



Caracterización de la población endófito bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce

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

Cintia Mareque Acosta

Orientador: Dr. Federico Battistoni

**Tribunal: Dr. Jorge Monza
Dra. Claudia Etchebehere
Dra. Claudia Piccini**

**Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC
Montevideo, Uruguay 2014**

Agradecimientos

En primer lugar a Fede, mi orientador, una vez por tu dedicación todos estos años de tutoría, transmisión de conocimientos y enriquecedoras correcciones. No solo profesionalmente sino personalmente te estoy muy agradecida.

A Ceci por la inmensa ayuda y los buenos aportes en la mesada, que son fundamentales.

A los que supieron dar una mano salvadora en los ensayos de invernáculo, Rufo, Ceci R, Mini Ceci y Gabi.

A los compañeros del Departamento, quienes ayudaron siempre que lo necesite. Todos tuvieron su aporte a esta tesis. En especial a mis amigas.

Sin duda, un agradecimiento enorme a la Profa. Lucy Seldin, por recibirme en su laboratorio y por su apoyo durante mi estadía. También a todos los integrantes del Laboratório de Genética Microbiana del Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes-UFRJ por hacerme sentir parte del grupo. En particular a Thais y Renata que supieron transmitirme y ayudarme muchísimo con una técnica totalmente desafiante como como lo fue para mí el DGGE.

A Fernando Hackembruch del Departamento Agrícola de ALUR, por su amabilidad y por proveernos de la materia prima esencial para llevar adelante este trabajo.

Al tribunal por el tiempo, dedicación y aporte a esta tesis.

Eternamente agradecida a la familia que es esencial y parte importante del apoyo emocional.

Y por último, pero no menos importante a Martín, que elegimos recorrer este camino juntos. Esta tesis no hubiese sido posible sin tu apoyo.

Índice general

Resumen	4
1.0 Introducción	5
1.1 El sorgo dulce (<i>Sorghum bicolor</i> (L) Monech)	5
1.2 Promoción del crecimiento vegetal por bacterias	7
1.3 Bacterias endófitas.....	10
1.4 Aproximaciones al estudio de la diversidad bacteriana.....	14
1.5 Estudio de la diversidad microbiana mediante técnicas de huella genética.....	15
Capítulo 1: Aislamiento, caracterización y promoción del crecimiento vegetal de probables endófitos bacterianos nativos asociados a sorgo dulce (<i>Sorghum bicolor</i>)	18
2.0 Materiales y Métodos	19
2.1 Aislamiento de probables endófitos bacterianos (PEB) nativos	19
2.2 Extracción de ADN genómico a partir de cultivos en medio líquido	19
2.3 Extracción de ADN genómico a partir de lisado de colonia	20
2.4 Caracterización de la colección	20
2.5 Identificación de aislamientos de interés.....	23
2.6 Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas y de invernáculo	25
3.0 Resultados.....	26
3.1 Aislamiento, caracterización e identificación de PEB nativos asociados a la variedad de sorgo dulce M81E.....	26
3.2 Promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas y de invernáculo por parte de PEB seleccionadas	35
4. Discusión	37
4.1 Probables endófitos bacterianos nativos asociadas a la variedad M81E de sorgo dulce.....	37
4.2 Promoción del crecimiento vegetal de la variedad M81E de sorgo dulce, por posibles bacterias endófitas.....	41
Capítulo 2: Diversidad bacteriana endofítica y endofítica-diazotrófica asociada a plantas sorgo dulce crecidas en condiciones de fertilización química contrastantes	43
2.0 Materiales y Métodos	44
2.7 Obtención de ADN endofítico	44
2.8 Amplificación de genes de interés mediante PCR anidada	44
2.9 Análisis de los amplicones obtenidos mediante la técnica Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	47
2.10 Análisis informático de las imágenes obtenidas a partir de los geles DGGE	47
2.11 Secuenciación de las bandas de interés seleccionadas	47
2.12 Cálculo de los índices de diversidad alfa	48
3.0 Resultados.....	49
3.3 Obtención de ADN endofítico a partir de plantas de sorgo dulce crecidas en condiciones contrastantes de fertilización química	49
3.4 Análisis del efecto de la fertilización química sobre la estructura de la comunidad endofítica del Dominio Bacteria de plantas de sorgo dulce (var. M81E)	49

3.5 Análisis del efecto de la fertilización química sobre la estructura de la comunidad endofítica-diazótrofa de plantas de sorgo dulce (var. M81E).....	54
3.6 Identificación de las bandas seleccionadas a partir de los geles DGGE.....	56
3.7 Análisis del efecto de la fertilización química sobre la diversidad bacteriana endofítica y endofítica-diazótrofa asociada a sorgo dulce según los índices de diversidad alfa	62
4.0 Discusión.....	63
4.3 Análisis de la comunidad bacteriana endofítica y endofítica-diazótrofa asociada a plantas de sorgo dulce (variedad M81E), mediante PCR-DGGE.....	63
4.4 Efecto de la fertilización química sobre la diversidad de las comunidades bacterianas endofítica y endofítica-diazótrofa asociadas a sorgo dulce	66
Conclusiones.....	67
Perspectivas	68
Anexo	69
Bibliografía.....	71

Índice de tablas

Tabla 1: Concentraciones de antibióticos ensayadas.....	23
Tabla 2: Número de PEB nativos obtenidos según órgano o medio de cultivo empleado	26
Tabla 3: Listado de 45 aislamientos seleccionados de la colección en el que se presentan las características PCV, PMI, así como el género bacteriano y el grupo ERIC al que pertenecen.....	28
Tabla 4: Porcentaje de Filos obtenidos a partir de los aislamientos PEB seleccionados, mediante secuenciación del gen <i>ADNr 16S</i>	31
Tabla 5: Similitud de la secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr 16S</i> en comparación con el mejor candidato de la base de datos NCBI, de los PEB nativos asociados a la variedad comercial M81E de sorgo dulce	31
Tabla 6: Cepas utilizadas como inoculantes en los ensayos de promoción del crecimiento vegetal de plantas de sorgo dulce (variedad M81E) con sus características PCV y PMI correspondientes así como los géneros bacterianos a los que pertenecen.....	35
Tabla 7: Efectos de la inoculación de PEB nativos en plantas de sorgo dulce de la variedad M81E.....	36
Tabla 8: Cebadores utilizados en este trabajo para la amplificación del gen <i>ADNr 16S</i>	46
Tabla 9: Cebadores utilizados en este trabajo para la amplificación del gen <i>nifH</i>	46
Tabla 10A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr16S</i> de las bandas obtenidas de los geles de DGGE del Dominio Bacteria.....	56
Tabla 10B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del gel de DGGE del Dominio Bacteria	57
Tabla 11A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr16S</i> de las bandas obtenidas de los geles de DGGE de Alfabroteobacteria	58
Tabla 11B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del análisis del gel de DGGE de las Alfabroteobacteria	59
Tabla 12A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr16S</i> de las bandas obtenidas de los geles de DGGE de Betaproteobacteria	59
Tabla 13A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr16S</i> de las bandas obtenidas de los geles de DGGE de Actinobacteria	60
Tabla 13B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del gel de DGGE de Actinobacteria.....	60
Tabla 14A: Similitud de secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr16S</i> de las bandas obtenidas de los geles de DGGE de Firmicutes	61

Tabla 14B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del gel de DGGE de Firmicutes entre tratamientos y sus intensidades.....	61
Tabla 15: Índices de diversidad alfa calculados para los órganos en condiciones contrastantes de fertilización química	62

Índice de figuras

Figura 1: Características de las plantas de sorgo	5
Figura 2: Las principales rutas de colonización de la planta por bacterias endófitas.....	11
Figura 3: Esquema ilustrativo de la técnica de PCR-DGGE.	16
Figura 4: Porcentaje de aislamientos PBE asociados a sorgo dulce con una o más características promotoras del crecimiento vegetal.	27
Figura 5: Porcentaje de los aislamientos PBE con crecimiento en las distintas fuentes de (A) C y (B) N.....	29
Figura 6: Porcentaje de aislamientos de la colección PBE asociadas a sorgo dulce que presentaron resistencia a los antibióticos ensayados.....	29
Figura 7: Porcentaje de aislamientos con una o más resistencia a los 9 antibióticos ensayados	30
Figura 8: Dendrograma obtenido a partir del análisis de ERIC-PCR	30
Figura 9: Filogenia construida a partir del gen <i>ADNr 16S</i> de los aislamientos seleccionados.....	34
Figura 10: Vista de los distintos ensayos en los que se determinaron la PCV	36
Figura 11: Esquema de la estrategia utilizada para el estudio de la diversidad bacteriana y bacteriana-diazótrofa mediante PCR-DGGE.....	43
Figura 12: Cebadores empleados para el estudio de la diversidad bacteriana y bacteriana-diazótrofa mediante PCR-DGGE	45
Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de ADN bacteriano obtenido a partir de raíces o tallos	49
Figura 14: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR del dominio Bacteria.....	50
Figura 15: Dendrograma resultante del análisis del gel en el cual se estudió la estructura de la comunidad del dominio Bacteria.....	50
Figura 16: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR del Filo Proteobacteria	51
Figura 17: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR de los Filos (A) Actinobacteria (B) Firmicutes (C) Bacteroidetes	52
Figura 18: Dendogramas obtenidos a partir del análisis de los geles en los cuales se estudió la estructura de la comunidad del Filo Proteobacteria.....	53
Figura 19: Dendogramas obtenidos a partir del análisis de los geles en los cuales se estudió la estructura de la comunidad de los Filos (A) Actinobacteria (B) Firmicutes (C) Bacteroidetes.	54
Figura 20: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR de la comunidad endofítica-diazótrofa.....	55
Figura 21: Dendrograma resultante del análisis del gel en el cual se estudió la estructura de la comunidad endofítica-diazótrofa	55

Resumen

El interés en la producción y uso de energías alternativas en sustitución a los combustibles fósiles, ha ido en aumento en todo el mundo, impulsando como consecuencia la producción de biocombustibles, principalmente el bioetanol. La caña de azúcar es la principal materia prima utilizada en nuestro país para la producción de bioetanol (95%), sin embargo dicho cultivo presenta limitaciones agroclimáticas para su explotación y expansión. Es en este contexto donde surge el cultivo de *Shorghum bicolor* (sorgo dulce) como una excelente alternativa complementaria al suministro de materia prima para la producción de bioetanol en el Uruguay. Son escasos los conocimientos que se disponen sobre las bacterias asociadas a este cultivo, sobre como la fertilización química afecta esta asociación, así como su potencial biotecnológico como promotoras del crecimiento vegetal. En este marco, los objetivos fueron: **i)** Contribuir al conocimiento de las bacterias endófitas nativas PCV asociadas al cultivo de sorgo dulce y **ii)** Determinar los efectos de la fertilización química en la estructura de la comunidad bacteriana endófito y endófito-diazótrofo, asociada al cultivo de sorgo dulce.

Para ello se realizaron estrategias dependiente e independiente de cultivo, a partir de raíces y tallos esterilizados en superficie colectados de parcelas crecidas con fertilización química contrastante en la región de Bella Unión.

En una primera instancia, se generó y caracterizó, una colección de 188 probables endófitos asociados a sorgo dulce. En la misma se buscaron *in vitro*, características promotoras del crecimiento vegetal (PCV): capacidad de solubilizar minerales (P y Fe), de producir fitohormonas (AIA) así como la capacidad de fijar biológicamente el N₂ atmosférico (FBN). Los resultados mostraron una amplia variedad de aislamientos con diferentes características PCV lo que le da a la colección un potencial biotecnológico. Los aislamientos seleccionados fueron identificados por secuenciación del gen *ADNr 16S* y los estudios filogenéticos que varias de las cepas identificadas, han sido descritas como asociadas a diferentes tipos de plantas, describiéndose por primera vez en este trabajo aislamientos pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevibacillus* y *Kocuria* como probables endófitos asociados a plantas de sorgo dulce. Se seleccionaron aislamientos de acuerdo a sus características PCV *in vitro*, y se usaron como inoculantes de plantas de sorgo dulce en condiciones *gnotobióticas*, y así como en condiciones de invernáculo. Se comprobó que los aislamientos *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 son PCV de sorgo dulce.

En una segunda instancia, se puso a punto la técnica de aislamiento de ADN bacteriano endófito a partir de plantas de sorgo dulce crecidas en campo en condiciones contrastantes de fertilización química. Con el fin de estudiar la diversidad endófito total así como la diversidad endófito-diazotrófica, mediante la técnica PCR-DGGE se realizó el análisis de las comunidades en base a los genes *ADNr 16S* y *nifH* respectivamente. Bandas específicas fueron extraídas de los geles e identificadas mediante secuenciación del gen *ADNr 16S*. Los resultados obtenidos mostraron que la comunidad endófito se estructura según el órgano, mientras que la comunidad endófito-diazótrofo se estructura según fertilización. Por otro lado, la fertilización química no afecta la diversidad alfa en ninguno de los casos estudiados.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis sientan la base para continuar y profundizar los estudios de las bacterias endófitas asociadas a este importante cultivo con el fin de poder desarrollar un inoculante

1.0 Introducción

1.1 El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L) Monech)

Las plantas de la especie *Sorghum bicolor* (sorgo dulce), pertenecen a la familia de las Poaceae, las cuales se caracterizan por presentar espigas que nacen de a pares. Se especula que las mismas son originarias de África Central (Etiopía o Sudán), pues es ahí donde se encuentra la mayor diversidad de especies. Este cultivo presenta una altura de 1 a 2 metros exhibiendo en algunos casos macollos, los cuales se forman a partir de las yemas axilares y son de maduración más tardía que el tallo principal. La presencia de los mismos es varietal y está influenciada por la fertilidad y las condiciones hídricas. Las plantas adultas pueden desarrollar entre 7 a 24 hojas, las cuales son alternas, opuestas y de forma linear lanceolada. La nervadura media de la misma es blanquecina o amarilla, en los sorgos de médula seca, o verde en los de médula jugosa. El borde de las hojas presenta dientes curvos, filosos y numerosas células motoras ubicadas cerca de la nervadura central del haz las cuales facilitan el arrollamiento de la lámina durante períodos de sequía. Las plantas de sorgo presentan inflorescencias en forma de panoja, semilla de 3mM, esférica y oblonga, de color negro, rojizo y amarillento; así como flores con estambres y pistilos. Asimismo, presenta un sistema radicular que puede llegar en terrenos permeables hasta 2 m de profundidad (FAO) (Figura 1).

El sorgo dulce, es el quinto cultivo en importancia en el mundo después del trigo, el arroz, el maíz y la cebada, con una producción mundial de aproximadamente 60 millones de toneladas por año (FAO).

En nuestro país, este cultivo se utiliza para pastoreo directo, conservación de forraje (silo o heno), forraje diferido o grano. En el año 2013, se cosecharon 1.500 hectáreas (ha) de sorgo dulce a partir de las cuales se procesaron 25.000 ton (MGAP).



Figura 1: Características de las plantas de sorgo. Tomado de http://grassdueroriverbasin.blogspot.com/2013_05_01_archive.html

1.2. La producción de biocombustibles

El interés en la producción y uso de energías alternativas, en sustitución a los combustibles fósiles, ha ido en aumento en todo el mundo impulsando fuertemente la producción de biocombustibles, principalmente el bioetanol. Por biocombustible se entiende aquellos combustibles tales como el bioetanol, el biogás o el biodiesel, producidos en base a biomasa no fósil, a través de un proceso de transformación (fermentación alcohólica, esterificación de ácidos grasos o descomposición anaeróbica)(1).

En el caso del bioetanol, el mismo se puede producir a partir de varios cultivos de alta energía, como lo son el sorgo dulce, el maíz (*Zea mays*) o la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) entre otros. Estos se cultivan ampliamente en zonas tropicales, subtropicales y templadas (2, 3). En el caso del sorgo dulce, las características positivas a destacar para su uso como materia prima para la producción de bioetanol son: **(i)** su eficiencia de convertir la energía solar en biomasa vegetal, **(ii)** su resistencia a la sequía y **(iii)** las altas concentraciones de azúcar directamente fermentables presentes en su tallo (12-21%). A este cultivo se lo define como multipropósito dado que todos los componentes de la planta tienen valor económico. El grano se puede utilizar como alimento o ración, las hojas para forraje, el tallo (junto con el grano) para combustible y la fibra (celulosa) como abono o alimento para animales, así como materia prima para la producción de biocombustibles de segunda generación(4).

La importancia de los biocombustibles a nivel mundial ha ido en aumento en los últimos 10 años. Particularmente en el año 2013, el mercado mundial de bioetanol comprendía la producción de unos 88.688 millones de litros, dominando el mercado EE.UU. y Brasil con el 84% del total de la producción (RFA, 2013). Uruguay no cuenta con yacimientos de petróleo propios, por lo que es totalmente dependiente de los combustibles fósiles importados, lo hace un país vulnerable a las oscilaciones de los precios internacionales de los mismos. En respuesta a esta problemática, nuestro país se ha planteado como objetivo la diversificación de la matriz energética. Con este fin se ha impulsado fuertemente la producción de biocombustibles a partir de materias primas nacionales y renovables. En este contexto se desarrolla el Proyecto sucro-alcoholero promovido por la empresa estatal ANCAP a través de la empresa ALUR S.A. y en la cual también participa la empresa estatal petrolera Venezolana PDVSA (<http://www.alur.com.uy/empresa.html>). Este proyecto tiene como objetivo incrementar de 4.000 a 10.000 el número de hectáreas agrícolas vinculadas a las diferentes producciones de ALUR, siendo actualmente de casi 10.000 ha. La producción de etanol planificada en este proyecto por ALUR es de 26 millones de litros por año, la que será utilizada para la mezcla al 5% con las gasolinas según lo establecido en la ley N°: 18.195, donde se encomienda a ANCAP la incorporación de biocombustibles producidos en el país con materias primas nacionales <http://www.alur.com.uy/ley18195.html>. Hasta el momento, la caña de azúcar es la principal materia prima utilizada por ALUR para la producción de bioetanol (95%), sin embargo dicho cultivo presenta limitaciones agroclimáticas para su explotación y expansión (5). Es en este contexto donde surge el cultivo de sorgo dulce como una excelente alternativa complementaria al suministro de materia prima para la producción de bioetanol en el Uruguay.

1.3 El sorgo dulce como materia prima para la producción de biocombustibles

El cultivo de sorgo dulce se adapta a una diversidad de temperaturas y climas, soportando períodos de sequías en los cuales permanece durmiente (6). En las latitudes de nuestro país presenta un ciclo anual de 120 a 180 días, por lo que los cultivos de caña de azúcar y sorgo dulce son complementarios y pueden ser incluidos en ciclos de rotación de cultivos (7, 8). Por otra parte, la cosecha del sorgo dulce puede realizarse mecánicamente, una característica muy importante a la hora de planificar su explotación. Al compararse los rendimientos por hectárea para la producción de biocombustibles del sorgo dulce con respecto a los de la caña de azúcar, se observa que el sorgo dulce presenta un menor rendimiento con respecto a la producción de materia prima, los niveles de brix (cociente total de sacarosa en un líquido) y fibras. Sin embargo, las necesidades de fertilizantes para el cultivo de sorgo dulce son un tercio de las necesarias para la caña de azúcar. Estas características hacen que el sorgo dulce presente condiciones agroclimáticas óptimas para su explotación en nuestro país (9).

Diversos nutrientes vegetales son escasos en el suelo ocasionando una limitación en el óptimo desarrollo de las plantas. Por otra parte, la fertilización química representa una alta proporción del costo total de producción, siendo aplicada en la mayoría de los casos en exceso. Solo la mitad de la totalidad del fertilizante suministrado es asimilado por la planta mientras que el resto se pierde por lixiviación, lo que trae como consecuencia la contaminación de los cursos de aguas superficiales y capas freáticas (10).

Esta problemática enfatiza el hecho de la necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías para ser empleadas en la agricultura con el fin de lograr sistemas de producción más sustentables.

1.2 Promoción del crecimiento vegetal por bacterias

Durante las últimas décadas, se ha incrementado el interés en el estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), asociadas a diferentes cultivos agrónomicamente importantes como el arroz, el maíz, el trigo, la caña de azúcar y el sorgo, con especial interés en las bacterias que fijan N₂ (diazótrofas) (11–13). En este sentido diferentes BPCV han sido aisladas de la rizósfera y de los tejidos internos de plantas pertenecientes a la familia Poaceae con un alto potencial biotecnológico(14).

El efecto promotor del crecimiento vegetal por bacterias o moléculas producidas por las mismas se debe a una estimulación del crecimiento de la planta o al mejoramiento del vigor o del estado sanitario de la misma, el cual puede darse en forma directa o indirecta.

Los mecanismos de acción directa conocidos incluyen **(i)** la producción de estimulantes del crecimiento, como las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), **(ii)** el incremento en la capacidad de absorción de minerales como el fósforo, el hierro y el nitrógeno y **(iii)** la producción de sustancias fenólicas como las quinonas, están involucrados en la estimulación de la germinación de semillas así como en la emergencia y el establecimiento de la plántula (15). Aquellas bacterias que fijan N₂ (diazótrofos), solubilizan fosfato y/o producen sideróforos son considerados biofertilizantes, ya que aumentan la disponibilidad de estos nutrientes limitantes a la planta.

Los mecanismos de acción indirectos son, **(i)** el control biológico y **(ii)** la estimulación de la resistencia sistémica inducida en plantas. El control biológico de fitopatógenos, es realizada por las BPCV a través de la competencia por espacio, nutrientes, agua, luz y oxígeno; o mediante la producción de compuestos químicos como antibióticos o bacteriocinas tales como el ácido cianídrico. En esta sección, se pondrá énfasis en la descripción de los mecanismos PCV de acción directa mediante bacterias.

1.2.1 Fijación biológica del N₂ atmosférico

De los nutrientes fundamentales para el desarrollo vegetal, el nitrógeno es uno de los elementos más estudiados y frecuentemente limitante del crecimiento vegetal. El mismo se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera (N₂), sin embargo bajo esa forma no está biodisponible para las plantas. Las mismas son capaces de asimilar el nitrógeno en forma de amonio (NH₄⁺), siendo la fertilización química nitrogenada una de las fuentes más comunes para disponer de nitrógeno. Como se mencionó, esta característica supone graves problemas ambientales, dado que solo el 50% del fertilizante suministrado es asimilado por la planta mientras que el resto se pierde por lixiviación, contaminando cursos de aguas superficiales y capas freáticas (10).

