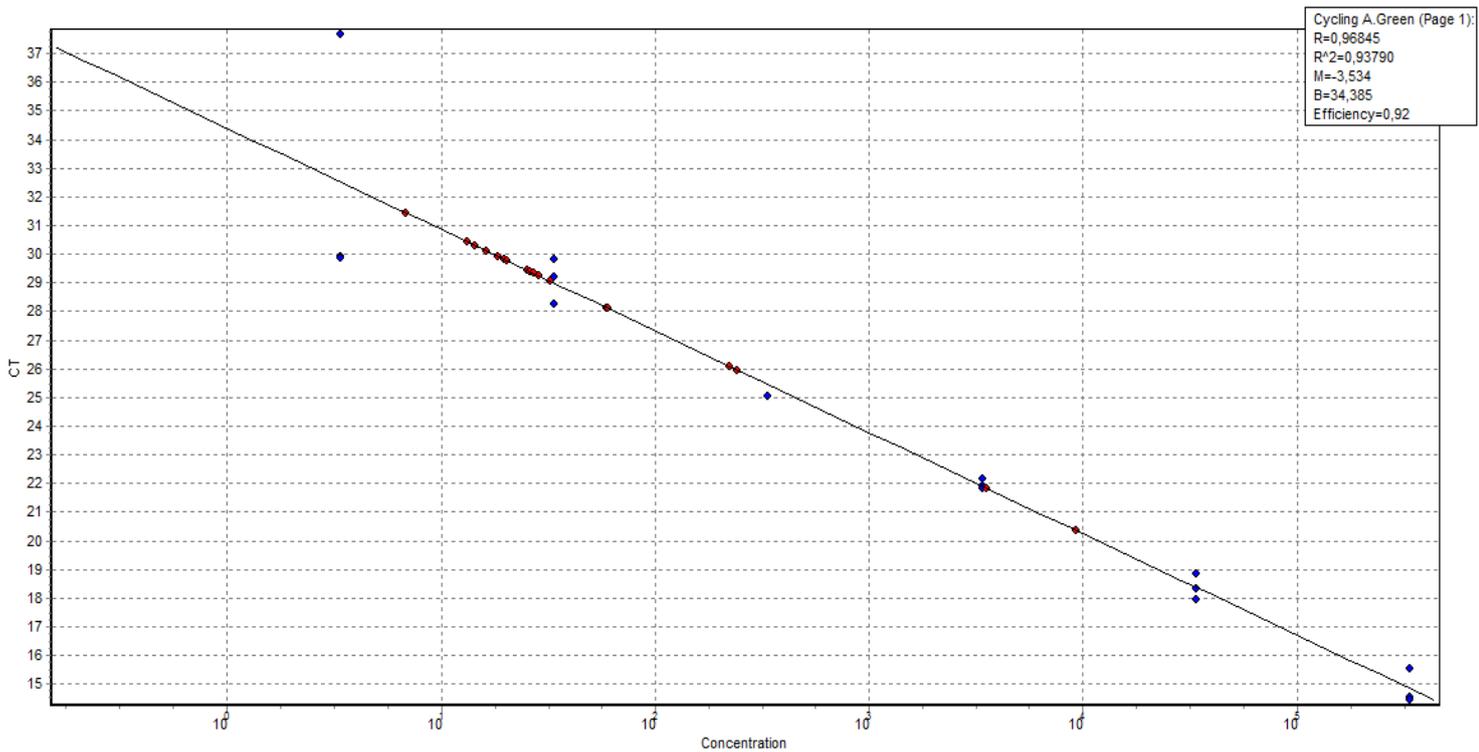


Figura 11. Curva estándar para cuantificación de genes *nifH* (CT vs concentración)

Los puntos azules corresponden a las diluciones del estándar (dil-5 a dil-10, por triplicado), los puntos rojos representan los resultados para las muestras analizadas.

En el extremo superior derecho se muestran los parámetros de la curva obtenida.