La capacidad de fijar biológicamente el N atmosférico (diazotrofia), es exclusiva de los procariotas, siendo un proceso llevado a cabo por la enzima nitrogenasa. Esta enzima es un complejo de 2 componentes, el cual cataliza la reducción de N₂ dependiente de Mg-ATP formando dos moléculas de NH₃. Dicha reducción catalítica de N₂ es lo que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN), y la estequiometría de esta reacción es la siguiente:



Los dos componentes proteicos de este complejo, son generalmente denominados la proteína Fe y la proteína MoFe. La proteína Fe es un homodímero codificado por el gen *nifH*, mientras que la proteína MoFe es un heterodímero codificado por los genes *nifD* (subunidad α) y *nifK* (subunidad β) (16). La nitrogenasa no es específica para N₂ ya que puede reducir otros compuestos con triples enlaces como el acetileno. Un ensayo comúnmente utilizado para la medida de la actividad de la misma es la reducción del gas acetileno. En este ensayo se mide la aparición del gas etileno por cromatografía de gases, siendo un método económico, rápido y sensible para determinar si una bacteria presenta la capacidad FBN (17).

Debido a que dicha enzima se inactiva en presencia de O₂, se postula que las primeras nitrogenasas debieron de haberse originado antes de que atmósfera primitiva reductora se transformara en oxigénica, por la acumulación de O₂ como producto final de la fotosíntesis bacteriana. Es así que los diazótrofos antiguos recorrieron un largo camino evolutivo desde la aparición de las primeras plantas terrestres, hace aproximadamente 400 millones de años, conviviendo en la rizósfera, como epífitos o en el interior de las plantas como simbioses o endófitos. Los simbioses diazótrofos más estudiados son los rizobios los cuales inducen estructuras especializadas en las raíces (nódulos) en plantas de leguminosas (18).

Además de los diazótrofos-simbioses, existen también los diazótrofos-asociados, los cuales incluyen bacterias de diferentes géneros tales como *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* (19).

1.2.2 Solubilización de fosfato y producción de sideróforos

El fósforo es el tercer nutriente en importancia limitante del crecimiento vegetal, ya que está involucrado en procesos biológicos tales como la acumulación de energía, la síntesis de ácidos nucleicos y la fotosíntesis entre otros. En el suelo no se encuentra biodisponible ya que se encuentra en forma insoluble (ejemplo ácido fítico), siendo la forma de absorción de P por las plantas el H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} . Como consecuencia, las plantas pueden asociarse a bacterias solubilizadoras de P unido a moléculas orgánicas o inorgánicas, haciéndolo disponible para la planta (20, 21). Las bacterias solubilizadoras de fosfato son ubicuas siendo los géneros más reportados *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* y *Pseudomonas* (22).

Otro elemento esencial para los organismos es el Fe, el cual participa en un gran número de reacciones metabólicas así como en macromoléculas. Este elemento, es abundante en el suelo pero poco soluble, por lo que no se encuentra biodisponible para las plantas. En respuesta a la limitación de Fe, las plantas producen y excretan quelantes y/o fitosideróforos que unen el Fe^{3+} y lo transportan a la superficie de la raíz donde es reducido y absorbido por la planta, sin embargo, los mismos son de muy baja afinidad en comparación con los sideróforos bacterianos (23). Los sideróforos bacterianos, son metabolitos de bajo peso molecular con alta afinidad por el Fe producidos en condiciones limitantes en este metal (24). Las bacterias que presentan estos sistemas, son muy buenos competidores en la rizósfera lo que contribuye a facilitar la asociación planta-bacteria así como la colonización de raíces, tallos y hojas (25, 26). Esta propiedad ha sido ampliamente demostrada en bacterias endófitas aisladas como antagonistas de patógenos en arroz, algodón y papa (27–29).

1.2.3 Producción de fitohormonas

Las fitohormonas, así como los reguladores de las mismas, son producidas por la planta y su efecto se da a concentraciones del orden de los micromoles, regulando procesos básicos de la planta a nivel celular y su respuesta. Diversos trabajos han demostrado la producción *in vitro* de fitohormonas por bacterias las cuales tienen consecuencia sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (30, 31). Existen seis clases de fitohormonas entre las que se encuentran las auxinas y el etileno.

1.2.3.1 Auxinas

La auxina más abundante en la planta es el ácido indol-3-acético (AIA). Se ha estimado que cerca del 80% de las bacterias rizosféricas pueden sintetizar esta hormona y por consiguiente influenciar los niveles hormonales endógenos de la planta. El efecto de la auxina exógena es el aumento en el sistema radicular (largo y área), lo que trae como consecuencia una mayor exploración de las raíces (32). Las vías de síntesis del AIA utilizadas por las rizobacterias descritas hasta el momento son, la vía indol-3-piruvato (IPyA), indol-3-acetamida (IAM), triptamina (TAM), triptófano oxidasa de cadena lateral (TSO), indol-3-acetonitrilo (IAN), y una vía independiente del triptófano. Las más comunes son las dependientes del triptófano, precursor secretado por la planta como un exudado radicular (33).

Uno de los casos más estudiados es el de la bacteria diazotrofa, *Azospirillum brasilense*, la cual es capaz de promover el crecimiento vegetal mediante la síntesis de AIA, lo cual trae como consecuencia un aumento de la superficie radicular mediante el acortamiento de la longitud y el aumento de la formación de pelos radiculares (34). Se ha reportado que cuando los niveles de exudados radiculares son limitantes para el crecimiento bacteriano, *Azospirillum brasilense* aumenta su producción de AIA estimulando la formación de

raíces laterales y pelos radiculares, lo que trae como consecuencia un aumento de los niveles de exudados radiculares los cuales conllevan a un aumento del crecimiento bacteriano (35).

1.2.3.2 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa

El etileno (ET) es una hormona gaseosa que induce la maduración de la fruta y la senescencia de la flor. El ET generalmente estimula la elongación de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y promueve la formación de pelos radiculares. El mismo es sintetizado también bajo condiciones de estrés biótico, infección por patógenos, o por estrés abiótico como la sequía, siendo conocida como la hormona del estrés. La biosíntesis de la hormona en la planta comienza con la conversión del S-adenosil metionina (SAM) en ACC y en 5^l-metiltioadenosina (MTA) por la enzima ACC sintasa(36). Según el modelo planteado por Glick, el AIA bacteriano desencadena la expresión de la ACC sintasa en la plantas y como consecuencia la producción de ACC (precursor del ET). La presencia de la enzima ACC desaminasa ha sido reportada en varias bacterias rizosféricas, de vida libre y endófitas estando distribuida en varios géneros del dominio Bacteria incluyendo *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Achromobacter* y *Variovorax* (37). Estas bacterias pueden tomar el ACC secretado por las raíces y mediante la ACC desaminasa clivarlo convirtiéndolo en α -ketobutirato y amonio y de esta manera reducir los niveles de ET. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que poseen la enzima ACC desaminasa, previenen la señalización de la hormona ET resultando en plantas más tolerantes a los estreses ambientales(38).

1.3 Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas colonizan activamente los tejidos internos de las plantas y establecen asociaciones sin causarle daño aparente a las mismas (14, 39). La mayoría de los endófitos colonizan distintos compartimentos del apoplasto de la planta, como los espacios intercelulares, las células de la pared del córtex así como los vasos del xilema. Asimismo, algunos pueden colonizar los órganos reproductivos de las plantas (flores, frutas y semillas). Dentro de la planta, estas bacterias no producen cambios morfológicos, como si lo hacen las bacterias simbioses de las raíces de leguminosas formando un nódulo. Tampoco causan síntomas de enfermedad como lo hacen las bacterias patógenas (40). Se han descrito diferentes características PCV *in vitro* presentes en un gran número de bacterias endófitas, sin embargo se ha observado que pocas presentan capacidad PCV *in planta* y aún menos en condiciones agronómicas (41).

En la actualidad han sido reportadas como endófitas un total de 200 bacterias, pertenecientes a 16 Filos diferentes tales como *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Verrucomicrobiae* (42–46). Sin embargo, los géneros predominantes y más estudiados hasta el momento son los pertenecientes a los filos Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, los cuales incluyen a los géneros *Azoarcus* (47), *Gluconoacetobacter* (48), *Bacillus* (49), *Enterobacter* (50), *Burkholderia* (51), *Herbaspirillum* (52), *Pseudomonas* (53), *Serratia* (53), *Stenotrophomonas* (54) y *Streptomyces* (55).

1.3.1 Interacción planta-endófito

Existen distintas maneras mediante las cuales las bacterias endófitas pueden acceder al interior de las plantas. La colonización de las mismas por endófitos bacterianos, consta de varias etapas que incluyen: **(i)** la colonización del rizoplano, **(ii)** la infección bacteriana y **(iii)** la colonización del córtex de la planta.

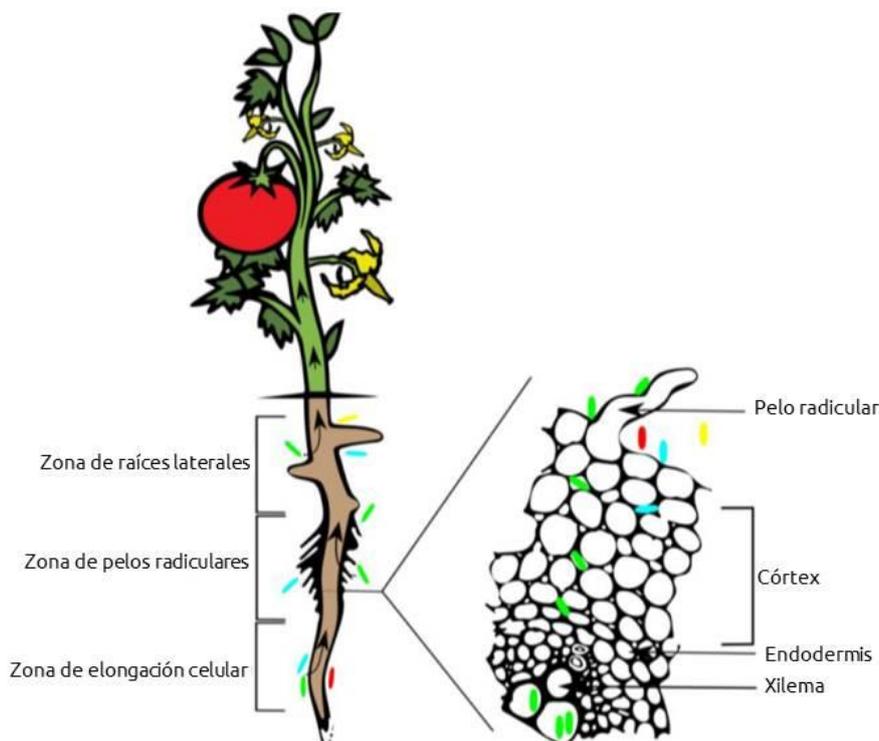


Figura 2: Principales rutas de colonización de la planta por bacterias endófitas. Los endófitos pueden permanecer en la zona de entrada (celestes) o moverse internamente y ocupar el espacio intercelular del córtex y los vasos del xilema (verde). En rojo y amarillo se representan las bacterias rizósfericas que son incapaces de colonizar los tejidos internos de la planta (40).

1.3.1.1 Colonización del rizoplano

El primer paso de la interacción endófito-planta implica generalmente la colonización de la rizósfera, y la posterior unión de las bacterias a la superficie radicular, siendo éste un paso crucial (40). Varios componentes de la superficie bacteriana pueden participar en este proceso. En la cepa *Azoarcus* sp. BH72, un endófito-diazótrofo de arroz, los pilis del tipo IV son imprescindibles para la unión a la superficie radicular (56). Sin embargo, la unión a la raíz por parte de la cepa *Herbaspirillum seropedicae*, endófito-diazótrofo de maíz, depende de los lipopolisacáridos de la superficie bacteriana (LPS) (57).

1.3.1.2 Infección bacteriana

El lugar preferencial de adhesión bacteriana y posterior entrada a los tejidos internos, son la zona apical de la raíz, los pelos radiculares (ingreso activo), así como las zonas de las raíces basales con grietas causadas por el nacimiento de raíces laterales (ingreso pasivo) (Figura 2). Para el ingreso activo a la planta, las bacterias endófitas deben poseer una batería de enzimas celulolíticas capaces de hidrolizar la pared de las células de la raíz. Sin embargo, durante el ingreso pasivo no es necesaria la hidrólisis de la pared celular, ya que las grietas presentes en la planta facilitan la entrada (58, 59).

Las enzimas bacterianas degradadoras de pared celular, están también implicadas en el desencadenamiento de las vías de defensa en la planta. La inducción de esta respuesta resulta en una disminución de la propagación por ejemplo, de patógenos dentro de la planta. En el caso de las bacterias endófitas, las mismas

deben ser capaces de eludir la respuesta inmune de la planta o incluso reducirla con el fin de poder infectar la misma. Es así que las bacterias endófitas capaces de entrar por las rupturas naturales de las raíces laterales, permanecerían “invisibles” al sistema inmune de la planta siendo exitosas en su colonización. Este tipo de mecanismo ha sido descrito para las interacciones: *Azoarcus* sp. BH72, *Herbaspirillum seropedicae* Z67 y *Burkholderia vietnamiensis* con plantas de arroz (60–62), *B. phytofirmans* PsJN con plantas de vid (58), *B. subtilis* Lu144 y *B. cepacia* Lu10-1 con plantas de mora (63, 64), así como para *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 con plantas de caña de azúcar (65).

1.3.1.3 Colonización del córtex de la planta

Luego de atravesada la barrera exodérmica, una posibilidad es que las bacterias permanezcan en el lugar de entrada o se muevan hacia los tejidos interiores, ocupando así el espacio intercelular del córtex. No es común que las bacterias endófitas ingresen a las células vegetales y formen una estructura morfológica nueva como es el caso del nódulo en la interacción rizobio-leguminosa. Asimismo, se ha reportado que solo ciertos endófitos logran colonizar los vasos del xilema (58, 65, 66). Esto ocurre por lo general a través de las células no-suberizadas del endodermo en la zona radicular apical y/o en la zona de las raíces basales (donde la banda de Caspary se ve interrumpida). En el xilema, ocurre el transporte de agua, iones y compuestos de bajo peso molecular como azúcares y aminoácidos hacia toda la planta. Diversos trabajos han demostrado que las concentraciones de los compuestos antes mencionados son suficientes para el crecimiento bacteriano (67, 68). Entonces, una vez en estos vasos las bacterias endófitas pueden ser transportadas a distintas secciones de la planta colonizando así nuevos órganos como el tallo y hojas.

Por último, otras formas de ingreso de los endófitos han sido reportados, tal es el caso de las cepas de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar y *Streptomyces galbus* en rododendro, las cuales son capaces de infectar las plantas a través de los estomas (69, 70).

1.3.2 Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal

El ambiente endofítico corresponde a un microambiente localizado dentro de los órganos y los tejidos de la planta, en los cuales las bacterias pueden tener efectos neutros, benéficos o perjudiciales para la misma (41). Una vez que las bacterias endófitas se establecen en el interior de las plantas huésped, las mismas pueden influenciar positivamente en el crecimiento vegetal, así como promover la resistencia a diferentes estreses bióticos y abióticos. Dentro de los géneros previamente mencionados como endófitos, los géneros que han sido reportados como PCV son, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Curtobacterium*, *Arthrobacter* y *Paenibacillus* (71).

Muchos de los cultivos de importancia agronómica (maíz, arroz, caña de azúcar, trigo y sorgo) son capaces de formar asociaciones con bacterias endófitas, siendo los casos más estudiados las cepas diazótroficas pertenecientes a los géneros *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella* (13, 72).

La habilidad de algunos endófitos-diazótrofos de fijar N *in planta* ha sido demostrada mediante estudios de expresión de la enzima nitrogenasa así como mediante el análisis con isótopos marcados (66, 73–76). Por ejemplo, cuando las cepas *G. diazotrophicus* Pal5 y *Herbaspirillum* sp.B501 fueron inoculadas a plantas de caña de azúcar y arroz respectivamente, se comprobó que las mismas contribuían con un 0,6 y 0,14% respectivamente del N total mediante la FBN (75, 76). Sin embargo, mediante la técnica de dilución isotópica de ¹⁵N se ha sugerido que en Brasil, el 70% del N total es atribuido a la FBN en algunas variedades de caña

de azúcares (77); mientras que en Uruguay, se ha reportado un rango entre el 34,8–58,8% dependiendo de la variedad ensayada (78). Estos trabajos demuestran que los endófitos-diazótrofos contribuyen notoriamente al N total de la planta mediante laFBN.

Otro mecanismo PCV descrito en las bacterias endófitas ha sido la producción de la fitohormona AIA. Tal es el caso de las cepas *Erwinia herbicola* 299R y *G. diazotrophicus* (79).

Por lo tanto, es probable que algunas bacterias diazotróficas estimulen el crecimiento de plantas mediante el suministro de N, así como también por la producción de fitohormonas, en particular de AIA(80).

La mayoría de los endófitos que producen AIA, también presentan la actividad ACC desaminasa (81). Estas bacterias pueden usar el ACC como fuente de N, disminuyendo así la producción de ET en las plantas (82). La enzima ACC desaminasa se ha descrito en endófitos PCV tales como *Burkholderia*, *Herbaspirillum* y *Pseudomonas* (83). En el caso de la cepa *B. phytofirmans* PsJN, se confirmó que el mecanismo dePCV involucraba a la ACC desaminasa ya que al eliminarse el gen codificante *acdS*, se observó una disminución de 32% en longitud de las raíces de las plántulas de canola(72).

1.3.3 Bacterias endófitas PCV asociadas a sorgo dulce

El estudio de las bacterias endófitas PCV asociadas a cultivos de interés agronómico, es un campo en constante desarrollo. Entre los cultivos de interés mundial en los que se han desarrollados estos estudios se encuentran el maíz, el trigo, la caña de azúcar y el sorgo dulce. Algunos géneros identificados como asociados pueden ser compartidos entre cultivos, sin embargo no todos los géneros han sido aislados de todos los cultivos (43).

Hasta la fecha los géneros aislados como endófitos a partir de plantas de sorgo dulce e identificados, mostraron pertenecer a los filos Proteobacteria (*Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Herbaspirillum*), Actinobacteria (*Arthrobacter*, *Curtobacterium* y *Cellulomonas*) y Firmicutes (*Paenibacillus*) (14, 43, 71, 84). Particularmente el género *Bacillus* ha sido aislado de suelo de sorgo dulce y reportado como PCV, pero no se ha reportado como endófito (85, 86).

Asimismo, existen numerosos trabajos exitosos en los cuales se ha estudiado la promoción del crecimiento vegetal de plantas de sorgo dulce inoculadas con cepas del género *Azospirillum* spp. lo que ha llevado a su aplicación agronómica como bioinoculante en varios países (87, 88).

1.4 Aproximaciones al estudio de la diversidad bacteriana

La diversidad bacteriana se puede evaluar de dos formas, mediante el estudio de la diversidad de especies o mediante el estudio de la diversidad funcional. La siguiente sección, se focalizará en la primera aproximación mencionada.

Empleando una aproximación cultivable, el conocimiento obtenido sobre la diversidad microbiana y su rol en la naturaleza es muy escaso, debido a que las técnicas basadas en la microscopía y el cultivo tienen un uso limitado para la identificación y clasificación de los microorganismos. Tradicionalmente la taxonomía y clasificación de las bacterias está determinada por su metabolismo, morfología y características fisiológicas; lo cual requiere tener la bacteria pura cultivada.

Con los avances recientes en genómica y las tecnologías de secuenciación, la comunidad bacteriana puede ser analizada mediante técnicas independientes de cultivo iniciándose una nueva era en la ecología microbiana. Análisis moleculares de las comunidades bacterianas ambientales han revelado que sólo el 1% de los microorganismos presentes en la naturaleza pueden ser aislados en cultivos puros (89). Esto puede deberse a que las células no cultivables sean microorganismos filogenéticamente similares a aquellos que si se cultivan, pero en un estado fisiológico diferente (viables pero no cultivables); o que sean filogenéticamente diferentes y no pueden ser cultivadas por los métodos clásicos de cultivo (90, 91).

Para la identificación y caracterización de la gran diversidad microbiana así como para la comprensión de sus interacciones con factores ambientales bióticos y abióticos, han surgido nuevas técnicas moleculares independientes de cultivo tales como la huella genética, la secuenciación masiva, la metagenómica, metaproteómica, metatranscriptómica y proteogenómica (se encuentra en la intersección entre la genómica comparativa y la proteómica) (92).

Una de las preguntas que surgen al momento de estudiar la diversidad genética es el gen a utilizar como indicador, siendo el más comúnmente utilizado el gen *ADNr 16S* debido a que **(i)** es ubicuo, estando presente en todos los procariotas, **(ii)** es estructuralmente y funcionalmente conservado y **(iii)** contiene regiones variables y altamente conservadas (93). Las propiedades filogenéticas de este gen así como la cantidad de secuencias disponibles en las bases de datos hacen ventajoso su uso, sin embargo, la heterogeneidad dentro de las especies bacterianas dificulta el análisis de diversidad a nivel de especie (94).

1.4.1 Estudio de la diversidad bacteriana: Índices de diversidad alfa

La diversidad bacteriana se puede clasificar según la **riqueza o abundancia** de especie (número total de especies presente en la muestra) o según la **heterogeneidad** que combina equitatividad y riqueza (distribución de individuos dentro de las especies) (95).

La diversidad alfa se define como la riqueza específica y equitatividad de una comunidad local. En nuestro caso, la diversidad estructural de la comunidad se calculó por los índices de diversidad alfa Shannon-Weiner (H') y Simpson (1-D) (95). El primer índice indica la biodiversidad específica del ecosistema, es decir, como se distribuye la especie en el ecosistema. Al aumentar el número de especies y/o la uniformidad de sus abundancias proporcionales aumenta el valor del índice de Shannon. Este índice varía entre 0 y no tiene límite superior. $H'=0$, solamente cuando hay una sola especie en la muestra y es máxima cuando las especies están representadas por el mismo número de individuos. Generalmente, el valor máximo suele estar cerca de 5. Por otra parte el índice de Simpson incluye el número de especies presentes en el hábitat y su

abundancia relativa. Este índice representa la probabilidad de que dos individuos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar, pertenezcan a la misma especie (95).

Independientemente de sus limitaciones, el índice de Shannon (H') es un buen índice indicador de la diversidad general; el cual está influenciado por la riqueza y la equitatividad. Este índice es sensible a los cambios en la abundancia de los grupos raros. Por el contrario, el índice de Simpson (1-D) es mayormente afectado por las especies dominantes y su valor puede depender principalmente de la importancia ecológica de los cambios en la abundancia de OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales) dominantes (96).

1.4.2 ¿Porque estudiar la diversidad bacteriana?