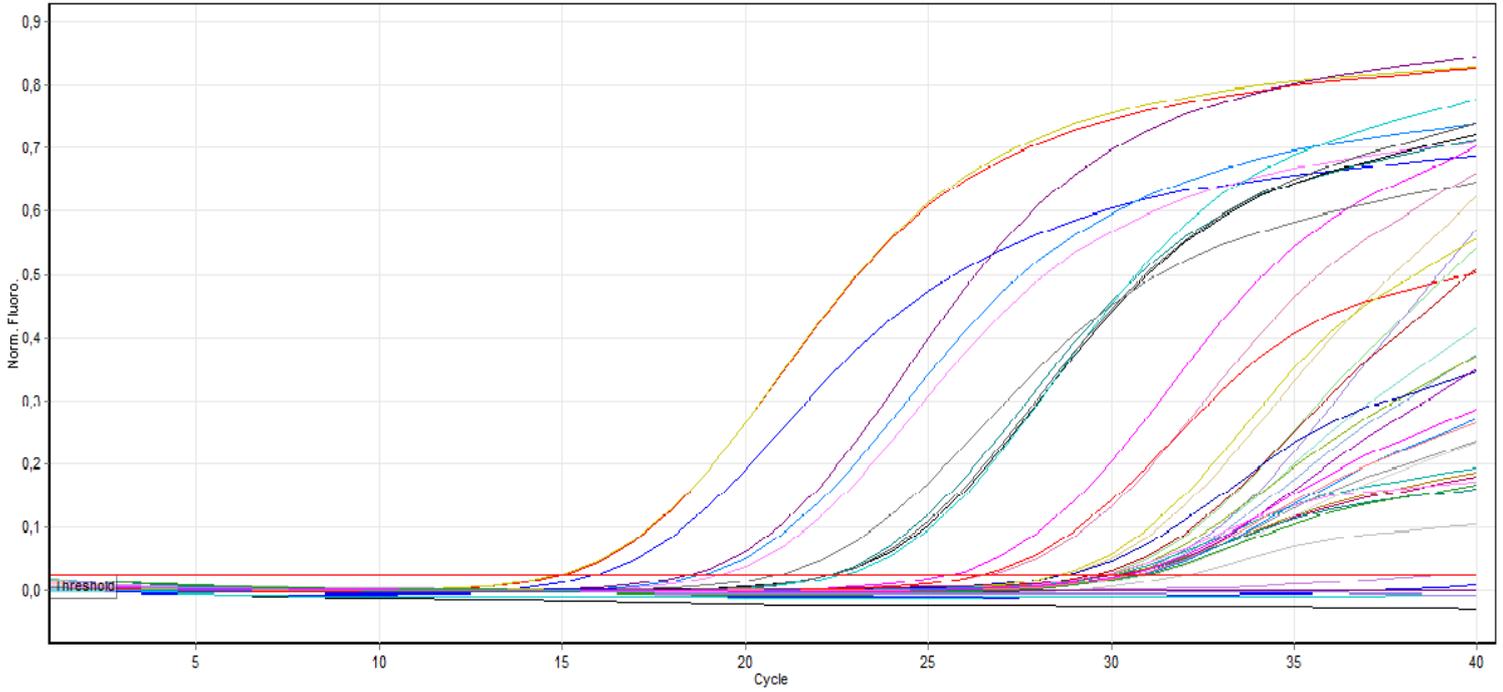


Figura 12. Curvas de cuantificación de *nifH* en escala lineal.

Se muestran las diluciones del estándar (dil-5 a dil-10 por triplicado), los controles negativos y las muestras analizadas (dil 0 y -1). La línea roja representa el umbral establecido.