Las comunidades microbianas o microbiomas de diversos ambientes, se han estudiado con el fin de poder entender la función ecológica de las mismas. El microbioma asociado a la planta juega un rol determinante en la salud y productividad de la misma, recibiendo una atención considerable en los últimos años. Es por esto que la riqueza de las especies microbianas en el suelo se ha propuesto como indicador de la diversidad de las plantas sobre ese suelo y la productividad de los mismos. Las bacterias asociadas a plantas son también fundamentales en los ciclos biogeoquímicos globales (97, 98). Un ejemplo conocido son las bacterias fijadoras de nitrógeno así como las bacterias que participan en el consumo de elementos traza como el hierro. Asimismo, se ha reportado que la diversidad de los microorganismos presentes en el suelo puede impactar en las poblaciones de microorganismos antagonistas de patógenos de plantas o en las poblaciones de patógenos en sí mismos. También, se ha comprobado que miembros del microbioma rizosférico pueden aliviar el estrés biótico y abiótico en las plantas, proporcionando una alternativa ecológica al mejoramiento de las mismas (98).

Por otra parte, diversos factores como la fertilización química o la variedad de planta, afectan considerablemente el microbioma asociado. Por ejemplo, el microbioma asociado a la rizósfera de arroz, se ve afectado por la fertilización química aplicada al suelo, la cual aumenta el número de bacterias Gram-negativas (99). Estudios sobre los microbiomas rizosféricos asociados a plantas, han revelado distribuciones muy similares de filos microbianos entre sí, mientras que las diferencias entre las variedades de plantas se hacen evidentes al comparar especies y cepas microbianas asociadas a las mismas (100).

1.5 Estudio de la diversidad microbiana mediante técnicas de huella genética

Las técnicas de huella genética generan como resultado un perfil de comunidades microbianas basado en el análisis directo de los productos de PCR amplificados a partir de ADN medioambiental.

Estas técnicas incluyen las técnicas DGGE/TTGE, SSCP, RAPD, ARDRA, T-RFLP, LH-PCR, RISA, y RAPD las cuales producen una huella digital de la comunidad bacteriana basada en el polimorfismo de secuencia o en el polimorfismo de longitud. En general, las técnicas de huella genética son rápidas y permiten el análisis simultáneo de múltiples muestras. Estas técnicas se han ideado para demostrar un efecto en las comunidades microbianas (sean ambientales, antropogénico o estacionales) o diferencias entre las comunidades microbianas, pero no proporcionan identidades taxonómicas directas. Las relaciones entre las comunidades se pueden inferir a partir de estas técnicas con la ayuda de un software adecuado (101).

1.5.1 PCR-DGGE (Gel en Electroforesis de Gradiente Desnaturalizante).

Esta técnica fue inicialmente introducida en la ecología microbiana por Muyzer y colaboradores en el año 1993, siendo muy utilizada hasta la fecha (102). La estrategia general para esta técnica es la obtención de ADN de la muestra, seguido de la amplificación por PCR de los genes de interés y por último del análisis de los productos de PCR mediante DGGE. La separación de los fragmentos de ADN por DGGE se basa en la disminución de la movilidad electroforética de moléculas de ADN parcialmente doble hebra, en geles de poliacrilamida con un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes (mezcla de urea y formamida). Las moléculas de ADN del mismo largo, pero con diferentes secuencias varían en su punto de disociación (T_m) por lo que la migración de las mismas se dará hasta distintas posiciones del gel (Figura 3) (103).

DGGE: Gel en Electroforesis de Gradiente Desnaturalizante

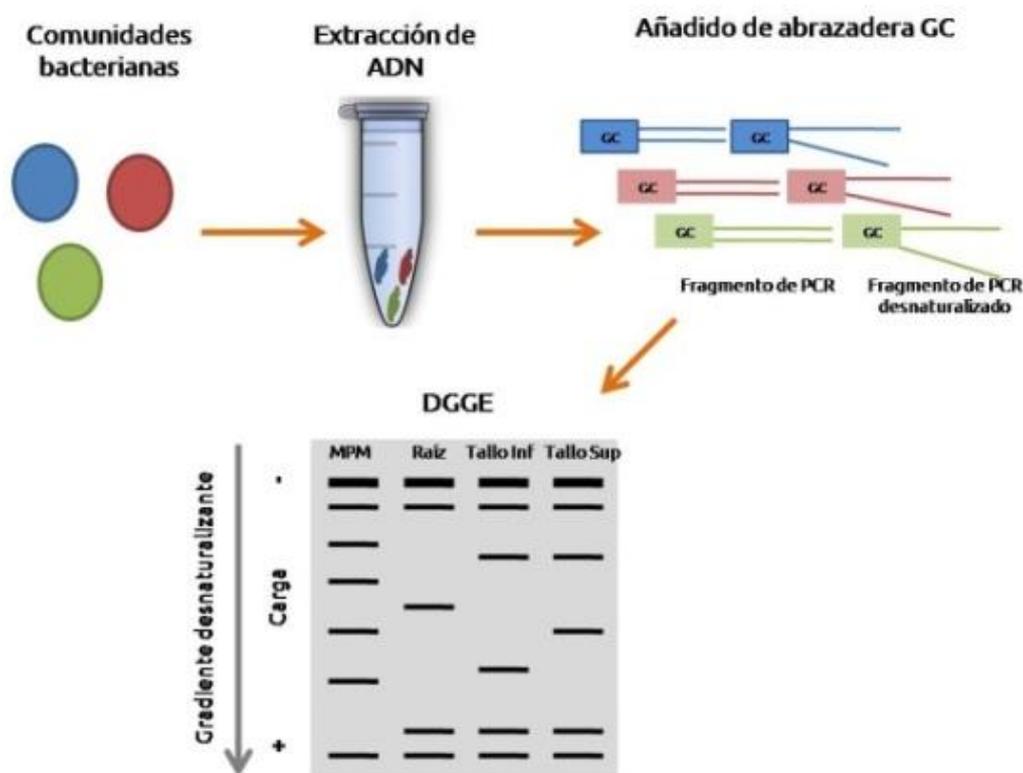


Figura 3: Esquema ilustrativo de la técnica de PCR-DGGE.

En esta técnica, en la PCR se utiliza un cebador con una abrazadera 5'-GC (30-50 nucleótidos), la cual es esencial para evitar que ambas hebras de ADN se disocien completamente en hebras simples durante la electroforesis desnaturalizante. Para determinar las identidades filogenéticas a partir de geles de DGGE, las bandas pueden ser extraídas del gel, el ADN re-amplificados y se determina la secuencia del fragmento (102). Esta estrategia es recomendada para el estudio de la dinámica poblacional en el tiempo o frente a una perturbación.

Hipótesis

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, el interés en la producción de biocombustibles y la utilización del cultivo de sorgo dulce como materia prima para la producción de los mismos, así como la utilización de las bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal como alternativa al uso de la fertilización nitrogenada, nos planteamos como hipótesis para este trabajo:

Existe una comunidad de bacterias endófitas asociada a la variedad de sorgo dulce M81E con capacidad de promover el crecimiento vegetal, la cual se estructura de acuerdo a la fertilización química aplicada.

Capítulo 1: Aislamiento, caracterización y promoción del crecimiento vegetal de probables endófitos bacterianos nativos asociados a sorgo dulce (*Sorghum bicolor*)

Objetivo general:

Contribuir al conocimiento de las bacterias endófitas nativas PCV asociadas al cultivo de sorgo dulce variedad M81E.

Objetivos particulares:

- 1- Obtención de una colección de probables endófitos bacterianos (PEB) nativos, asociados a sorgo dulce cultivado en Uruguay.
- 2- Identificar y caracterizar PEB nativos, buscando en particular posibles mecanismos de infección (PMI) y de PCV.
- 3- Conocer la respuesta de la variedad M81E a la inoculación con PEB seleccionados.

Estrategia:

En primera instancia, se construyó una colección de aislamientos PEB nativos a partir de: 1- plantas trampas preparadas con suelo proveniente de Bella Unión y 2- plantas de sorgo dulce adultas, provenientes de los mismos sitios. Para esto se seleccionaron parcelas con registro de cultivo de sorgo dulce en las cuales no se ha aplicado o se ha aplicado poca fertilización química.

En segunda instancia, se caracterizó la colección, para esto se buscó la presencia de aislamientos con características PCV y PMI *in vitro* mediante el empleo de metodologías microbiológicas, bioquímicas y de biología molecular. Las características PCV estudiadas fueron la producción y regulación de fitohormonas, la capacidad de solubilizar minerales (P, Fe), así como la capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico (FBN). Asimismo en toda la colección se buscó la presencia de aislamientos con PMI tales como las actividades hemicelulolíticas, celulolíticas, lignolíticas y proteolíticas; así como con capacidad de formar biopelículas. Los Aislamientos de interés fueron identificados mediante la secuencia del gen *ADNr 16S* y se estudió su filogenia.

Por último y con la finalidad de determinar la capacidad PCV de aislamientos seleccionados, se realizaron ensayos de respuestas de plantas de sorgo dulce a la inoculación bacteriana, en condiciones *gnotobióticas* y de invernáculo.

2.0 Materiales y Métodos

2.1 Aislamiento de probables endófitos bacterianos (PEB) nativos

Para la obtención de PEB nativos, se realizaron dos aproximaciones. En la primera, se aislaron PEB a partir de raíces y tallos de plantas trampas. Con este fin, se plantaron semillas esterilizadas en la superficie, en macetas conteniendo suelo traído de Bella Unión donde se cultiva sorgo dulce (30°37'56.0"S 57°21'18.0"W). La esterilización de la superficie de las semillas se realizó mediante un enjuague de 5 min con EtOH 70% (v/v), seguido de un lavado con agua desionizada estéril, y una incubación de 15 min en hipoclorito de sodio 4% (v/v), el cual fue enjuagado 4 veces con agua desionizada estéril. Las plantas fueron cosechadas al primer y segundo mes de sembradas separándose las raíces y tallos de las mismas. El procedimiento para esterilizar la superficie de los órganos seleccionados fue el mencionado para las semillas. Se realizaron los controles de esterilización correspondiente en cada caso. Una vez esterilizados los tejidos, 10gr del material a analizar, se maceraron en condiciones estériles con 90 ml de NaCl 0,9% (p/v) a los cuales se le agregó 1 ml de cicloheximida 100mg/ml (dilución -1). A partir de la suspensión obtenida se realizaron diluciones seriadas (10^{-4} y 10^{-5}) sembrándose 100µl de las mismas por triplicado, en placas conteniendo medio de cultivo mínimo LGI y medio de cultivo rico DYGs (ANEXO) (104, 105). Los aislamientos puros obtenidos fueron guardados en tubos viales conteniendo glicerol 25% (v/v) a -80°C.

En la segunda aproximación, se aislaron PEB a partir de tallos y raíces de plantas de sorgo dulce provenientes de parcelas de campo tratadas con o sin fertilizantes químicos. En este caso el proceso de esterilización fue el mismo empleado para las semillas, excepto que se incubó la suspensión 20 min en hipoclorito de sodio 4% (v/v). Asimismo el procedimiento para el aislamiento de cepas individuales de PEB fue el mismo que el utilizado a partir de plantas trampa, con la excepción de que en este caso el medio de cultivo rico utilizado fue el TSA (Difco Laboratories).

Tanto las dos metodologías de aislamiento utilizadas así como el crecimiento en los 3 medios de cultivo, tuvieron como fin la obtención de la mayor diversidad posible de bacterias asociadas al cultivo de sorgo dulce

2.2 Extracción de ADN genómico a partir de cultivos en medio líquido

En este caso, las cepas de interés se crecieron en tubos conteniendo medio de cultivo líquido rico TSB, hasta alcanzar una densidad óptica a 620nm de 1,0 ($D.O_{620} = 1,0$). Tres mililitros del cultivo bacteriano obtenido se centrifugaron 2 veces, durante 10 min a 9.200g. El pellet obtenido se resuspendió en 740µl de Tris 10mM EDTA 1mM (T_{10E1}), se le agregó 20µl de lisozima (100 mg/ml) y se lo incubó por 10 min a 60°C, mezclándose por inversión. A la suspensión obtenida se le agregó 40µl de SDS 10%, luego 8µl de Proteínasa K (10 mg/ml), incubándose durante 1 hora a 37°C. Finalmente, a la suspensión se le agregó 100µl de NaCl 5M y 100µl de CTAB/NaCl previamente calentado a 65°C, incubándose durante 10 min a 65°C.

A la suspensión obtenida se le realizaron 2 extracciones consecutivas con igual volumen de fenol. Entre ambas extracciones se centrifugó durante 20 y 10 min consecutivamente a 13.300g. Posteriormente la fase acuosa obtenida fue sujeta a 2 extracciones con igual volumen de cloroformo ($ChCl_3$). Finalmente, el ADN se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato de amonio 0,33M y 0,6 volúmenes de isopropanol incubándose a

-20°C. Al día siguiente la suspensión se centrifugó durante 30 min a 13.300g, lavándose con 500µl de etanol (EtOH) 70%. El pellet obtenido se secó al vacío durante 20 min mediante speedvack Labconco, resuspendiéndose finalmente en 50µl de TE (99µl T₁₀E₁)+1µl de ARNasa (10mg/ml).

2.3 Extracción de ADN genómico a partir de lisado de colonia

Una colonia de la cepa de interés crecida en placas conteniendo medio sólido TSA, se resuspendió en 100µl de H₂O extra pura estéril. La suspensión obtenida se centrifugó 2 min a 15.600g descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 100µl de NaOH 0,05 M y se incubó 4 min a 100°C seguidos de 2 min en hielo. A la suspensión se le agregó 900µl de H₂O extra pura estéril centrifugándose 2 min a 15.600g. La suspensión de trabajo consistió en los 700µl de la capa superior obtenida.

2.4 Caracterización de la colección

2.4.1 Búsqueda de aislamientos con características PCV en la colección

2.4.1.1 Detección de aislamientos productores de AIA y con actividad ACC desaminasa

Para la determinación de la producción de la hormona ácido indol-3-acético(AIA) por parte de los aislamientos de la colección, se utilizó el método colorimétrico descrito por Sarwary colaboradores (106). Brevemente, toda la colección se creció en microplacas de 2 ml conteniendo medio de cultivo líquido DYGs suplementado con 100 µg/ml de triptófano. A las 72h, la D.O.₆₂₀ fue medida con el fin de normalizar los cultivos, para luego centrifugarlos durante 5 min a 12.000g. Posteriormente 150µl del sobrenadante obtenido fueron incubados en la oscuridad con 100µl de reactivo de Salkowski durante 30 min, y se midió la absorbancia a 540nm. Previamente, se construyó una curva de calibración en el rango de 0 a 100 µM/ml de AIA sintético (78).

Con el fin de detectar aislamientos con actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, toda la colección fué crecida durante 16h en placas de microtitulación conteniendo 2 ml de LGI+N. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 4.000g durante 20min, resuspendiéndose el pellet obtenido en 150µl de LGI-N. De esta suspensión se tomó una alícuota de 5µl, la cual fue inoculada en placas de Petri conteniendo medio de cultivo sólido LGI-N, suplementado con 30mMol/por placa de ACC. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 5 días(107). Aquellas que fueron capaces de crecer en el medio con ACC como única fuente de N se consideraron positivas.

2.4.1.2 Detección de aislamientos solubilizadores de fosfato y productores de sideróforos

Con el fin de detectar aislamientos capaces de solubilizar fosfatos, toda la colección fue crecida en placas conteniendo medio de cultivo sólido GL (ANEXO)(108). Las mismas se incubaron a 30°C durante 5 días. Se consideró positivo a aquellos aislamientos que presentaron un halo transparente alrededor de la colonia. Por otra parte, para la detección de aislamientos con capacidad de producir sideróforos, toda la colección fue crecida en placas conteniendo medio sólido CAS(109). Las mismas se incubaron a 30°C durante 5 días. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (110). Aquellos aislamientos que presentaron un halo amarillo alrededor de la colonia fueron registrados como positivos.

2.4.1.3 Detección de aislamientos diazotófos

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *nifH*

Con el fin de identificar la presencia del gen *nifH*, en los aislamientos de la colección, se utilizaron 2 juegos de cebadores. En el caso en el cual se emplearon los cebadores Eufornif (5'-ATYGTCCGGYTGAYCCSAARGC-3') y Eurevnif (5'-ATGGTGTGGCGGCR TAVAKSGCC-3') (111), se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 2,5µl de buffer de reacción 10X, 1,5µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,0µl de cada cebador 20 µM, 1,0µl de BSA 1%, 0,2µl de Taq polimerasa (5Uµl⁻¹), 4,0µl de lisis bacteriana y H₂O c.s.p. 25µl. Asimismo para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de un min a 94°C, un min a 55°C y un min a 72°C., con un ciclo de extensión final de 15 min a 72°C.

Para el caso en el cual se utilizaron los cebadores PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (112) el programa empleado fue un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 58°C y 30 seg a 72°C. Por último, un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. La mezcla de reacción utilizada fue: 2,5µl de buffer de reacción 10X, 3,0µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de dNTPs 2mM, 1,0µl de cada cebador 20 µM, 1,0µl de BSA 1%, 0,18µl de Taq polimerasa (5Uµl⁻¹), 4,0µl de lisis bacteriana y H₂O c.s.p. 25µl.

El tamaño correcto del amplicón fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9% (p/v) utilizando buffer Tris-Acético-EDTA (TAE). La corrida se realizó durante 1 hora, a 100 V visualizándose los fragmentos al exponer el gel a la luz ultravioleta (U.V.). El agente intercalante utilizado fue el GoodView (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.) en una relación de 1µl/50ml (colorante:agarosa).

CAPACIDAD DE CRECER EN MEDIO DE CULTIVOS SEMISÓLIDOS SIN N

Aquellos aislamientos que presentaron el gen *nifH*, fueron crecidos por duplicado en viales conteniendo los medios semisólidos sin N, LGI, LGI-P y JNFb. Para esto, células crecidas en tubos conteniendo medio TSA líquido (D.O.₆₀₀=1,0), fueron lavadas con buffer PBS (ANEXO), inoculadas en los diferentes viales (1x10⁹ufc/ml) e incubadas a 30°C. Siete días luego de inoculadas se evaluó la presencia de un halo de crecimiento.

2.4.2 Búsqueda de PMI en los aislamientos de la colección

Con el fin de detectar la presencia de aislamientos con PMI tales como las actividades enzimáticas hemicelulasas, celulasas, lignolíticas y proteasas; toda la colección fue crecida en placas conteniendo medio de cultivo TSA suplementado con diferentes precursores. Para la detección de aislamientos con actividad hemicelulosa, el medio de cultivo se suplementó con 0,5% (p/v) de Avicel (Sigma-Aldrich, Alemania), mientras que para el caso en el cual se buscó detectar aislamientos con actividad celulasas, se hicieron 2 ensayos. En el primero, el medio de cultivo se suplementó con 0,2% de celulosa granulada y en el segundo con 0,2% de sal de celulosa (Sigma-Aldrich, Alemania). Asimismo, con el fin de detectar aislamientos con actividad peroxidasa también se realizaron 2 ensayos en los cuales el medio de cultivo se suplementó con 250 mg/l de ABTS ó con 250mg/l de ABTS y 0,1 g/l MnCl₂4H₂O (Sigma-Aldrich, Alemania) para la detección de peroxidasa dependiente e independiente de manganeso respectivamente.

Por último, para la detección de aislamientos con actividad proteolítica el medio de cultivo se suplementó con 5% (p/v) de leche descremada(113–115).

En todos los casos, los aislamientos se incubaron a 30°C durante 5 días momento en el cual se evaluó el crecimiento.

2.4.3 Detección de aislamientos con capacidad de formar biopelícula

El cristal violeta (CV), es una tinción básica la cual se une a moléculas de la superficie bacteriana cargadas negativamente, así como a los polisacáridos de la matriz extracelular por lo que es usado como indicador de la formación de biopelículas (116, 117). Para la detección de las mismas, toda la colección fue crecida en placas de microtitulación de 96 pocillos conteniendo 200µl/pocillo de medio TSB, con agitación durante 16-18 horas a 30°C. Posteriormente la D.O.₆₂₀ de todos los aislamientos fue determinada, igualándose la misma a un valor de entre 0,1-0,2, e incubándose la placa sin agitación durante 48 horas a 30°C. A continuación, el cultivo líquido se descartó y se añadió en cada pocillo 200µl de C.V. 0,1% (p/v) dejándolo actuar durante 20 min. Por último se descartó el CV de los pocillos, solubilizándose el que quedo adherido a la biopelícula con EtOH95%, el cual se transfirió a una nueva placa para la medición de la D.O.₅₇₀ (118).

2.4.4 Caracterización fisiológica de la colección

2.4.4.1 Determinación de la capacidad de la colección de crecer en diferentes rangos de pH

Con el fin de determinar en qué rango de pH son capaces de crecer los aislamientos de la colección, los mismos fueron crecidos en placas de Petri conteniendo medio TSA, cuyo pH se fijó en un rango entre 5 y 8. Las placas se incubaron a 30°C, evaluándose el crecimiento a los 5 días.

2.4.4.2 Determinación de la capacidad de la colección de crecer en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Con el fin de determinarlas fuentes carbonadas y nitrogenadas en las que las PBE asociadas a sorgo dulce son capaces de crecer, toda la colección se creció en placas conteniendo medioLGI al cual se le cambió las fuentes de C y N a evaluar (104). Las fuentes de C ensayadas fueron, Maltosa, Manitol, Etanol, Glucosa, Sucrosa, Malato, Fructosa, Lactosa, Sacarosa, Azúcar cristal, ácido málico, Vinaza y Glicerina. Estas 2 últimas provenientes de desechos industriales. Por otro lado, las fuentes de N ensayadas fueron L-Tirosina, Nitrato de Potasio, L-Aspargina, L-Glutamato, Urea, Sulfato de Amonio y Cloruro de Amonio. Las placas se incubaron a 30°C, durante 5 días momento en el cual se evaluó el crecimiento bacteriano.

2.4.4.3 Determinación de la resistencia intrínseca a antibióticos por la colección de PEB

Para determinar la presencia de resistencias intrínsecas a antibióticos presentes en los aislamientos PEB de la colección, los mismos fueron crecidos en placas conteniendo medio TSA a las cuales se las suplementó con diferentes concentraciones del antibiótico a ensayar (Tabla 1). Para esto se ensayaron antibióticos del grupo de los Aminoglucósidos: Gentamicina (Gm), Kanamicina (Km), Neomicina (Neo), Estreptomycin (Str); del grupo de los Macrólidos: Espectinomicina (Sp); del grupo de las Penicilinas: Ampicilina (Amp); del grupo

de los Polipéptidos: Polymixina B (Poly); del grupo de las Tetraciclinas: Tetraciclina (Tc) y del grupo de las Quinolonas: el Ácidonalidíxico (Nal).