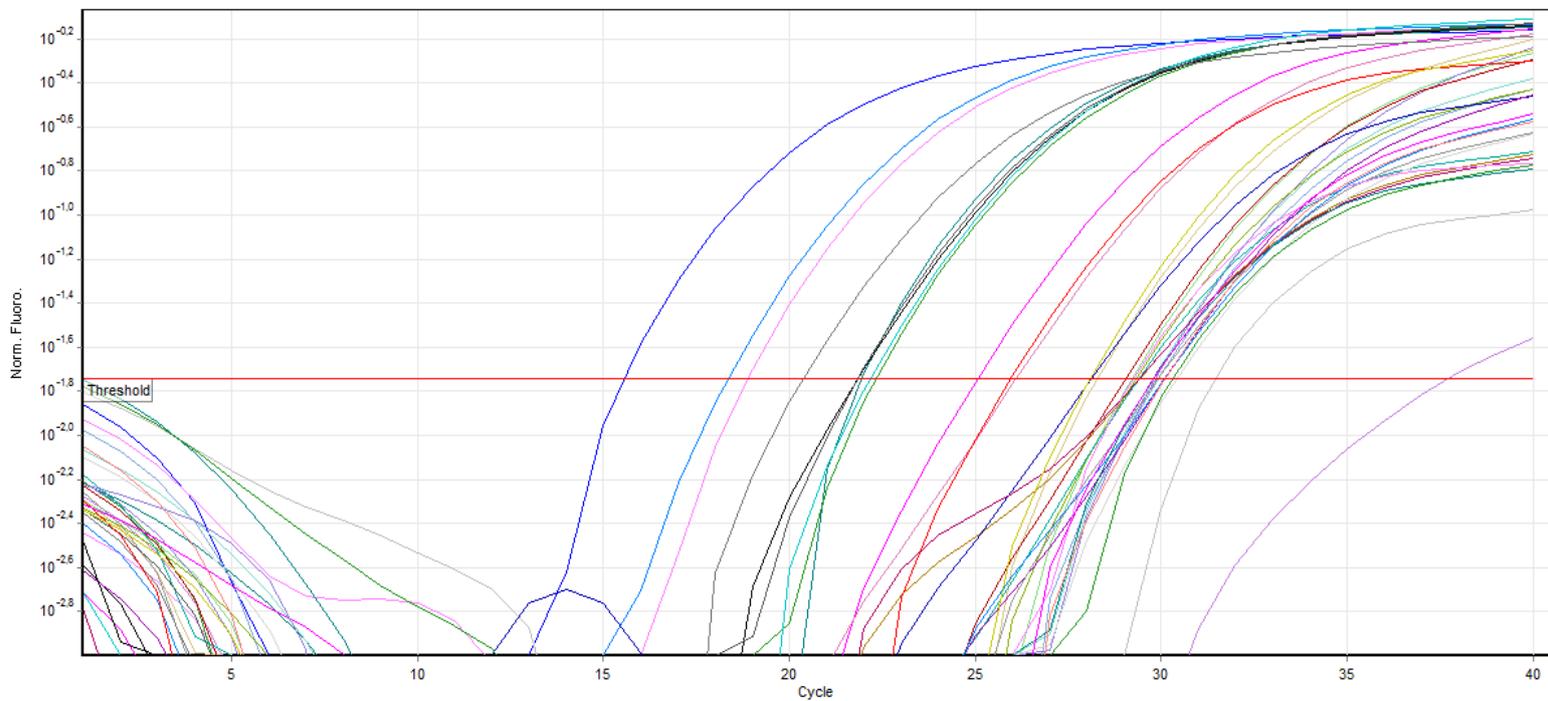


Figura 13. Curvas de cuantificación de *nifH* en escala logarítmica.

Se muestran las diluciones del estándar (dil-5 a dil-10 por triplicado), los controles negativos y las muestras analizadas (dil 0 y -1). La línea roja representa el umbral establecido.

Caracterización de bacterias endófitas de arroz y comportamiento frente a BPCV.