Tabla 1: Concentraciones de antibióticos ensayadas

Antibióticos	Concentración (µg/ml)
Str	2,5, 10, 25, 100
Spc	2,5, 10, 25, 100
Km	4,10,40,100
Tc	2,5, 10, 25, 100
Gm	2,5, 10, 25, 100
Nm	1,25,2,5,12,5,25
Amp	2,5,10,40,100
Poly	5,10,50,100
Nal	5,10,50,100

2.5 Identificación de aislamientos de interés

2.5.1 Caracterización genética de aislamientos seleccionados mediante ERIC-PCR

Para determinar la diferenciar entre aislamientos que contaron con la presencia del gen *nifH* pertenecientes a la colección, se utilizó la técnica de REP-PCR con los cebadores ERIC 1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGT GAGCG-3') (119). Como molde se empleó el ADN de toda la colección extraído por el método de lisis celular (punto 2.2.1). La mezcla de reacción utilizada fue: 2,5µl de buffer de reacción 10X, 2,0µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,5µl de cada cebador 25 µM, 1,0µl de BSA 1%, 1,25µl de DMSO 100%, 0,3µl de Taq polimerasa (5Uµl⁻¹), 2,0µl de la lisis bacteriana y H₂O c.s.p. 25µl. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo dedesnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C y 6 min a 65°C. Por último se realizó unciclo de extensión final de 16 min a 65°C. Cada aislamiento fue analizado por duplicado.

Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE), durante 3 horas a 80 V visualizándose los mismos al exponer el gel a luz U.V. El agente intercalante utilizado fue el GoodView (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.) en una relación de 1µl/50ml (colorante:agarosa). Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados con el programa GelComparII6.5 (AppliedMaths NV.). La similitud entre aislamientos se expresó a través del coeficiente de Dice y el análisis de agrupamiento se realizó mediante el método de UPGMA con una similitud de 80%.

2.5.2 Amplificación del gen *ADNr 16S*

El gen marcador *ADNr 16S*, se empleó para la identificación a nivel de género de aquellos aislamientos seleccionados en base a sus características PCV y PMI. Los cebadores universales 27f (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')(120) fueron utilizados para la

reacción de amplificación de PCR. Para ello se utilizó la siguiente mezcla de reacción 2,5µl de buffer de reacción 10X, 1,5µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de dNTPs 2mM, 2,0µl de cada cebador 20 µM, 1,0µl de BSA 1%, 0,2µl de Taq polimerasa (5Uµl⁻¹), 4,0µl de lisis bacteriana y H₂O c.s.p. 25µl. Mientras que para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de un min a 94°C, un min a 55°C y un min a 72°C., con un ciclo de extensión final de 15 min a 72°C.

El tamaño correcto del amplicón fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9% (p/v) utilizando buffer Tris-Acético-EDTA (TAE). La corrida se realizó durante 1 hora, a 100 V visualizándose los fragmentos al exponer el gel a la luz ultravioleta (U.V.). El agente intercalante utilizado fue el GoodView (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.) en una relación de 1µl/50ml (colorante:agarosa).

2.5.3 Secuenciación de los amplicones del gen *ADNr 16S*

Los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación del gen *ADNr 16S* se enviaron a MacroGen Inc. Corea para su purificación y posterior secuenciación; la misma se realizó con ambos cebadores utilizados en cada caso. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012) (HeracleBioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>) siendo cada una de 1400 pares de bases aproximadamente y comparadas mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.5.4 Análisis filogenético de aislamientos seleccionados de la colección

La secuencia del gen *ADNr 16S* obtenidas fueron utilizadas para realizar estudios filogenéticos. Para esto, las mismas se alinearon con la base de datos de SILVA (121) construyéndose el árbol filogenético utilizando el algoritmo Neighbour Joining, se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas con el programa ARB (122).

2.6 Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas y de invernáculo

Aislamientos seleccionados de acuerdo a sus características PCV y PMI *in vitro*, fueron ensayados como inoculantes en plantas de sorgo dulce de la variedad M81E en 3 condiciones diferentes: **(1)** gnotobióticas en el cuarto de plantas; **(2)** en las mismas condiciones que el anterior con la variante de que a los 15 días los plantines se pasaron a macetas conteniendo arena:vermiculita (2:1) como soporte, siendo trasladadas al invernáculo; y **(3)** en condiciones de invernáculo empleando suelo:arena (2:1) como soporte, con suelo proveniente de la zona de Bella Unión.

En todos los casos, las semillas fueron esterilizadas en la superficie siguiendo el protocolo descrito (2.1), inoculadas con una suspensión bacteriana de 1×10^9 ufc/ml del aislamiento de interés y pre-germinadas en placas de agar-agua 0,8% (p/v) a 30°C durante 48 h.

En los tres ensayos un tratamiento inoculado con la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 fue utilizado como referencia (87). Como control negativo se emplearon plantas de sorgo dulce sin inocular ni fertilizar. En todos los casos se utilizaron 10 réplicas por tratamiento.

En los ensayos **(1)** y **(2)**, 4 semillas pre-germinadas fueron transferidas a frascos conteniendo 40 ml de medio Jensen líquido (123) utilizando como soporte bolitas de polipropileno. Los ensayos se realizaron en condiciones de luz y temperaturas controladas: fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 25°C. En el ensayo gnotobiótico-invernáculo (ensayo 2), a los 15 días las plantas se trasladaron al invernáculo re-inoculándose con la misma suspensión bacteriana. Una vez en condiciones de invernáculo, este ensayo fue regado con agua corriente y cada 2 semanas con medio Jensen +N, dado que no todas las cepas ensayadas presentaron capacidad FBN.

En el ensayo **(3)**, los plantines fueron inoculados nuevamente a los 30 días luego de la primera inoculación.

En el caso del ensayo **(1)**, las plantas se cosecharon a los 60 días midiéndose la altura así como el peso seco radicular y aéreo, mientras que en los ensayos **(2)** y **(3)** a los 60 y 90 días post segunda inoculación respectivamente se realizaron las medidas de diámetro y altura del tallo además del peso seco radicular y aéreo.

2.6.1 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Infostat. Aquellos que presentaron diferencia significativa, se les realizó el test de LSD Fisher ($p < 0.10$) (124).

3.0 Resultados

3.1 Aislamiento, caracterización e identificación de PEB nativos asociados a la variedad de sorgo dulce M81E.

3.1.1 Construcción de la colección de PEB asociadas a sorgo dulce.

Uno de los objetivos particulares planteados, fue la obtención de una colección de PEB nativos asociada a plantas de sorgo dulce de la variedad M81E. Para ello se emplearon 2 aproximaciones, en la primera se utilizó como material de partida plantas trampa crecidas con tierra proveniente de Bella Unión donde regularmente se planta sorgo dulce; mientras que en la segunda se utilizó el material vegetal traído directamente de campo colectado a partir de parcelas que presentaron concentraciones de fertilizante contrastantes (alta y baja). Los PEB obtenidos a partir de plantas trampa se aislaron a los 30 y 60 días post siembra.

Aplicando ambas metodologías de aislamiento, se construyó una colección de PEB nativos con 188 aislamientos, provenientes de raíces y tallos de plantas de plantas de sorgo dulce (142 y 44 respectivamente), así como de semilla (2). Dentro de estas, 106 fueron aisladas de plantas trampa (en los medios de cultivo LGI y DYGs), mientras que 82 lo fueron de material de campo (medio de cultivo TSA).

Tabla 2: Número de PEB nativos obtenidos según órgano o medio de cultivo empleado

Metodología de aislamiento	Medio de cultivo	Tallo	Raíz	Semilla	Total
Plantas trampa	LGI	5	38	1	44
	DYGs	10	51	1	62
Material de campo	TSA	29	53	-	82
Total		44	142	2	188

Asimismo cuando se enumeran los aislamientos de acuerdo al órgano del cual se aislaron o el medio de cultivo utilizado (Tabla 2), se observa que la cantidad de aislamientos provenientes de las raíces (142), fue mayor en todos los medios de cultivo empleados, en comparación con los tallos (44) y las semillas (2). Por otra parte, y en referencia al medio de cultivo empleado, se observa que la mayor cantidad de aislamientos morfológicamente diferentes provinieron de los medios ricos no definidos TSA (82) y DYGs (62) en comparación con el medio de cultivo mínimo y definido LGI (44).

3.2.2 Caracterización de la colección de PEB

3.2.2.1 Búsqueda de características PCV y PMI en los aislamientos de colección

Características probablemente involucradas en la PCV así como PMI fueron buscados en todos los aislamientos de la colección. Las características PCV buscadas fueron: la capacidad de solubilizar fosfato, de producir sideróforos, de producir la fitohormona AIA, la capacidad FBN, así como la presencia de actividad ACC-desaminasa. Por otra parte los PMI buscados fueron: las actividades celulasas, hemicelulasas, peroxidadas y proteasas, así como la capacidad de formar biopelículas. Asimismo y con el fin de estudiar los

distintos requerimientos metabólicos de las cepas en estudio, se realizaron ensayos para determinar la capacidad de la colección de crecer en diferentes fuentes de C, N, rango de pH y antibióticos.

De los 188 aislamientos ensayados, 33 y 22 fueron capaces de producir AIA y sideróforos respectivamente, 25 de solubilizar fosfato, mientras que 130 presentaron la actividad ACC-desaminasa. Por otra parte, 72 aislamientos dieron positivos para la presencia del gen *nifH*. Los mismos fueron crecidos en viales conteniendo medios de cultivo semisólido LGI, LGI-P y JNFb sin N, observándose que 46 aislamientos fueron capaces de crecer formando una película la cual es característica de los organismos diazótrofos. En cuanto a las enzimas relacionadas a la infección, los resultados mostraron la presencia de aislamientos en la colección con actividad hemicelulasa, celulasa y proteasa (3, 5 y 24 respectivamente), mientras que 41 aislamientos presentaron la capacidad de formar biopelícula en las condiciones ensayadas (Tabla 3).

A modo de resumen, en la figura 4 se muestra el porcentaje de aislamientos que presenta al menos 1 característica PCV. Como se observa, la colección obtenida tiene un amplio espectro de estas características las cuales le dan un potencial biotecnológico muy importante.

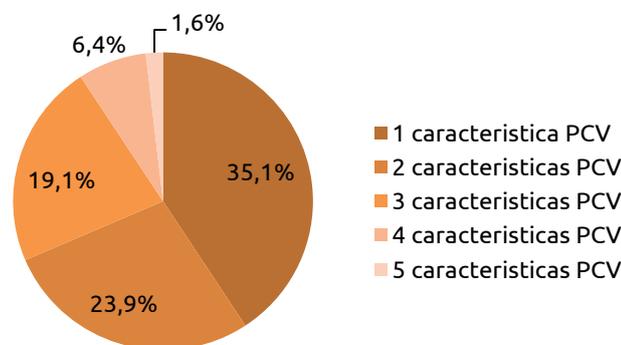


Figura 4: Porcentaje de aislamientos PBE asociados a sorgo dulce con una o más características promotoras del crecimiento vegetal.

Por otra parte en la Tabla 3, se presenta el listado de 45 aislamientos seleccionados de acuerdo a sus características PCV o PMI, para su identificación a nivel de género mediante la secuenciación del gen *ADNr 16S*. En la misma se presenta también el grupo ERIC así como el género al cual pertenecen.

Tabla 3: Listado de 45 aislamientos seleccionados de la colección en el que se presentan las características PCV, PMI, así como el género bacteriano y el grupo ERIC al que pertenecen.

Aislamiento	Grupo ERIC	Identificación ^a	Fitoestimulación ^b		Biofertilización ^c				Infección ^d			
			AIA	ACC	<i>nifH</i>	CP	Ca ₃ PO ₄	SID	CE	HC	PROT	Biopelícula
UYSB01	2	<i>Ralstonia</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
UYSB02	2	<i>Ralstonia</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
UYSB03	4	<i>Staphylococcus</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
UYSB04	3	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
UYSB05	2	<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UYSB06	2	<i>Bacillus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UYSB07	2	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
UYSB08	1	<i>Kocuria</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UYSB09	1	<i>Achromobacter</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UYSB11	2	<i>Rhizobium</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
UYSB12	2	<i>Rhizobium</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UYSB13	2	<i>Rhizobium</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
UYSB14	2	<i>Ralstonia</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UYSB15	2	<i>Bacillus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UYSB17	2	<i>Rhizobium</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
UYSB18	3	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
UYSB19	2	<i>Paenibacillus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
UYSB20	2	<i>Bacillus</i>	-	+	+	ND	-	-	-	-	-	-
UYSB21	2	<i>Pantoea</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
UYSB22	2	<i>Enterobacter</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
UYSB23	2	<i>Rhizobium</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
UYSB25	2	<i>Rhizobium</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UYSB26	5	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
UYSB27	2	<i>Paenibacillus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
UYSB28	2	<i>Brevibacillus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
UYSB29	2	<i>Brevibacillus</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
UYSB30	2	<i>Acidovorax</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
UYSB32	2	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
UYSB33	2	<i>Stenotrophomonas</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
UYSB34	2	<i>Enterobacter</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
UYSB35	2	<i>Herbaspirillum</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
UYSB36	5	<i>Brevibacillus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UYSB37	5	<i>Pseudomonas</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
UYSB38	2	<i>Pantoea</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
UYSB39	2	<i>Pantoea</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
UYSB40	2	<i>Stenotrophomonas</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
UYSB41	5	<i>Acinetobacter</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
UYSB42	2	<i>Acinetobacter</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
UYSB43	3	<i>Pantoea</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
UYSB45	3	<i>Pantoea</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UYSB46	1	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
UYSB47	2	<i>Pantoea</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
UYSB48	3	<i>Serratia</i>	ND	ND	+	ND	ND	-	ND	ND	+	ND

^aIdentificación taxonómica obtenida en base a la similitud del gen *ADNr16S* (1400 pares de bases). ^bAIA: producción de ácido indol-3-acético; ACC: actividad aminociclopropane-1-arboxylate desaminase. ^cgen de la subunidad nitrogenasa (*nifH*) detectado por PCR; CP: crecimiento en película; Ca₃PO₄: solubilización de fosfato cálcico inorgánico; SID: producción de sideróforos. ^dCE: actividad exo-celulasa; HC: actividad hemicelulasa; PROT: actividad proteasa.

Por otra parte, los resultados del estudio de la capacidad de la colección de crecer en distintas fuentes de C y N mostraron una amplia versatilidad metabólica de la misma (Figura 5). Es así que entre el 92-97% de los aislamientos fueron capaces de crecer en fructosa, lactosa, glucosa, maltosa y azúcar cristal; entre el 71-86% lo hicieron en ácido málico, manitol y glicerina, mientras que solamente entre el 19-38% de los aislamientos fueron capaces de crecer en EtOH, ácido pirúvico y vinaza como única fuente de C (Figura 5a).

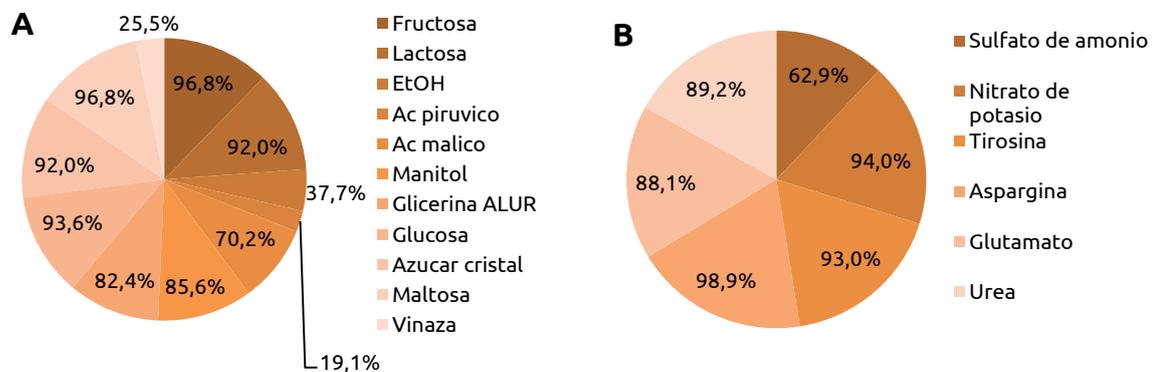


Figura 5: Porcentaje de los aislamientos PBE con crecimiento en las distintas fuentes de (A)C y (B)N.

Con respecto a las fuentes de N ensayadas, entre el 93-99% de los aislamientos fueron capaces de crecer en L-tirosina, KNO_3 y L-aspargina, mientras que entre el 88-89% lo hicieron en L-Glutamato y urea respectivamente, el 63% en $(NH_4)_2SO_4$, no observándose crecimiento cuando se ensayó NH_4Cl como única fuente de N (Figura 5b)

Por otra parte, en la figura 6 se muestran los resultados del estudio de la presencia de aislamientos con resistencia intrínseca a diferentes antibióticos en la colección. En este ensayo se evaluaron diferentes concentraciones de antibióticos presentándose la resistencia observada en la mayor concentración. Como se observa en la tabla 1 un rango de aislamientos de entre 96-100% fueron capaces de crecer en Spc, Nm y Amp; entre 77-89% fueron capaces de crecer en presencia de Str, Tc y Gm; mientras que entre 43-66% lo fueron en presencia de Km, Poly B y Nal (Figura 6).

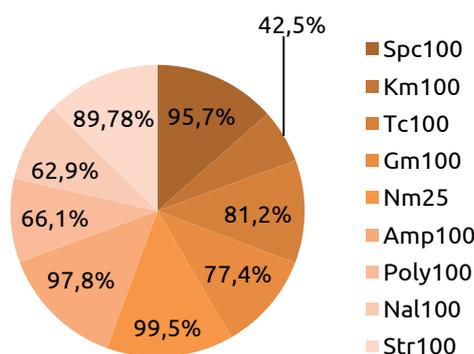


Figura 6: Porcentaje de aislamientos de la colección PBE asociadas a sorgo dulce que presentaron resistencia a los distintos antibióticos ensayados en su máxima (25 y 100µg/ml)

Los resultados mostraron un alto número de aislamientos con resistencias intrínsecas a los antibióticos ensayados. Sorprendentemente ningún aislamiento fue sensible a todos los antibióticos; un único aislamiento fue resistente a neomicina y sensible al resto de los antibióticos en las concentraciones máximas

ensayadas. Asimismo se observó multirresistencia a diversos antibióticos; la máxima multirresistencia obtenida fue a 8 antibióticos distintos (59 aislamientos), seguido en número por resistencia a 7 antibióticos distintos (44 aislamientos) (Figura 7).

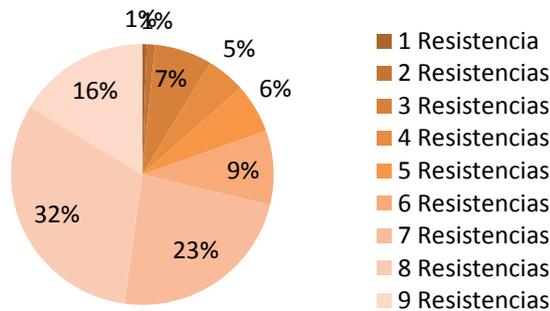


Figura 7: Porcentaje de aislamientos con una o más resistencia a los 9 antibióticos ensayados en su máxima concentración.

3.2.2.1 Estudio de la diversidad genómica entre los aislamientos PEB mediante la técnica de ERIC-PCR

Con el fin de estudiar la similitud entre los aislamientos pertenecientes a la colección, las imágenes de los geles en los cuales se analizaron los amplicones obtenidos a partir de la técnica ERIC-PCR, fueron analizadas con el programa GelComparII 6.5 (Applied Maths NV). La similitud entre los aislamientos se expresó a través del coeficiente de Dice (125) y el análisis de agrupamiento se realizó mediante el método de UPGMA (126) con una similitud de 80% (Figura 8).

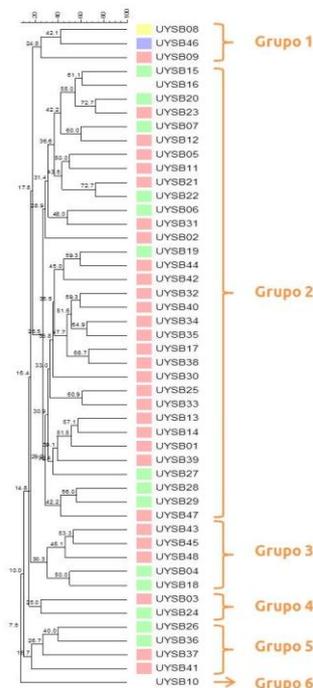


Figura 8: Dendrograma obtenido a partir del análisis de imagen de los geles obtenidos a partir de la reacción de ERIC-PCR. Las imágenes obtenidas, se analizaron mediante la correlación de Dice y el método UPGMA. Los códigos de colores representan los distintos Filos obtenidos por identificación del gen *ADNr 16S*. En amarillo, Actinobacteria; en violeta Bacteroidetes; en rosado Proteobacteria y por último en verde Firmicutes.

En la figura 8, se observa el dendograma obtenido a partir del análisis de los aislamientos descritos en la tabla 4. Si se toma en cuenta una similitud de 80% entre los aislamientos, los resultados muestran la formación de 6 grupos. Con ese porcentaje de similitud, se observa que los grupos formados no siguen un patrón de agrupamiento ni por Filos bacterianos ni por género.

3.2.3 Identificación de PEB nativos seleccionados de la colección

Un grupo de aislamientos de la colección fueron seleccionados según sus características PCV y PMI, con el fin de determinar su identidad. Para ello, 45 aislamientos fueron sujetos a amplificación mediante PCR del gen *ADNr 16S* y los amplicones obtenidos fueron secuenciados. Las secuencias fueron editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x siendo las misas de 1400 pares de bases, comparadas con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLAST. Los resultados mostraron la presencia de 14 géneros pertenecientes a 4 Filo distintos dentro del Dominio *Bacteria* en la colección (Tabla 5 y 6).

Tabla 4: Porcentaje de Filos obtenidos a partir de los aislamientos PEB seleccionados, mediante secuenciación del gen *ADNr 16S*.

Filo	Porcentaje
Bacteroidetes	2,2%
Actinobacteria	2,2%
Firmicutes	30,4%
Proteobacteria	65,2%

Asimismo, los aislamientos seleccionados y su identificación se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Similitud de la secuencia nucleotídica de 1400 pares de bases del gen *ADNr 16S* en comparación con el mejor candidato de la base de datos NCBI, de los PEB nativos asociados a la variedad comercial M81E de sorgo dulce.

Aislamiento	Numero de acceso en la base de datos del NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
UYSB01	NR_043152.1	<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27511	100%	0.0	99%
UYSB02	NR_043152.1	<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27511	99%	0.0	99%
UYSB03	NR_036904.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	0.0	99%
UYSB04	NR_074290.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	99%	0.0	98%
UYSB05	NR_028912.1	<i>Enterobacter cloacae</i> 279-56	100%	0.0	98%
UYSB06	NR_024695.1	<i>Bacillus niacin</i> IFO15566	99%	0.0	99%
UYSB07	NR_043774.1	<i>Bacillus acidiceler</i> CBD 119	99%	0.0	99%
UYSB08	NR_026451.1	<i>Kocuriapalustris</i> TAGA27	100%	0.0	100%
UYSB09	NR_025686.1	<i>Achromobacterspanius</i> LMG 5911	100%	0.0	98%
UYSB11	NR_074266.1	<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	100%	0.0	99%
UYSB12	NR_074266.1	<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	100%	0.0	99%
UYSB13	NR_041396.1	<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM 12048	100%	0.0	99%
UYSB14	NR_043152.1	<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27511	99%	0.0	99%
UYSB15	NR_043242.1	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	100%	0.0	99%
UYSB17	NR_041396.1	<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM 12048	100%	0.0	98%

Aislamiento	Numero de acceso en la base de datos del NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
UYSB18	NR_043401.1	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418	100%	0	99%
UYSB19	NR_040853.1	<i>Paenibacillus pabuli</i> HSCC 492T	99%	0.0	99%
UYSB20	NR_029002.1	<i>Bacillus drentensis</i> IDA1967	100%	0.0	99%
UYSB21	NR_043883.1	<i>Pantoeadisversa</i> LMG2603	100%	0.0	99%
UYSB22	NR_028912.1	<i>Enterobacter cloacae</i> 279-56	100%	0.0	98%
UYSB23	NR_041396.1	<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM 12048	100%	0.0	99%
UYSB25	NR_042687.1	<i>Rhizobium alamii</i> GBV016	99%	0.0	99%
UYSB26	NR_074290.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	100%	0.0	99%
UYSB27	NR_024759.1	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> DS-1	99%	0.0	99%
UYSB28	NR_037005.1	<i>Brevibacillus laterosporus</i> IAM 12465	100%	0.0	99%
UYSB29	NR_037005.1	<i>Brevibacillus laterosporus</i> IAM 12465	100%	0.0	99%
UYSB30	NR_102856.1	<i>Acidovorax avenae</i> ATCC 19860	100%	0.0	99%
UYSB32	NR_041577.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	100%	0.0	99%
UYSB33	NR_041577.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	100%	0.0	99%
UYSB34	NR_028912.1	<i>Enterobacter cloacae</i> 279-56	99%	0.0	98%
UYSB35	NR_028656.1	<i>Herbaspirillum huttiense</i> 7-2	100%	0.0	99%
UYSB36	NR_037005.1	<i>Brevibacillus laterosporus</i> IAM 12465	100%	0.0	99%
UYSB37	NR_074596.1	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	100%	0.0	99%
UYSB38	NR_103927.1	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	100%	0.0	99%
UYSB39	NR_103927.1	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	99%	0.0	95%
UYSB40	NR_041577.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	99%	0.0	99%
UYSB41	NR_026208.1	<i>Acinetobacter junii</i> DSM 6964	100%	0.0	99%
UYSB42	NR_102814.1	<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1	100%	0.0	99%
UYSB43	NR_043883.1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG2603	98%	0.0	98%
UYSB45	NR_043883.1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG2603	96%	0.0	99%
UYSB46	NR_036872.1	<i>Chryseobacterium formosense</i> CC-H3-2	100%	0.0	98%
UYSB47	NR_043883.1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG2603	100%	0.0	92%
UYSB48	NR_102509.1	<i>Serratia marcescens</i> WW4	100%	0.0	99%

Todos los géneros bacterianos presentados en la tabla 5, que pertenecen a los PEB nativos, están relacionados a diferentes géneros bacterianos previamente descritos como asociados a plantas.

Los géneros identificados pertenecen a la clase Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria; así como a los filos, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (*Chryseobacterium*).

Como muestra la tabla 5, las Alfaproteobacteria se encontraron representadas por los géneros *Agrobacterium* (UYSB11, UYSB12, UYSB13, UYSB17 y UYSB23) y *Rhizobium* (UYSB25). Mientras que las Betaproteobacteria estuvieron representadas por los géneros *Acidovorax* (UYSB30), *Achromobacter*, (UYSB09), *Herbaspirillum* (UYSB35) y *Ralstonia* (UYSB01, UYSB02 y UYSB14). Por su parte las Gamaproteobacteria estuvieron bien representadas en la colección identificándose los géneros *Acinetobacter* (UYSB41 y UYSB42), *Enterobacter* (UYSB05, UYSB22 y UYSB34), *Pantoea* (UYSB21, UYSB43,

UYSB38, UYSB39, UYSB45 y UYSB47), *Pseudomonas* (UYSB37), *Stenotrophomonas* (UYSB32, UYSB33, UYSB40) y *Serratia* (UYSB48).

El filo Firmicutes también tuvo un número alto de representantes incluyendo los géneros *Brevibacillus* (UYSB28, UYSB29 y UYSB36), *Bacillus* (UYSB04, UYSB06, UYSB07, UYSB15, UYSB18, UYSB20 y UYSB26), *Paenibacillus* (UYSB19, UYSB27) y el género *Staphylococcus* (UYSB03).

Por último los filos Actinobacteria y Bacteroidetes estuvieron representados por un único aislamiento cada uno perteneciente a los géneros *Kocuria* y *Chryseobacterium* (UYSB08 y UYSB46 respectivamente).

Para inferir las relaciones filogenéticas entre las cepas estudiadas y entre las cepas de referencias, se construyó un árbol filogenético en base a la secuencia del gen *ADNr 16S*. Para ello, las secuencias se alinearon utilizando la base de datos de SILVA (121) y el posterior árbol se construyó con el programa ARB (122).

Junto al filo Firmicutes, la clase Gammaproteobacteria fueron los 2 grupos que presentaron más representantes (Figura 9). Como se observa, las Gamaproteobacteria se dividieron en 2 grandes grupos, por un lado el representado por los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* y *Serratia* y por el otro el representado por los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Asimismo, el grupo de las *Pantoea* se dividió en 2 ramas, por un lado se agruparon, los aislamientos UYSB39, UYSB43 y UYSB45. Los dos primeros no se agruparon con ninguna cepa de referencia, mientras que el aislamiento UYSB45 se relacionó con la cepa de referencia *P. dispersa*^T. En la otra rama del grupo de las *Pantoeas*, el aislamiento UYSB38 se agrupó con las cepas de referencia *P. stewartii*^T y *P. ananatis*^T. En el caso de los aislamientos pertenecientes al género *Enterobacter*, los mismos formaron un grupo robusto que incluye los aislamientos UYSB05, UYSB22 y UYSB34 relacionados con las cepas referencias *E. oryzae*^T y *E. radicincitans*^T. Mientras que compartiendo el mismo nodo, el aislamiento UYSB48 se agrupó con un bootstrap de 100 con la cepa de referencia *Serratiamarcescens*^T. El grupo de *Pseudomonas* también estuvo representado en la colección por el aislamiento UYSB37, el cual se agrupó con las cepas referencia *P. fulva*^T y *P. putida*^T. Asimismo, el grupo de los *Acinetobacter* estuvo representado por el aislamiento UYSB41, agrupándose con la cepa referencia *A. parvus*^T y UYSB42 con *A. pittii*^T y *A. calcoaceticus*^T. Por último, los aislamientos pertenecientes al género *Stenotrophomonas* UYSB32 y UYSB33, se agruparon en un nodo separado de los grupos antes mencionados pero relacionados con la cepa de referencia *S. maltophilia*^T. Por su parte, la clase Alphaproteobacteria (Figura 9) estuvo representada por los aislamientos UYSB11, UYSB12, UYSB13 y UYSB25, los cuales pertenecieron al género *Rhizobium* (Tabla 5). Estos se dividieron en 2 ramas, en una de ellas el aislamiento UYSB13 se agrupó junto a la cepa referencia *R. radiobacter*^T, mientras que los aislamientos que compartieron el mismo nodo, UYSB11 y UYSB12, se agruparon con la cepa referencia *R. pusense*^T. En la otra rama de los rizobios, el aislamiento UYSB25 se agrupó con la cepa de referencia *R. mesosinicum*^T. El grupo de las Betaproteobacteria, formó 3 ramas, las cuales definieron a los grupos de los géneros, *Ralstonia*, *Herbaspirillum* y *Achromobacter*. En una de las ramas se ubicó el aislamiento UYSB09, perteneciente a el género *Achromobacter*, el cual no se agrupó con ninguna de las cepas referencia, pero si en el mismo nodo que las cepas de referencia *A. xylosoxidans*^T y *A. marplatensis*^T. En la otra rama, se ubicaron los aislamientos UYSB01 y UYSB02 los cuales se agruparon con las cepas de referencia *R. pickettii*^T (Figura 9). Por último, en la tercer rama se ubicó el aislamiento UYSB35, el cual comparte nodo con las cepas referencias *H. seropedicae*^T y *H. frisingensi*^T.

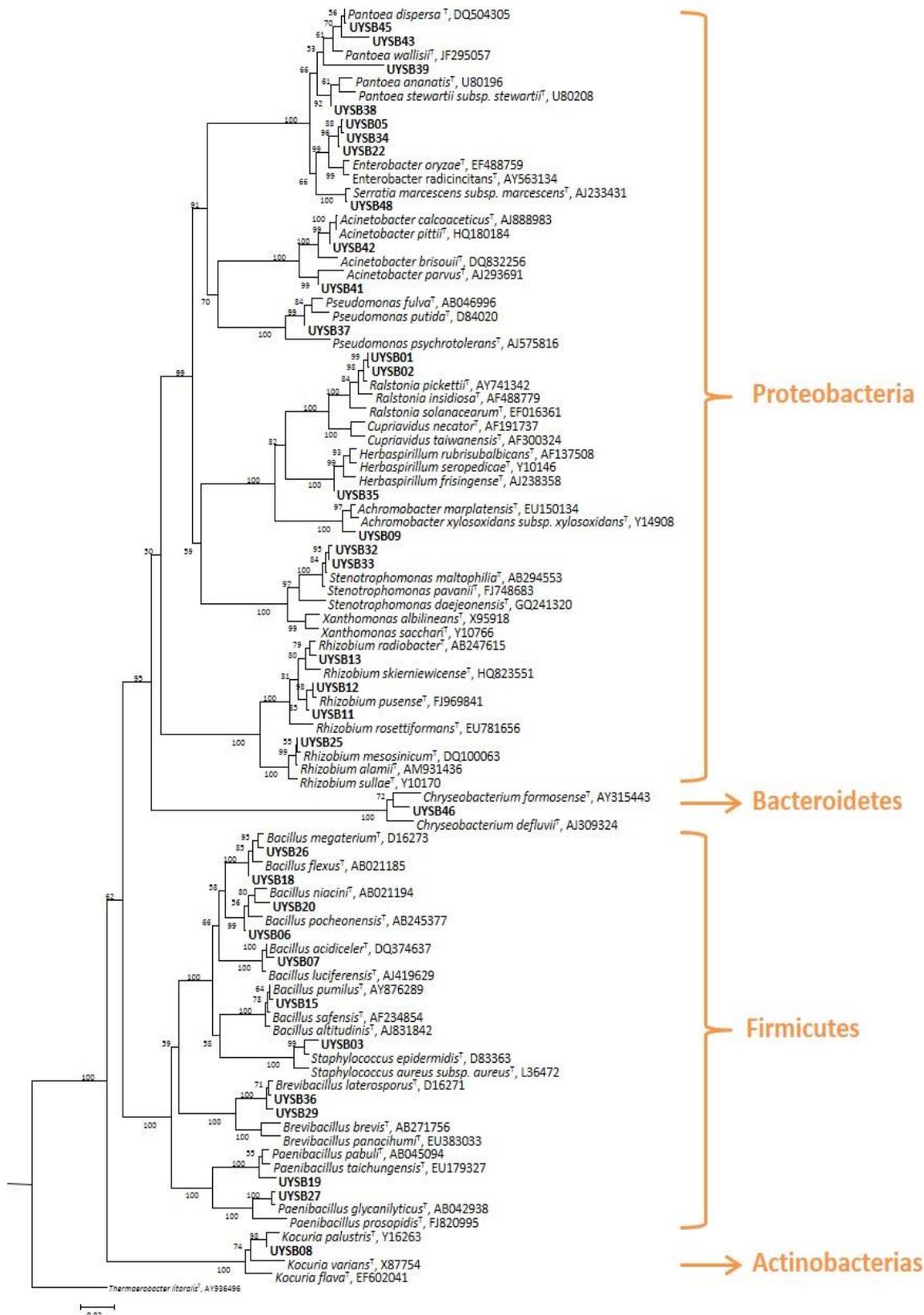


Figura 9: Filogenia construida a partir de la secuencia del gen *ADNr 16S* de los aislamientos seleccionados. El árbol filogenético muestra a las asociaciones de 34 de los aislamientos obtenidos de sorgo dulce. Las secuencias se alinearon utilizando la base de datos de SILVA (121) y el árbol se construyó con el programa ARB (122) y el algoritmo NeighbourJoining. Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas. La escala representa el número de sustituciones de nucleótidos por base y como grupo referencial externo se utilizó *Thermarobacter litoralis*.

Como se mencionó, se obtuvieron un gran número de secuencias pertenecientes al Filo Firmicutes en la colección de PEB asociados a sorgo dulce (Figura 9). Dentro de este filo, el árbol filogenético formó 2 grandes ramas, las cuales se subdividen a su vez en la 4 ramas que representaron a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*. El género *Bacillus* estuvo representado por los aislamientos UYSB06, UYSB07, UYSB15, UYSB18, UYSB20 y UYSB26. El aislamiento UYSB26 se agrupó junto con la cepa de referencia *B. megaterium*^T, mientras que la cepa UYSB18, quien compartió el mismo nodo, se agrupó aparte y sin ninguna cepa de referencia. Por su parte el aislamiento, UYSB20 se agrupó junto con la cepa de referencia *B. niacin*^T, mientras que el aislamiento UYSB06, el cual compartió el mismo nodo que la cepa mencionada, se agrupó sola sin ninguna cepa de referencia. Asimismo el aislamiento UYSB07 se agrupó en otra rama diferente, con la cepa de referencia *B. acidicer*^T; mientras que el aislamiento UYSB15 lo hizo en otra rama pero con la cepa de referencia *B. pumilus*^T. Por otro lado, el único representante del género *Staphylococcus*, el aislamiento UYSB03, se agrupó con la cepa referencia *S. epidermidis*^T. Los aislamientos UYSB29 y UYSB36 pertenecientes al género *Brevibacillus* (Tabla 6), se agruparon junto a *B. laterosporus*^T. Por último y en grupo distinto, el género *Paenibacillus* se dividió en 2 ramas, por un lado se agrupó el aislamiento UYSB19 junto a las cepas de referencia *P. pabuli*^T y a *P. taichungensis*^T y por otro UYSB27 junto a la cepa *P. glycanilyticus*^T. En el caso del único aislamiento perteneciente al Filo Actinobacteria, UYSB08, el mismo se agrupó junto a la cepa *K. palustris*^T; así como el único aislamiento perteneciente al Filo Bacteroidetes UYSB46, lo hizo junto a la cepa referencia *C. formosense*^T (Figura 9).

3.2 Promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas y de invernáculo por parte de PEB seleccionadas

Con el fin de evaluar la respuesta de las plantas de sorgo a la inoculación con distintos aislamientos bacterianos, seleccionados según sus géneros y características PCV *in vitro*, se realizaron 3 ensayos diferentes. Los aislamientos utilizados como inoculantes y sus características se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Cepas utilizadas como inoculantes en los ensayos de promoción del crecimiento vegetal de plantas de sorgo dulce (variedad M81E) con sus características PCV y PMI correspondientes así como los géneros bacterianos a los que pertenecen.

Cepas	<i>nifH</i>	Sideróforos	Fosfato	Hemicelulasas	Celulasas	Proteasas	AIA	Biopelícula	Genero
UYSB12	+	-	-	-	-	+	-	++	<i>Rhizobium</i>
UYSB13	+	-	-	-	-	+	-	+	<i>Rhizobium</i>
UYSB18	-	-	+	-	-	+	-	-	<i>Bacillus</i>
UYSB21	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Pantoea</i>
UYSB28	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>Brevibacillus</i>
UYSB30	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Acidovorax</i>
UYSB32	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>Stenotrophomonas</i>
UYSB34	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>Enterobacter</i>
UYSB35	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>Herbaspirillum</i>
UYSB39	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pantoea</i>
UYSB41	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Acinetobacter</i>
UYSB45	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Pantoea</i>
UYSB46	-	+	+	-	-	-	+	+	<i>Chryseobacterium</i>
UYSB48	+	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	<i>Serratia</i>
Sp7	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	<i>Azospirillum brasilense</i>

En la figura 10 se muestran los tres ensayos de promoción del crecimiento vegetal realizados con sus tiempos de cosecha correspondientes, momento en el cual se midieron los parámetros a estudiar en cada caso.



Figura 10: Vista de los distintos ensayos en los que se determinaron la PCV en plantas de sorgo dulce inoculadas con los aislamientos de interés.

En una primera instancia, al realizar los análisis estadísticos se compararon los resultados de los aislamientos ensayados en relación al control negativo (Tabla 7). Los resultados de las medidas biométricas evaluadas (altura y diámetro del tallo, peso seco aéreo y radicular), mostraron que en los 2 primeros ensayos no se observaron diferencias significativas al compararse los tratamientos con el control negativo. Sin embargo se observó una tendencia en algunos de los aislamientos los cuales fueron seleccionados para su evaluación en el ensayo de invernáculo utilizando suelo-arena como soporte (Tabla 6). Por otra parte, en este último ensayo (3), si se observaron diferencias significativas, para algunos de los tratamientos en los parámetros antes mencionados (Tabla 7).

Tabla 7: Efecto de la inoculación de PEB nativos en plantas de sorgo dulce de la variedad M81E

Aislamiento	Altura Tallo (cm)	Diámetro Tallo (mm)	Peso seco (g planta ⁻¹)	
			Raíz	Tallo
Control Negativo ^a	13,50 a	4,84 a	0,74 a	0,86 a
<i>Rhizobium</i> sp. UYSB12	14,44 ab	4,90 a	1,05 c	0,95 abc
<i>Rhizobium</i> sp. UYSB13	16,00 b	4,44 a	1,09 c	1,07 cd
<i>Enterobacter</i> sp. UYSB34	14,95 ab	4,73 a	0,93 abc	1,02 bcd
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	16,25 b	4,79 a	1,01 bc	1,15 d
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	14,30 ab	4,90 a	0,77 ab	0,94 ab

^aEl control negativo: plantas sin inoculación ni fertilización nitrogenada. Medias entre 2 tratamientos que poseen la misma letra no son significativamente diferentes (test de LSD 0.10)

Como se observa en la tabla 7, ningún tratamiento presentó diferencia significativa en sus valores cuando se comparó el diámetro del tallo de las plantas inoculadas con el control negativo.

Sin embargo, cuando se estudiaron las variables altura del tallo y ambos pesos secos, los aislamientos *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 mostraron diferencias significativas en relación al control negativo. Asimismo, los aislamientos *Rhizobium* sp. UYSB12 y *Enterobacter* sp. UYSB34 también mostraron diferencias significativas en los pesos secos de raíz y tallo respectivamente. Sin embargo, la cepa referencia *A. brasilense* Sp7, no mostro diferencia significativa en ninguno de los parámetros estudiados.

4. Discusión

4.1 Probables endófitos bacterianos nativos asociadas a la variedad M81E de sorgo dulce

4.1.1 Construcción de una colección de PBE asociadas a sorgo dulce

Las plantas constituyen un nicho vasto y diverso para las bacterias endófitas. Estas han sido aisladas a partir de una gran diversidad de plantas en bajo número (en relación a las bacterias del suelo), posiblemente debido a que las condiciones dentro del interior de las mismas son difíciles de imitar y de ahí su dificultad en el aislamiento (14). El aislamiento de bacterias endófitas asociadas a plantas, es de gran interés debido a que las mismas presentan un gran potencial biotecnológico ya que se pueden emplear como inoculantes para la promoción del crecimiento vegetal y control biológico; siendo también fuente novedosa de metabolitos secundarios (127, 128).

Teniendo en cuenta esto, en el presente trabajo se construyó una colección de probables endófitos bacterianos a partir de raíces y tallos esterilizados en la superficie de plantas sorgo dulce de la variedad comercial M81E, cultivada en Uruguay. Con el fin de obtener el mayor rango posible de bacterias asociadas a sorgo dulce, se realizaron aislamientos a partir de plantas trampa (con suelo proveniente de la zona de cultivo), así como a partir de material vegetal directamente de campo. Se eligieron ambos órganos para el aislamiento de bacterias posibles endófitas, dado que la raíz es la mayor fuente de entrada de las bacterias endófitas y algunas son capaces de seguir su camino mediante los vasos de xilema y colonizar el tallo. Al aislar de ambos órganos, se amplía el rango de aislamientos a aquellos endófitos "oportunistas" que ingresan por las roturas de la raíz y también a aquellos que son capaces de adaptarse a las condiciones de la planta y colonizar el tallo.

A partir de estas aproximaciones, se generó una colección de 188 aislamientos morfológicamente diferentes empleando medios ricos no definidos, los cuales favorecen el crecimiento rápido de bacterias heterótrofas, así como medios de cultivos mínimos definidos. Al igual que lo reportado en trabajos previos (129), los resultados obtenidos mostraron que el órgano a partir del cual se obtuvo un mayor número de aislamientos fue en la raíz (107 aislamientos), en comparación con el tallo (79 aislamientos). Este factor, se puede explicar porque las raíces son la principal vía de entrada de las bacterias a la planta y dependiendo de la interacción planta-bacteria, solo algunos grupos bacterianos son capaces de adentrarse en la planta (Sección 1.3.1).

Como era de esperarse, se obtuvo un 54% más de aislamientos cuando se emplearon medios ricos de cultivo no definidos (144 aislamientos), que cuando se empleó un medio de cultivo mínimo (44 aislamientos) (Sección 3.1.1). Esta tendencia también se observó en los trabajos donde aislaron endófitos asociados a arveja (130), mientras que en el caso de maíz dulce y algodón (131) los resultados fueron opuestos.

A modo de resumen, en este trabajo donde se obtuvo un mayor número de aislamientos fue en el órgano raíz y en el medio de cultivo rico no definido.

4.1.2 Caracterización de la colección de PBE asociadas a sorgo dulce.

4.1.2.1 Búsqueda de aislamientos con características PCV y con PMI

La totalidad de la colección fue caracterizada *in vitro* buscando características probablemente involucradas en la PCV así como enzimas relacionadas con los PMI.