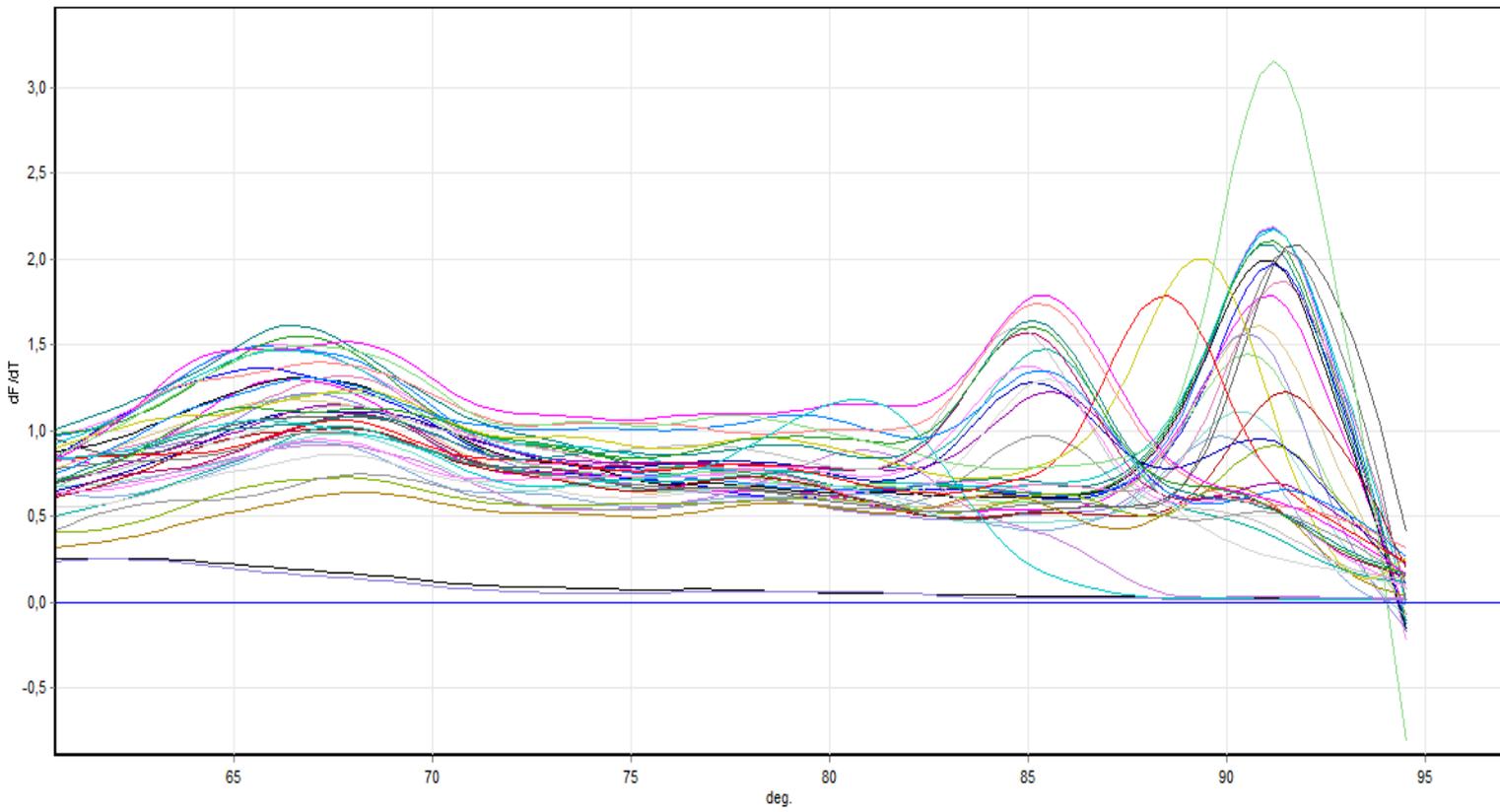


Figura 14. Curva de melting obtenida para las diluciones del estándar, los controles negativos y las muestras analizadas de raíces y hojas (dil 0 y -1). Tm de 85,5 a 91,5°C.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos aquellos que han sido parte de este proceso...

A las Dras. Ana Fernández y Lucía Ferrando por abrirme las puertas del laboratorio y guiarme en este trabajo, enseñándome tantas cosas con dedicación y paciencia.

A mis compañeros del lab; a Gastón que me ayudó en los primeros pasos y me prestó sus cepas, a Laura que siempre estaba ahí cerquita para socorrerme, a Ada por ayudarme con el ensayo de inhibición y a Andrea, mi siame, por compartir moliendas, mates y largas charlas dentro y fuera de la facultad.

También a las amigas que hice en este trayecto, a Florcis por ayudarme con las gráficas en este trabajo y por haberme dado una mano muchas veces a lo largo de la carrera y a Lu G por tantas horas compartidas y puntualmente por el cursillo y las discusiones de estadística.

A Vale, mi compañero de ruta, mi principal sostén en esta última etapa, por tanto amor y tantas palabras, por la paciencia infinita, por ser mi cable a tierra.

Y en especial a mis padres, Carlos y Adela, y a mi hermano Mariano, por apoyarme en mis decisiones, por confiar, por facilitarme el camino. ¡¡Este trabajo también es de ustedes!!.

GRACIAS...totales

Nacha.