De los 188 aislamientos PBE obtenidos, 35% presentaron al menos 1 característica PCV mientras que el 44% al menos 1 posible mecanismo de infección. Dentro de los que presentaron características PCV, los aislamientos productores de AIA representaron el 69% del total de los aislamientos obtenidos en la colección de PBE. Mientras que los posibles diazótrofos representaron un 38% de los aislamientos obtenidos en la colección de PBE, y de estos el 65% fué capaz de crecer en medio semisólido sin N. Previamente nuestro grupo de trabajo realizó una colección de endófitos-diazótrofos asociados a caña de azúcar. En dicha colección los diazótrofos obtenidos representaron el 17% del total de los aislamientos mientras que en el presente trabajo son el 38% (78). La diferencia podría radicar en los medios de cultivos empleados para la obtención de ambas colecciones, dado que en la primera los medios de cultivos utilizados fueron semi-selectivos y no tenían como objetivo obtener la totalidad de los heterótrofos como lo fue en el presente trabajo.

Según lo expresado en el párrafo anterior, las características PCV más frecuentemente encontradas en la colección fueron la capacidad de producir la fitohormona AIA, así como la capacidad de fijar biológicamente el N₂ atmosférico, al igual que lo reportado para colecciones similares en los cultivos de interés agronómico como mijo, sorgo dulce, caña de azúcar y maíz (71, 78, 132). Asimismo los efectos benéficos en la promoción del crecimiento vegetal, de ambas características PCV, han sido ampliamente reportados (75, 133).

Por otra parte, cuando se buscaron aislamientos con resistencias intrínsecas a diferentes antibióticos en la colección, los resultados obtenidos mostraron que sorprendentemente todos los aislamientos presentaron al menos resistencia a un antibiótico ensayado en su máxima concentración. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en los trabajos reportados por otros investigadores donde al menos 20% de los aislamientos asociados a sorgo y maíz fueron sensibles a algún tipo de antibiótico ensayado (71, 84). Este resultado refleja los diferentes microbiomas asociados a las diferentes plantas, los cuales están fuertemente influenciados por las variedades así como por el tipo de suelo.

4.1.3 Identificación de PBE asociadas a sorgo dulce.

Diferentes Filos bacterianos fueron identificados en la colección de PBE asociados a plantas de sorgo dulce incluyendo Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. De la totalidad de aislamientos identificados en la colección, las bacterias Gram negativas fueron aisladas en mayor número (67%). Trabajos similares en los cuales se aislaron bacterias endófitas asociadas a sorgo dulce mostraron resultados diversos, reportándose tanto un igual número de aislamientos Gram negativos y positivos, así como un mayor número de aislamientos Gram negativos (71, 84)

Los dos Filos que presentaron mayor número de aislamientos fueron, Proteobacteria y Firmicutes. Dentro de las Proteobacteria, la clase con mayor representación fue el de las Gamaproteobacteria, al igual que lo observado para una colección de PEB asociados a variedades de caña de azúcar (78). Por otro lado, dentro

del Filo Firmicutes, el género *Bacillus* fue el más representado en la colección, al igual que lo reportado en trabajos donde aislaron endófitos de varios cultivos de interés agronómico (84, 134).

En relación a los géneros bacterianos asociados a sorgo dulce identificados en la colección, los mismos incluyen al género *Rhizobium* (Alfaproteobacteria), los géneros *Achromobacter*, *Herbaspirillum* y *Ralstonia* (Betaproteobacteria) y los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas* (Gamaproteobacteria), siendo el grupo con mayor número de aislamientos. Asimismo y siguiendo con las bacterias Gram negativas, un único aislamiento perteneciente al filo Bacteroidetes, fue identificado el cual estuvo relacionado con el género *Chryseobacterium*. Por otra parte, dentro de las bacterias Gram positivas, también se obtuvo un único aislamiento perteneciente al Filo Actinobacteria, el cual estuvo relacionado al género *Kocuria*, así como 13 aislamientos pertenecientes al Filo Firmicutes. Dentro de este último Filo, los géneros identificados fueron *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*.

Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos para una colección de posibles endófitos asociados a caña de azúcar, generada en nuestro laboratorio, donde la diversidad de géneros bacterianos fue menor y mayoritariamente pertenecientes a las Gamaproteobacteria.

La mayoría de los géneros bacterianos encontrados en este trabajo han sido previamente asociados a cultivos de importancia agronómica, incluyendo al sorgo dulce (14, 43). Es interesante resaltar que aunque se partió de plantas saludables, se identificaron géneros bacterianos descritos como patógenos vegetales tales como *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) causante de las agallas en tallos así como patógenos potenciales de humanos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus epidermis* y *Ralstonia* spp. Sin embargo estos géneros han sido también, previamente descritos como asociados a diferentes plantas de interés agronómico (14, 43, 135).

Como previamente se destacó, la clase más abundante y diversa dentro de las bacterias Gram negativas fue el de las Gamaproteobacteria. Dentro de esta clase, aislamientos pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* han sido reportados como asociados o endófitos de diferentes cultivos de Poáceas (14, 43, 136). Específicamente, aislamientos pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Pseudomonas* se han reportado asociados a sorgo dulce en regiones de Nebraska en Estados Unidos (84), pero no se han descrito aislamientos pertenecientes a estos géneros clase asociados a sorgo dulce en la región de Kavango en Namibia ni tampoco en el trabajo de Zinniel y colaboradores donde también estudiaron los endófitos de sorgo dulce (71, 84).

Según la bibliografía consultada, este es el primer trabajo en el cual se reportan aislamientos pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* asociados a plantas de sorgo dulce. Por su parte, las Betaproteobacteria estuvieron representadas en la colección por los géneros *Ralstonia*, *Achromobacter* y *Herbaspirillum*. El género *Ralstonia* ha sido previamente descrito como asociado a raíces de sorgo dulce así como endófitos de plantas de soja (71, 137). En el caso del género *Achromobacter*, existen reportes de representantes de este género como asociados a plantas de *Citrus* spp., girasol (*Helianthus annuus*), caña de azúcar así como asociados a la rizósfera de canola (*Brassica napus*) (78, 138, 139). Asimismo el género *Herbaspirillum*, ha sido aislado y reportado como asociado a distintos tipos de cultivos, tales como el de arroz (*Oryza sativa*) y el de la caña de azúcar; así como endófito de plantas de sorgo dulce (14, 140, 141). Por otro lado, no se han encontrado en la bibliografía consultada reportes de aislamientos asociados a sorgo dulce pertenecientes al género *Achromobacter*.

El género *Rhizobium* fue el único representante de la clase de las Alfaproteobacteria. Dentro de este género, los aislamientos se agrupan en el árbol filogenético basado en el gen de la subunidad *ADNr 16S* en 2 grupos, uno relacionado al fitopatogeno *R. radiobacter* y a la cepa de referencia no nodulante *R. pusense*; mientras que el otro grupo se asocia a especies de rizobios noduladores o previamente descritos como asociados a plantas tales como *R. mesosinicum*, *R. alamii* y *R. sullae*. Especies pertenecientes a este género han sido previamente aislados como asociados o endófitos de distintos cultivos (14, 43, 78, 136), pero no asociados a sorgo dulce.

En referencia a los Bacteroidetes, los resultados mostraron la obtención de un único aislamiento perteneciente al género *Chryseobacterium*. Aislamientos pertenecientes a este género han sido previamente reportados como endófitos de diversas plantas incluyendo al pepino (*Cucumis sativus*), la papa (*Solanum tuberosum*), la canola y el tomate (*Solanum lycopersicum*) (43), pero no como asociados a plantas de sorgo dulce.

En relación a los aislamientos bacterianos identificados como Gram positivos, los mismos se relacionaron con el Filo Actinobacteria (*Kocuria* spp.) así como con el Filo Firmicutes (*Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus* *Bacillus* spp.). El género *Bacillus*, ha sido ampliamente reportado como endófito o asociado a diversos cultivos (14, 43). Aislamientos pertenecientes a este género se han aislado de la rizósfera de sorgo dulce y descrito como agentes biocontroladores pero no como endófitos o bacterias PCV en este cultivo (85, 86). En relación a los aislamientos identificados como relacionados al género *Paenibacillus* spp., diversos trabajos los han reportado como endófitos de pepino, boniato (*Ipomoea batatas*), granos de café y sorgo dulce (14, 43, 71, 142); así como asociados a la rizósfera de sorgo dulce (143). Por otra parte y en referencia al género *Staphylococcus*, trabajos previos han reportado aislamientos de éste género asociados a diferentes cultivos incluyendo la zanahoria (*Daucus carota*), la caña de azúcar, el *Alyssum bertolonii*, así como a granos de café del sur de Brasil (142, 144–146). Asimismo, se han aislados endófitos pertenecientes al género *Brevibacillus* como asociados a plantas de maíz (*Zea mays*), algodón (*Populus deltoides*) y de campanilla china (*Platycodon grandiflorum*) (71, 147, 148). Sin embargo, no se han encontrado reportes de este género asociado a plantas sorgo dulce.

Por último, y en referencia al Filo Actinobacteria, el mismo estuvo representado por el género *Kocuria*. Aislamientos pertenecientes a este género han sido aislados de plantas de claveles (*Tagetes* spp.) y reportados como agentes biocontroladores de los mismos (149). Según la bibliografía consultada, este es el primer reporte de aislamientos posibles endófitos pertenecientes a este género asociados a plantas de sorgo dulce.

En resumen, este trabajo revela algunos aislamientos novedosos asociados a plantas de sorgo dulce con características promotoras del crecimiento vegetal, los cuales los convierte en excelentes candidatos para un posible desarrollo de un bioinoculante para este cultivo.

4.2 Promoción del crecimiento vegetal de la variedad M81E de sorgo dulce, por posibles bacterias endófitas

Con la finalidad de estudiar el efecto de la inoculación de los PEB nativos sobre plantas de la variedad de sorgo dulce M81E, se realizaron ensayos de promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas así como de invernáculo. Para esto diferentes aislamientos, fueron seleccionadas de acuerdo a sus características PCV determinadas *in vitro*, así como por su relación filogenética, determinada por la secuenciación del gen *ADNr 16S*.

En estos ensayos se utilizaron diferentes sustratos de crecimiento (arena:vermiculita y suelo:arena) así como diferentes condiciones (gnotobióticas e invernáculo).

En los ensayos (1) y (2) (Sección 2.5 de Materiales y métodos), se evaluó la PCV utilizando como sustrato arena-vermiculita (2:1), en condiciones de cuarto de plantas (15 días) y luego en invernáculo (60 días). Los resultados no mostraron diferencias significativas con el control negativo (sin fertilización ni inoculación bacteriana). Esto puede deberse a las condiciones de crecimiento de las plantas así como a la metodología utilizada para la inoculación de las semillas. Con respecto a las condiciones ensayadas, muchos de los aislamientos estudiados presentaron *in vitro*, la capacidad de solubilizar fosfato así como de producir sideróforos. Sin embargo en el medio Jensen empleado para crecer las plantas en los ensayos de promoción, éstos elementos están disponibles por lo que su probable efecto promotor no se podría evaluar en estas condiciones. En cuanto a la inoculación de las plantas ensayadas, la misma fue realizada en la semilla, pre-germinado en placas de agar-agua y sembradas. Para evaluar si el método de inoculación fue efectivo y si el mismo tiene algún efecto sobre la PCV, deberían ensayarse distintas metodologías de inoculación y compararlas entre sí.

Sin embargo, en estos ensayos se observó una tendencia de PCV por algunas de las cepas ensayadas, lo que permitió la selección de las mismas para su evaluación como inoculante en ensayos de invernáculo.

En condiciones de invernáculo, con sustrato suelo:arena, los resultados mostraron que los aislamientos *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 tuvieron un efecto PCV en las condiciones antes mencionadas (Tabla 7). En este ensayo, la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 previamente descrita como PCV en plantas de sorgo (150–152), fue empleada como cepa referencia, no observándose diferencias significativas con el control negativo, en las condiciones ensayadas. Esto puede estar debido a la especificidad del genotipo de la planta con las bacterias asociadas o a una mala competencia para la colonización de las raíces, con la microbiota nativa presente en el suelo (153).

Aislamientos pertenecientes al género *Rhizobium*, tales como *R. leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium meliloti*, han sido reportados como PCV en plantas no leguminosas como maíz, arroz y sorgo dulce (154). Entre las características PCV detectadas en estas cepas, la FBN así como la producción de fitohormonas han sido propuestos como los mecanismos PCV responsables (154–156). En el caso del aislamiento nativo *Rhizobium* sp. UYSB13, el mismo posee la capacidad *in vitro* de fijar biológicamente el N₂ atmosférico así como la presencia de la enzima ACC desaminasa. Dichos mecanismos podrían estar involucrados en los mecanismos PCV observados, sin embargo para afirmar esto se necesitan realizar mutantes en los genes involucrados en dichos procesos y probar su fenotipo en planta. Lo interesante de este aislamiento, es que filogenéticamente está relacionado con cepas tipos relacionadas a fitopatógenos y no a cepas asociadas que nodulan plantas (Figura 9).

Por otra parte, aislamientos relacionados al género *Pantoea* han sido descritos como PCV de diversos cultivos tales como el maíz, el arroz, la caña de azúcar, la canola, la lenteja (*Lens culinaris*) y la arveja (*Pisum sativa*) (132, 157–159). En varios de estos casos, la producción de AIA ha sido también propuesta como el mecanismo PCV involucrado (158). El aislamiento nativo *Pantoea* sp. UYSB45 se agrupa con la cepa referencia *Pantoea dispersa* y los análisis de BLAST muestran un 98% de identidad con *Pantoea dispersa* LMG2603 (Figura 8 y Tabla 6). En un trabajo similar con un aislamiento de la zona sub-alpina del noroeste del Himalaya Indio, la cepa *P. dispersa* 1A mostró efectos PCV en trigo en condiciones de invernáculo (160). Esta cepa mostró varias características PCV, entre ellas producción de AIA. Dado que el aislamiento UYSB45 es diazotrofo y productor de AIA, podemos manejar la posibilidad que algunos de estas características pueden ser las causantes del efecto PCV observado en las condiciones ensayadas.

En caso que se quiera determinar exactamente el mecanismo involucrado en la PCV por estos 2 aislamientos, son necesarios estudios adicionales.

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se describe un aislamiento PCV perteneciente al género *Pantoea* en plantas de sorgo dulce.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, estos 2 aislamientos nativos PCV (*Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45), obtenidos de la variedad de sorgo dulce que se comercializa en Uruguay, presentan un gran potencial para su uso como inoculantes; por lo que amerita la realización de su evaluación como inoculante en condiciones de campo.

Capítulo 2: Diversidad bacteriana endofítica y endofítica-diazotrófica asociada a plantas sorgo dulce crecidas en condiciones de fertilización química contrastantes

Objetivo general:

Determinar los efectos de la fertilización química en la estructura de la comunidad bacteriana endofítica y endofítica-diazotrofa, asociada a la variedad M81E.

Objetivos particulares:

- 1- Determinar la diversidad bacteriana endofítica en condiciones contrastantes de fertilización química
- 2- Determinar la diversidad bacteriana endofítica-diazotrófica en condiciones contrastantes de fertilización química

Estrategia:

En una primera instancia, se puso a punto la técnica de aislamiento de ADN bacteriano endofítico a partir de raíces y tallos de plantas de sorgo dulce, colectadas en Bella Unión (Departamento de Artigas), crecidas en parcelas con fertilización química contrastantes (100 y 0 kg/ha). El ADN obtenido fue empleado como molde para la amplificación de los genes *ADNr 16S* y *nifH*, con el fin de estudiar la diversidad endofítica total así como la diversidad endofítica-diazotrófica respectivamente, mediante la técnica de PCR-DGGE. Para esto se realizaron PCR anidadas, con cebadores específicos para cada uno de los genes mencionados. Los perfiles de los geles obtenidos fueron analizados mediante el software Gel Compar II para determinar si existió algún efecto de la fertilización química nitrogenada sobre la población bacteriana endofítica y endofítica-diazotrofa. En la figura 10, se muestra un esquema de la estrategia general utilizada en la determinación de la diversidad bacteriana y la diversidad bacteriana-diazotrofa mediante el empleo de la técnica de PCR-DGGE.

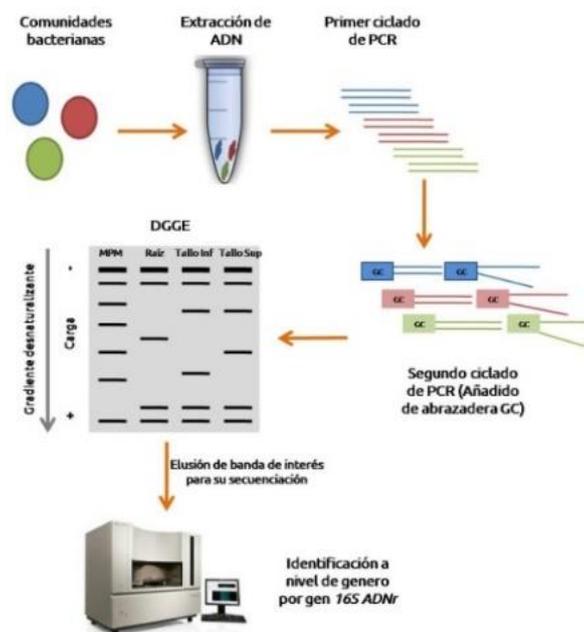


Figura 11: Estrategia utilizada para el estudio de la diversidad bacteriana y bacteriana-diazotrofa mediante PCR-DGGE.

2.0 Materiales y Métodos

2.7 Obtención de ADN endofítico

Plantas de sorgo dulce crecidas en condiciones contrastantes de fertilización química (100 y 0 kg/ha), la cual se utiliza un mezcla de fertilizante NPK y urea, fueron colectadas en Bella Unión (Artigas) (30°37'56.0"S 57°21'18.0"W). Las muestras vegetales fueron seccionadas en raíz, tallo superior e inferior. Se realizaron 3 réplicas por cada muestra, siendo cada replica 1 planta distinta. A partir de las mismas se extrajo el ADN bacteriano endofítico para lo que se realizaron diferentes metodologías según el órgano en estudio. Para el caso de las raíces, las mismas fueron primero lavadas con abundante agua de la canilla y agitadas con vortex durante 1 min en tubos tipo Falcón estériles con H₂O deionizada estéril. Posteriormente la superficie del material fue esterilizada, para esto se incubó primero 10 min con EtOH 70% (v/v), posteriormente 30 min con hipoclorito de sodio 4%, enjuagándose en ambos casos con agua desionizada estéril. Con el fin de liberar las bacterias adheridas a las raíces, las muestras se trataron 15 min con sonicador y 1 min con vortex. Posteriormente con un bisturí estéril, se descartaron los extremos del material y se cortaron en trozos pequeños hasta obtener un material de partida de 1,5 gramos(161).

Para el estudio la población endofítica de los tallos, los mismos fueron lavados con EtOH 70% (v/v), pelados con bisturí estéril descartándose las capas más externas y los extremos, el material obtenido se cortó en trozos pequeños hasta obtener un material de partida de 1,5 gramos.

En ambos caso la extracción de ADN se realizó usando PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) y se purificó mediante el Kit Wizard® DNA Clean-Up System (PROMEGA).

El tamaño correcto del amplicón fue confirmado según la metodología explicada en el Capítulo 1, punto 2.5. La cuantificación de ADN se obtuvo mediante la medición con espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™1000. El ADN obtenido fué utilizado como molde para cada reacción de PCR a una concentración de 16 ng/μl.

2.8 Amplificación de genes de interés mediante PCR anidada

Dado que se trabajó con ADN de bacterias endofíticas y el número de endófitos o endófitos-diazótrofos en relación al ADN de la comunidad total bacteriana así como al ADN de planta es significativamente menor, en todos los casos se realizaron PCR anidadas.

Esta técnica es una modificación de la técnica de PCR convencional que busca reducir la unión no específica en productos de PCR. Para ello, se realizan dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores. En la primera, se realizó una reacción con los cebadores para amplificar la región específica deseada. Con el producto de amplificación obtenido, se realizó una segunda PCR con cebadores generales para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento de interés.

Las segundas reacciones de las PCR anidadas se realizaron con el cebador F968-GC (*ADNr 16S*) y PolF-GC (gen *nifH*), que tienen unido en su extremo una secuencia rica en GC. De esta manera los productos de PCR tienen una abrazadera que evita la disolución durante la separación en el gradiente desnaturante(162). Para el estudio de la diversidad total bacteriana, se utilizaron cebadores universales en base al gen *ADNr16S*, mientras que para el estudio de filos o géneros específicos de interés (Actinobacteria, Bacteroidetes,

Firmicutes y Proteobacteria), se utilizaron cebadores específicos listados en la Tabla 8. Por otro lado, para el estudio de la comunidad diazotrofa, se empleó el mismo procedimiento mencionado utilizando cebadores para el gen *nifH* (Figura 12).

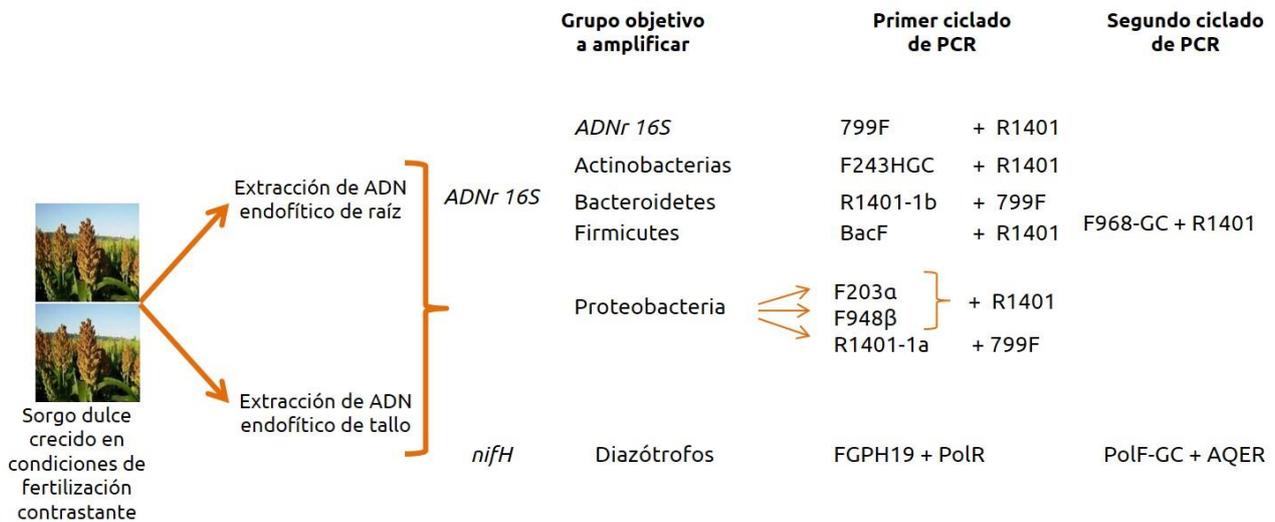


Figura 12: Cebadores empleados para el estudio de la diversidad bacteriana y bacteriana-diazotrofa mediante PCR-DGGE de plantas de sorgo dulce crecidas en condiciones de fertilización química contrastantes.

2.8.1 Amplificación mediante PCR del gen *ADNr 16S* utilizando cebadores universales

Con el fin de poder determinar el efecto de la fertilización química en la estructura de la comunidad bacteriana, el ADN obtenido en el punto 2.6, se analizó mediante la técnica DGGE en base al gen *ADNr 16S*. Para esto, en la primera reacción se utilizaron, los cebadores 799F y 1492R (Tabla 8)(163) y la siguiente mezcla de reacción: 5,0µl de buffer de reacción 5X, 1,5µl de MgCl₂ 25mM, 1,0µl de dNTPs 10mM, 1,0µl de cada cebador 10 µM, 0,05µl de BSA 1%, 0,2µl de Taq polimerasa (5Uµl⁻¹), 1,0µl de ADN molde y H₂O c.s.p. 25µl. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 40 segundos a 53°C y 40 segundos a 72°C. Por último un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C.

En la segunda reacción se utilizaron los cebadores F968-GC y L1401(Tabla 8)(164), en la mezcla reacción: 10,0µl de buffer de reacción 5X, 5,0µl de MgCl₂ 25mM, 1,0µl de dNTPs 10mM, 1,0µl de cada cebador 10 µM, 0,25µl de Taq polimerasa (5Uµl⁻¹), 1,0µl de la reacción de PCR anterior y H₂O c.s.p. 50µl. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de un 1 min a 94°C, 90 segundos a 48°C y 90 segundos a 70°C. Por último un ciclo de extensión final de 10 min a 70°C.

2.8.2 Amplificación mediante PCR del gen *ADNr 16S* de filos o grupos bacterianos específicos

En este caso la variación con respecto al punto 2.7.1 fue la elección de los cebadores así como el tipo del programa de ciclado empleado en la primera reacción de PCR, los cuales fueron reportados como específicos para determinados grupos bacterianos (Tabla 8) (163–168). Por otra parte, la mezcla de reacción y las condiciones del segundo ciclado, así como los cebadores fueron los mismos en todos los casos.

Tabla 8: Cebadores utilizados para la amplificación del gen *ADNr 16S*

Nombre	Objetivo a amplificar	Secuencia (5'-3')	Referencia
799F	<i>ADNr 16S</i> bacteriano (excluyendo el cloroplasto)	AACMGGATTAGATACCKG	(163)
1492R	<i>ADNr 16S</i> universal	TACGGYTACCTTGTACGACTT	(163)
R1401	<i>ADNr 16S</i> universal	CGGTGTGTACAAGACCC	(165)
F968-GC	<i>ADNr 16S</i> universal	CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGCGGGGGC ACGGGGGGAACGAAGAACCTTAC	(164)
F203α	AlfaProteobacteria	CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTAT	(166)
F948β	BetaProteobacteria	CGCACAAGCGGTGGATGA	(166)
F243HCG	Actinomycetes	GGATGAGCCCGCGGCCTA	(165)
BACF	Genero <i>Bacillus</i> y relacionados	GGGAAACCGGGCTAATACCGGAT	(167)
R1401_1aR	Gamaproteobacteria	CGGTGTGTACAAGCCCGGGAACG	(168)
R1401_1bR	Flavobacterias	CGGTGTGTACAAGCCCGGGAACG	(168)

2.8.3 Amplificación mediante PCR del gen *nifH*

Con el fin de determinar el efecto de la fertilización química sobre la diversidad bacteriana endofítica-diazótrofa, el ADN aislado (2.6) se analizó mediante la técnica DGGE en base al gen *nifH*. Para esto se realizó un primer ciclado con los juegos de cebadores FGPH19 y PolR (Tabla 9)(112, 169). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: 10,0μl de buffer de reacción 5X, 3,0μl de MgCl₂ 25mM, 4,0μl de dNTPs 10mM, 1,0μl de cada cebador 10 μM, 0,5μl de Taq polimerasa (5Uμl⁻¹), 1,0μl de ADN molde y H₂O c.s.p. 50μl. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de un 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 2 min a 72°C. Por último un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Como control negativo se utilizó en la primera reacción una mezcla en la cual no se agregó ADN.

Tabla 9: Cebadores utilizados para la amplificación del gen *nifH*

Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
FGPH19	TACGGCAARGGTGGNATHG	(169)
PolR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA	(112)
AQER	GACGATGTAGATITCCTG	(112)
PolF-GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGGCCCGCC CCGCCCTGCGAYCCSAARGCBGACTC	(112)

En este caso, en la segunda reacción de PCR se utilizaron los cebadores PolF-GC y AQER (Tabla 9) (112). La reacción utilizada fue la misma que la empleada en la primera reacción, utilizando como molde 1,0µl de la reacción de PCR anterior, incluyendo una alícuota del control negativo. Para este caso el programa utilizado fue el mismo que en la primera etapa, variándose a 50°C, la temperatura de hibridación entre los cebadores y el ADN molde.

2.9 Análisis de los amplicones obtenidos mediante la técnica Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Los productos de PCR obtenidos anteriormente, se analizaron mediante la técnica DGGE, utilizando una cuba de electroforesis modelo DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad). Para esto 20µl de los productos de PCR obtenidos en los pasos 2.7 y 2.8 fueron sembrados en geles de poliacrilamida de 8% (p/v). Los mismos fueron armados con un rango de gradiente de agentes desnaturalizantes (Formamida y urea) de 40-65%, para el análisis del gen *ADNr 16S* general, Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria, Flavobacterias y Firmicutes; 45-75% para el análisis de Actinobacteria y 20-70% para el análisis del gen *nifH*.

La corrida electroforética se realizó durante 16 horas a 60 volts y 60°C utilizando buffer 1X TAE (Tris-acetato 20mM, EDTA 0,5mM; pH 9). Como marcador de la migración se utilizó el GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los geles se revelaron con SYBR® Green (Invitrogen™) y se fotografiaron bajo luz UV para su posterior análisis

2.10 Análisis informático de las imágenes obtenidas a partir de los geles DGGE

Los patrones de bandas de los geles de DGGE obtenidos, fueron analizados con el programa GelCompar II 6.5 (Applied Maths NV.). En el mismo se utilizó el coeficiente de Dice para comparar la similitud entre las muestras y el algoritmo UPGA (Unweighted Pair-Group Average) para construir los dendogramas correspondientes.

2.11 Secuenciación de las bandas de interés seleccionadas

Con el fin de poder identificar a nivel de género a aquellos grupos bacterianos que están presentes o ausentes en una condición específica, así como para confirmar la especificidad de los cebadores, diferentes bandas de los geles fueron seleccionadas en base a los análisis informáticos según fueran únicas para algún tratamiento así como específicas a un órgano en particular. Las mismas fueron seccionadas y luego eluidas durante 24 horas a 4°C en agua estéril ultra pura. Posteriormente una alícuota de 1µl de la elución de la banda se usó como ADN molde para repetir el segundo ciclo de PCR (sección 2.7.1). Los amplicones obtenidos fueron analizados según la metodología detallada en el punto 2.5. El producto de PCR obtenido se envió a Macrogen Inc., Corea para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012) (HeracleBioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>) y comparadas mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.12 Cálculo de los índices de diversidad alfa

La diversidad alfa se define como la diversidad media de las especies por subunidad en el conjunto de datos de interés. En nuestro caso, la diversidad estructural de la comunidad se calculó por los índices de diversidad alfa; Shannon-Weiner y Simpson. Estos índices se calcularon a partir de los patrones de bandas observados, utilizando las curvas densitométricas. La información obtenida fue exportada en forma de matriz numérica cuantitativa (en relación a la superficie de cada banda).

La ecuación del índice de Shannon-Weiner empleado es la siguiente

$$H' = \sum (ni/N) \log(ni/N)$$

La ecuación del índice de Simpson empleada es la siguiente

$$1-D = 1 - \sum P_i^2; P_i = ni(ni-1)/N(N-1)$$

Donde ni , es presencia o ausencia de banda/relación de superficie de cada banda

N , es la suma de todas las bandas

3.0 Resultados

3.3 Obtención de ADN endofítico a partir de plantas de sorgo dulce crecidas en condiciones contrastantes de fertilización química

Para el estudio del efecto de la fertilización química sobre la estructura de la comunidad bacteriana, se utilizó una metodología independiente de cultivo basada en la técnica de DGGE. Para esto en primera instancia, se puso a punto la técnica de extracción de ADN bacteriano endofítico, a partir de muestras de tallos y raíces de sorgo dulce traídas de campo, crecidas en condiciones contrastantes de fertilización química (Figura 13).

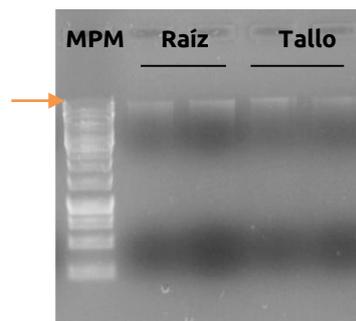


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN bacteriano obtenido a partir de muestras de raíces y tallos de sorgo dulce. Carriles: 1 MPM, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 2 y 3, muestras de raíz; 4 y 5, muestras de tallo. La banda señalada corresponde a 20.000 pares de bases.

El ADN obtenido y purificado en el punto 2.6 (figura 13), fue el utilizado como molde para los análisis de PCR-DGGE basado en los genes *ADNr 16S* y *nifH*.

3.4 Análisis del efecto de la fertilización química sobre la estructura de la comunidad endofítica del Dominio Bacteria de plantas de sorgo dulce (var. M81E)

3.4.1 Análisis de la estructura de la comunidad endofítica bacteriana basado en el gen *ADN 16S* mediante PCR-DGGE

Para determinar la diversidad del dominio Bacteria en condiciones de fertilización química contrastantes, se realizó una PCR anidada en base al gen *ADNr16S*. Los productos de PCR, obtenidos a partir de muestras de ADN de la raíz, así como del tallo inferior y superior, en los dos tipos de parcelas, fueron analizados en geles de poliacrilamida desnaturalizante (Figura 14).

En la Figura 14 se muestra el gel obtenido a partir de muestras de ADN de raíz, así como del tallo inferior y superior, en los dos tipos de parcelas analizadas. Cada carril corresponde al análisis de los amplicones obtenidos a partir de una muestra de ADN extraída de una planta diferente. En la misma se observa la misma cantidad de bandas en tallo y en raíz, así como bandas comunes entre los órganos estudiados que varían en intensidad. El patrón de bandas obtenido en tallo se mantiene entre los tratamientos (+/- F), observándose una intensidad menor de las bandas comunes en el tratamiento sin fertilización (-F). Asimismo, en la zona superior del gel, se observaron bandas únicas, muy tenues, en los tallos del tratamiento +F. Sin embargo, en el caso de raíz se observó que el patrón de bandas no se mantuvo entre ambos tratamientos (+/-F), tal y

como lo hizo en tallo y que la intensidad de las bandas comunes entre tratamientos disminuyó (bandas 2 y 14, bandas 5 y 18) o aumentó (bandas 3 y 4 y sus comigrantes en raíz) en el tratamiento -F.

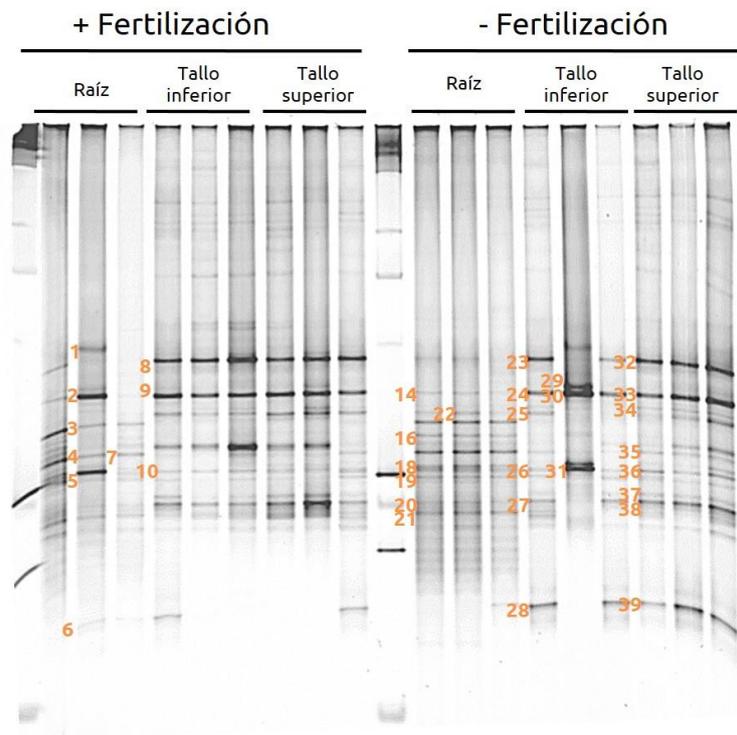


Figura 14: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR del dominio Bacteria. +Fertilización: parcela tratada con alta dosis de fertilizante químico. -Fertilización: parcela tratada con baja dosis de fertilizante químico. Aquellas bandas marcadas con números a la izquierda, fueron seleccionadas para su identificación mediante secuenciación del gen *ADNr 16S*.

En la Figura 15 se muestra el dendograma resultante del análisis del gel anterior, con el programa Gel Compar II 6.5.

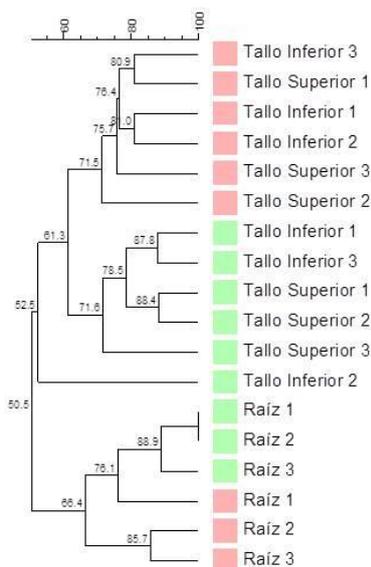


Figura 15: Dendograma resultante del análisis del gel en el cual se estudió la estructura de la comunidad del dominio Bacteria, de raíces y tallos de plantas de sorgo dulce (variedad M81E), crecidas en parcelas tratadas con fertilización química contrastante. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las repeticiones de los tratamientos. El color verde hace referencia a la parcela con poca fertilización y el color rosa a la parcela con mayor cantidad. El programa utilizado fue Gel Compar II 6.5 y el dendograma construido según el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA

El dendrograma obtenido mostró que las comunidades bacterianas se agruparon según el órgano en estudio (raíz o tallo) con una similitud de 50,5%. A su vez, dentro de cada órgano, las comunidades se agruparon de acuerdo al tratamiento (+/-), con una similitud de 52,5% (tallo) y un 66,4% (raíz). En este caso no se observaron diferencias en la estructura de la comunidad cuando se comparó el tallo inferior o el tallo superior. Cabe resaltar que la réplica 1 de la raíz +F se agrupó junto a las réplicas de raíz -F y la réplica 2 del tallo inferior -F, se agrupó por fuera de los 2 grandes grupos de tallo.

3.4.2 Análisis de la estructura de la comunidad endofítica por filos bacterianos, basado en el gen *ADN 16S* mediante PCR-DGGE

Con el fin de estudiar la estructura de las comunidades de diferentes grupos (Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes) dentro del dominio Bacteria, se realizaron reacciones de PCR anidada en base al gen *ADNr16S* empleando cebadores específicos según los filos o clases a analizar. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de poliacrilamida desnaturalizante (figuras 16 y 17). En la figura 16A se muestra el gel obtenido mediante DGGE cuando se emplearon los cebadores específicos para Alfabroteobacteria. En el mismo se observa que en ambos tratamientos (+/-), las muestras de raíz presentaron un mayor número de bandas que las de tallo. Asimismo, al compararse los diferentes órganos entre los tratamientos, se observó que la raíz presentó una menor intensidad de las bandas comunes en el tratamiento -F.

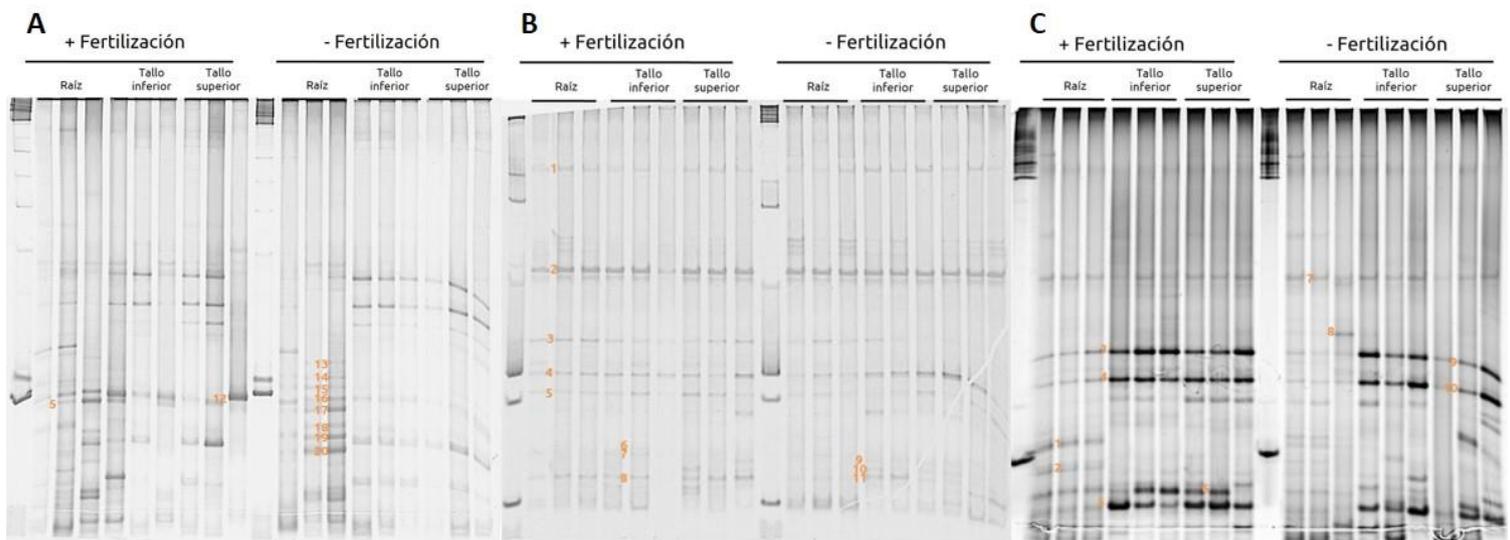


Figura 16: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR del Filo Proteobacteria **(A)**Alfabroteobacteria **(B)**Betaproteobacteria **(C)**Gamaproteobacteria. +Fertilización: parcela tratada con alta dosis de fertilizante químico. -Fertilización: parcela tratada con baja dosis de fertilizante químico. Aquellas bandas marcadas con números a la izquierda, fueron las seleccionadas para su identificación mediante secuenciación del gen *ADNr 16S*.

Asimismo en la figura 16B, se muestra el gel obtenido mediante DGGE cuando se emplearon los cebadores específicos para Betaproteobacteria. En el mismo se observa la misma cantidad así como intensidad de bandas en todos los tratamientos y órganos analizados.

Por otro lado, cuando se analizaron los geles obtenidos a partir del análisis de Gamaproteobacteria (figura 16C), también se observó una cantidad igual de bandas en los tratamientos. Sin embargo, las bandas del

tallos presentaron una mayor intensidad que las observadas en raíz. Asimismo, en este caso se observan patrones de bandas únicas en la raíz en el tratamiento +F.

Al estudiar el gel obtenido a partir del análisis de las Actinobacteria mediante DGGE (Figura 17A), se observó que el mismo presenta pocas bandas así como muy poco intensas. En este caso no se observó ningún patrón de banda en particular.

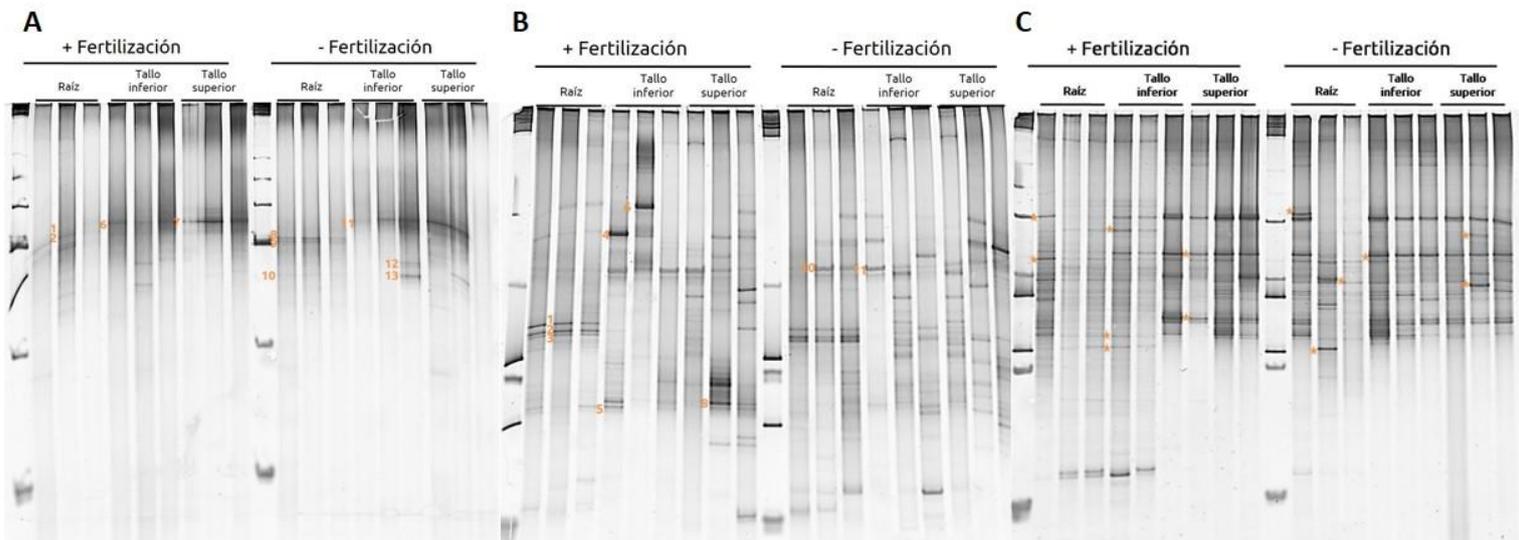


Figura 17: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR de los Filos **(A)**Actinobacteria **(B)**Firmicutes **(C)**Bacteroidetes.+Fertilización: parcela tratada con alta dosis de fertilizante químico. -Fertilización: parcela tratada con baja dosis defertilizante químico. Aquellas bandas marcadas con números o * a la izquierda, fueron las seleccionadas para su identificación mediante secuenciación del gen *ADNr 16S*.

Por otra parte, en la figura 17B, se muestra el gel obtenido para el caso en el cual se estudió el Filo Firmicutes. En este caso, se observó una mayor cantidad de bandas en el tallo que en la raíz. A su vez, al analizarse las bandas de la raíz, se observó que las mismas no varían entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, la banda 10 aumentó su intensidad en el tratamiento -F, en relación a las comigrantes en raíz +F. En el caso del tallo, se observaron diferencias en el número de bandas entre los diferentes tratamientos estudiados. Por otra parte, al compararse los órganos, se observó que las bandas 1, 2 y 3 presentes en la raíz del tratamiento +F y sus comigrantes presentes en raíz -F, son únicas a este órgano.

En el estudio de la diversidad del Filo Bacteroidetes se utilizaron cebadores específicos para la clase Flavobacteria (Figura 17C). En términos generales se observó una mayor cantidad de bandas en las raíces en comparación con los tallos, no observándose bandas únicas a ningún órgano o tratamiento. Sin embargo, en la zona inferior del gel, se observó la ausencia de bandas comigrantes a las presentes en raíz y tallo inferior en ambos tratamientos, en el tallo superior en ambos tratamientos.

Con el patrón de bandas obtenido a partir de los geles DGGE (Figuras 16 y 17), se realizó un análisis de agrupamiento de los patrones de bandas de las distintas muestras, el cual se presenta en forma de dendogramas (Figuras 18 y 19).

En la figura 18 se muestran los dendogramas obtenidos a partir del análisis de los geles del Filo Proteobacteria.

El dendrograma obtenido a partir del análisis de los geles de DGGE de las AlfaProteobacteria (Figura 18A), mostró que la comunidad bacteriana se agrupó según el órgano analizado (tallo o raíz) con una similitud de 37,9%. A su vez, las réplicas 2 y 3 del tallo superior -F, así como las réplicas 3 y 1 del tallo inferior y superior -F respectivamente, se agruparon por fuera de los 2 grupos principales. Por otra parte, dentro del órgano raíz, las bandas se agruparon por tratamiento (+/-F) con un 41,9% de similitud. Cabe resaltar que la réplica 1 del tallo inferior +F se agrupó dentro del grupo antes mencionado.

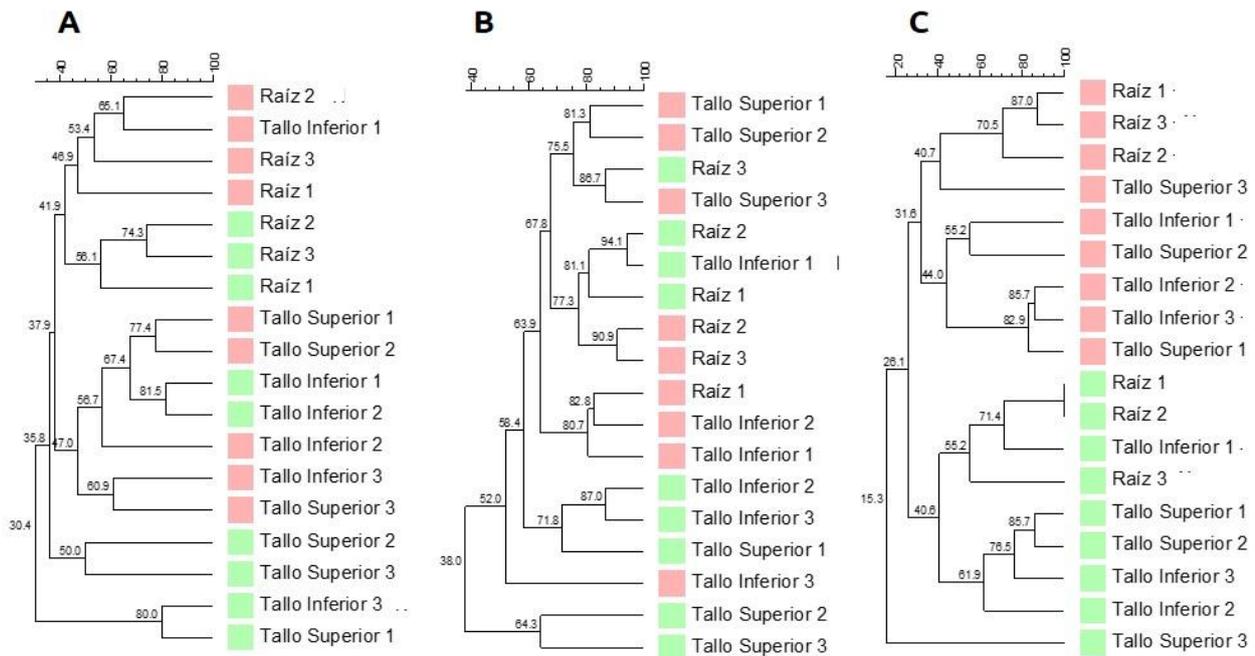


Figura 18: Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de los geles en los cuales se estudió la estructura de la comunidad de los Filos Proteobacteria: **(A)** AlfaProteobacteria; **(B)** Betaproteobacteria **(C)** Gamaproteobacteria, de raíces y tallos de sorgo dulce (variedad M81E), crecidas en parcelas tratadas con fertilización química contrastante (+/-). Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las repeticiones de los tratamientos. El color verde hace referencia a la parcela con poca fertilización y el color rosa a la parcela con mayor cantidad. El programa utilizado fue Gel Compar II 6.5 y el dendrograma construido según el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA

Cuando se analizó el dendrograma obtenido a partir del gel de DGGE de las Betaproteobacteria (Figura 18B), no se observó ningún patrón de agrupamiento ni por tratamiento, órgano o réplicas.

Por último, al analizar el dendrograma generado a partir del gel de Gamaproteobacteria (Figura 18C), se observó que las diferentes muestras se agruparon según el tratamiento analizado (+/-F) con una similitud de 26,1%. Asimismo dentro de estos, las muestras se agruparon según los órganos analizados con una similitud de 31,6% (+F) y 40,6% (-F). Cabe resaltar que la réplica 3 del tallo superior -F no se agrupó con ninguna muestra mientras que la réplica 3 del tallo superior +F se agrupó junto a las muestra de raíz +F y no con el grupo de muestras del tallo +F.

Por otra parte, en la figura 19 se muestran los dendogramas obtenidos a partir del análisis de los geles de los filos Actinobacteria, Firmicutes y Flavobacteria. En estos casos, no se detectó ningún tipo de agrupamiento en los patrones de bandas obtenidos en estos 3 filos mediante la metodología empleada.

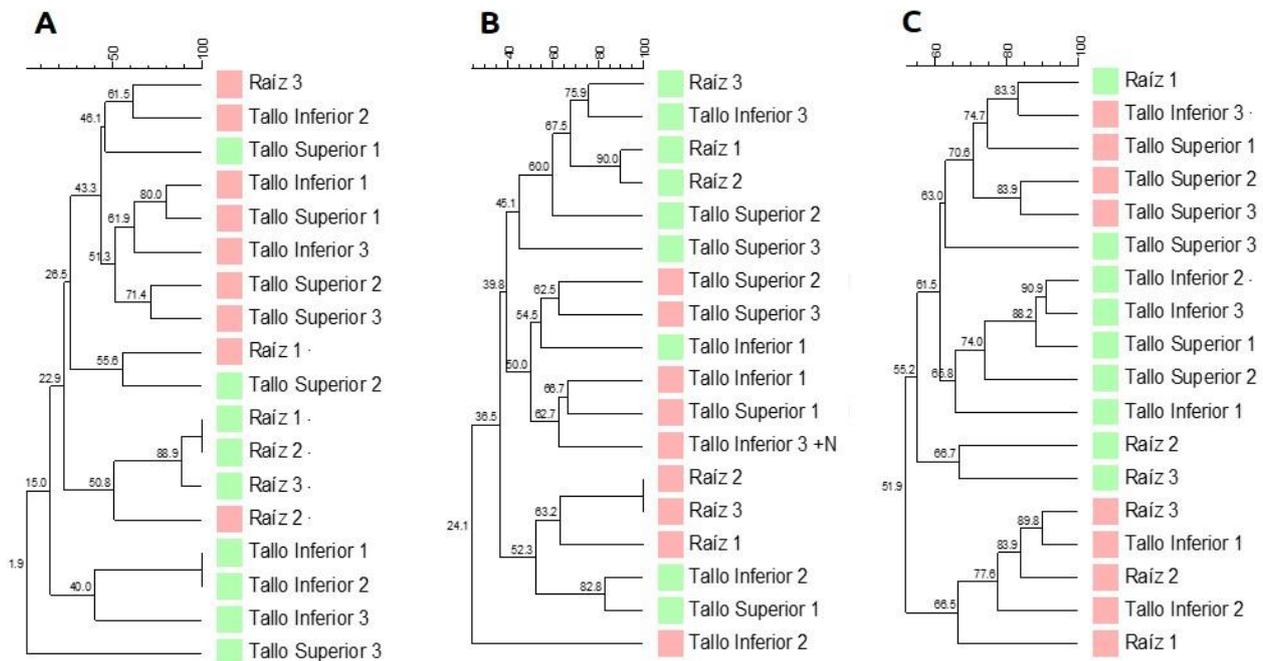


Figura 19: Dendogramas obtenidos a partir del análisis de los geles en los cuales se estudió la estructura de la comunidad de los Filos (A) Actinobacteria (B) Firmicutes (C) Bacteroidetes de raíces y tallos de sorgo dulce (variedad M81E), crecidas en parcelas tratadas con fertilización química contrastante (+/-). Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las repeticiones de los tratamientos. El color verde hace referencia a la parcela con poca fertilización y el color rosa a la parcela con mayor cantidad. El programa utilizado fue Gel Compar II 6.5 y el dendograma construido según el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA

3.5 Análisis del efecto de la fertilización química sobre la estructura de la comunidad endofítica-diazótrofa de plantas de sorgo dulce (var. M81E)

Con el fin de estudiar la diversidad de la comunidad endofítica-diazótrofa, así como el efecto de la fertilización química sobre la misma, en una primera instancia se realizó una PCR anidada en base al gen *nifH*, a partir del ADN endofítico extraído de raíces y tallos de sorgo dulce. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de poliacrilamida desnaturante (DGGE) y las imágenes obtenidas a partir de los mismos, analizados mediante el programa GelCompar II 6.5.

En la figura 20 se muestra el análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR de la comunidad endofítica-diazótrofa. El análisis de la misma mostró un mayor número de bandas en el tallo (inferior y superior), en comparación con el de las raíces, así como bandas específicas en cada órgano mencionado. Por otra parte cuando se analizó el órgano tallo, se observó que la intensidad de las bandas comunes pertenecientes a la condición -F, son menos intensas que en la condición +F. Asimismo cuando se comparan los tratamientos en este órgano, se observan bandas únicas al tratamiento +F. Sin embargo, cuando se comparan los tratamientos en la raíz (+/- F) se observó que los mismos comparten la mayoría de las bandas.

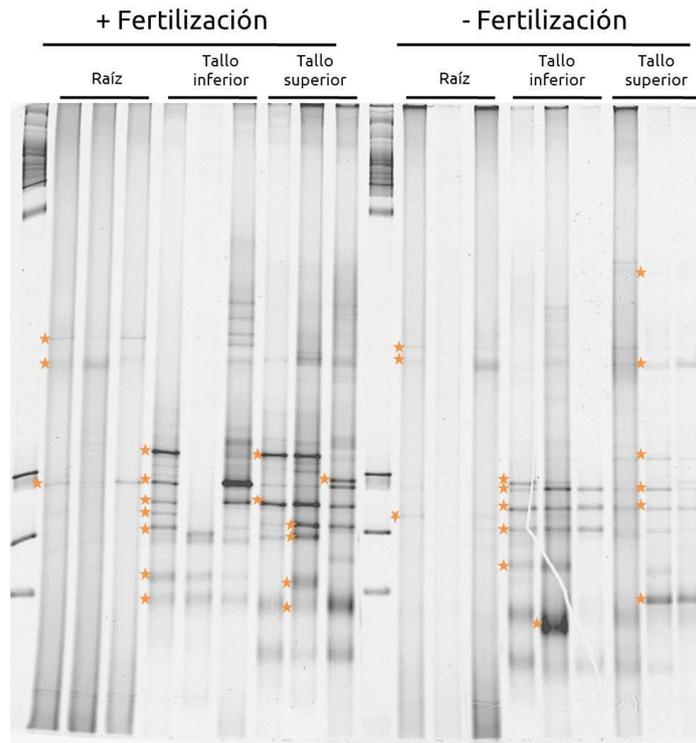


Figura 20: Análisis mediante DGGE de los productos de amplificación por PCR de la comunidad endofítica-diazótrofa, de muestras de raíces y tallos de sorgo dulce (variedad M81E). +Fertilización: parcela tratada con alta dosis de fertilizante químico-Fertilización: parcela tratada con baja dosis de fertilizante químico. Aquellas bandas marcadas con * a la izquierda, fueron las seleccionadas para su identificación mediante secuenciación del gen *nifH*.

La imagen del gel de la figura 20 fue analizada mediante el programa Gel Compar II 6.5 y como resultado del análisis del mismo se obtuvo el dendograma que se muestra en la Figura 21.

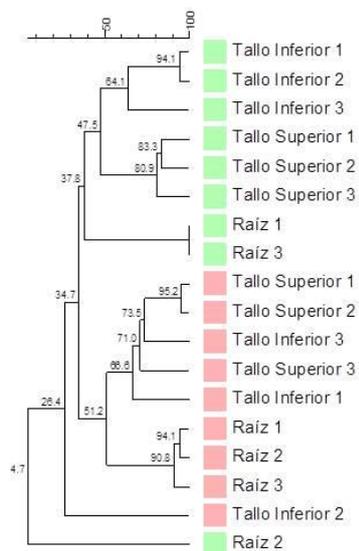


Figura 21:Dendograma resultante del análisis del gel en el cual se estudió la estructura de la comunidad endofítica-diazótrofa, de raíces y tallos de plantas de sorgo dulce (variedad M81E), crecidas en parcelas tratadas con fertilización química contrastante. Los números 1, 2 y 3 hacen referencia a las repeticiones de los tratamientos. El color verde hace referencia a la parcela con baja fertilización química y el color rosa a las parcela con alta fertilización química. El programa utilizado fue Gel Compar II 6.5 y el dendograma construido según el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGA.

El análisis del dendograma de la comunidad endofítica-diazótrofa, mostró que la misma se agrupó según el tratamiento (+/-F) con una similitud de 34,7%. Asimismo, en ambos tratamientos analizados, las muestras se agruparon según el órgano en estudio con un 51,2 y 37,8% de similitud para el tratamiento +F y -F respectivamente. Cabe resaltar que la réplica del tallo inferior 2 del tratamiento (+F), se agrupó por fuera de los 2 grandes grupos formados.

Por su parte en el tratamiento -F, se observó un agrupamiento entre la comunidad del tallo superior e inferior con un 47,5% de similitud. En este caso, la réplica de raíz 2 quedó por fuera de los 2 grupos formados y en otra rama que el tallo inferior 2 +F.

3.6 Identificación de las bandas seleccionadas a partir de los geles DGGE

De acuerdo al resultado de los análisis obtenidos, bandas de interés fueron recortadas de los geles DGGE en los cuales se analizó la comunidad endofítica. A partir de las mismas se eluyó el ADN para su posterior secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones, las mismas fueron editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x y comparadas con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLAST.

3.6.1 Identificación de las bandas seleccionadas a partir de los geles DGGE en los que se analizó el dominio Bacteria

A partir de los geles DGGE en los cuales se analizó el dominio Bacteria, se recortaron 39 bandas (B1-B39), las cuales fueron eluidas y secuenciadas. El análisis de las secuencias de 460 pares de bases mostró altas homología con el filo Proteobacteria (Tabla 10A). Este único filo bacteriano estuvo representado por géneros pertenecientes a las clases Betaproteobacteria (*Duganella*, *Aquabacterium*, *Thiomonas*, *Bordetella* y *Herbaspirillum*) y Gamaproteobacteria (*Pantoea*, *Salmonella*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Cronobacter*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*). Asimismo, mediante esta aproximación fueron identificadas 2 bandas cuya secuencia presento alta similitud de secuencia al cloroplasto de *Sorghum timorense* (Tabla 10A, B39).

Cabe destacar que los géneros *Duganella*, *Aquabacterium*, *Thiomonas*, *Bordetella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Cronobacter* y *Escherichia*, identificados mediante esta aproximación, no fueron detectados en la aproximación cultivable (Tablas 3 y 10A).

Tabla 10A: Identidad de secuencia nucleotídica de 460 pares de bases del gen *ADNr16S* de las bandas obtenidas de los geles de DGGE del Dominio Bacteria

Bandas	Numero de acceso NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
B1	NR_041973.1	<i>Pantoeacyripedii</i> DSM 3873	91%	0.0	99%
B2	NR_041973.1	<i>Pantoeacyripedii</i> DSM 3873	90%	0.0	99%
B3	NR_041973.1	<i>Pantoeacyripedii</i> DSM 3873	83%	0.0	99%
B4	NR_074910.1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT21	92%	0.0	99%
B5	NR_074910.1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2 1	89%	0.0	99%
B6	KF_998272.1	<i>Sorghum timorense</i> cloroplasto	88%	0.0	99%
B7	NR_025770.1	<i>Duganella violaceinigra</i> YIM 31327	91%	0.0	99%
B8	NR_103936.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> HS11286	81%	0.0	99%
B9	NR_043883.1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603	93%	0.0	99%

Bandas	Numero de acceso NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
B10	NR_104980.1	<i>Cronobacter helveticus</i> LMG 23732	83%	0.0	98%
B14	NR_108739.1	<i>Aquabacterium limnoticum</i> ABP-4	89%	0.0	97%
B16	NR_041628.1	<i>Thiomonas cuprina</i> Hoe5	84%	0.0	92%
B18	NR_103933.1	<i>Bordetella pertussis</i> CS	91%	0.0	95%
B19	NR_103933.1	<i>Bordetella pertussis</i> CS	86%	0.0	93%
B20	NR_027537.1	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	100%	0.0	97%
B21	NR_042021.1	<i>Achromobacter denitrificans</i> DSM 30026	100%	0.0	96%
B22	NR_102490.1	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA894	68%	0.0	88%
B23	NR_103936.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae HS11286	92%	0.0	100%
B24	NR_043883.1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603	91%	0.0	99%
B25	NR_042982.1	<i>Kosakonia radicincitans</i> D5	92%	0.0	99%
B26	NR_114420.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC5046	84%	0.0	91%
B27	NR_102966.1	<i>Pantoea vagans</i> C9-1	92%	0.0	99%
B28	NR_074598.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A	93%	0.0	94%
B29	NR_041973.1	<i>Pantoea cyripedii</i> DSM 3873	87%	0.0	98%
B30	NR_041973.1	<i>Pantoea cyripedii</i> DSM 3873	89%	0.0	99%
B31	NR_074910.1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2	71%	0.0	97%
B32	NR_114108.1	<i>Kluyvera cryocrescens</i> NBRC 102467	84%	0.0	98%
B33	NR_043883.1	<i>Pantoea dispersa</i> LMG 2603	86%	0.0	99%
B34	NR_103927.1	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	89%	0.0	99%
B35	NR_024804.1	<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i> CPW301	66%	0.0	94%
B36	NR_074875.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	93%	0.0	98%
B37	KF998272.1	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	72%	0.0	99%
B38	NR_102966.1	<i>Pantoea vagans</i> C9-1	91%	0.0	99%
B39	KF_998272.1	<i>Sorghum timorense</i> cloroplasto	88%	0.0	99%

Tabla 10B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del gel de DGGE del Dominio Bacteria

+ Fertilización (+F)			- Fertilización (-F)		
Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior	Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior
B2 (<i>Pantoea</i>)	B9 (<i>Pantoea</i>)	* (+)	B14 (<i>Aquabacterium</i>)	B24 y B30 (<i>Pantoea</i>)	B33 (<i>Pantoea</i>)
-	B8 (<i>Klebsiella</i>)	* (+)	* (=)	B23 (<i>Klebsiella</i>)	B32 (<i>Kluyvera</i>)
B5 (<i>Salmonella</i>)	B10 (<i>Cronobacter</i>)	* (+)	B18 (<i>Bordetella</i>)	B26 (<i>Klebsiella</i>)	B36 (<i>Stenotrophomonas</i>)
-	* (=)	* (=)	B20 (<i>Bordetella</i>)	B27 (<i>Pantoea</i>)	B38 (<i>Pantoea</i>)
B6 (Cloroplasto)	* (=)	* (=)	* (=)	B39 (Cloroplasto)	B28 (<i>Pseudomonas</i>)

(*) Presencia de banda (-) Ausencia de banda (+, =, <) Mayor, igual y menor intensidad respectivamente.

En referencia a la identidad así como a la intensidad y presencia diferencial de las mismas; se observó que en el caso de las bandas comigrantes B2B9, B24, B30 y B33, las mismas presentaron secuencias con alta homología de secuencias que pertenecieron al género *Pantoea*. Sin embargo, la banda comigrante con las mencionadas B14, perteneció al género *Aquabacterium* (Tabla 10B). De este grupo de bandas, las bandas B9, B24, B30 y B33, están presentes en el tallo de ambos tratamientos (+/-) con igual intensidad, mientras que en la raíz solo se observó la misma intensidad en unas de las réplicas ensayadas.

En referencia a las bandas comigrantes B8 y B23, los resultados mostraron que las mismas pertenecieron al género *Klebsiella* y están presentes con la misma intensidad en el tallo de ambos tratamientos. Sin embargo, la banda B32, comigrante con las antes mencionadas y de igual intensidad, perteneció al género *Kluyvera*. Por su parte, en la raíz de ambos tratamientos, solo se observó una banda comigrante a las mencionadas, pero menos intensa, en el tratamiento con menor fertilización química (-F).

En cuanto a las bandas comigrantes B5, B10, B18, B26 y B36, los resultados mostraron que las secuencias de dichas bandas pertenecieron a diferentes géneros dentro de las clases Gama- y Betaproteobacteria (Tabla 10A). Cabe destacar que una banda comigrante al conjunto de bandas anteriores y de igual intensidad, se observó en el tallo superior en el tratamiento +F.

Por otra parte y en relación al conjunto de bandas comigrantes B20, B27 y B38, los resultados mostraron que la primera banda perteneció al género *Bordetella* (Betaproteobacteria), mientras que las 2 últimas pertenecieron al género *Pantoea* (Gamaproteobacteria). Bandas comigrantes a las previamente mencionadas se observaron en el tallo con la misma intensidad (tratamiento +F), a excepción de la raíz.

Por último, y con respecto a las bandas comigrantes B6, B28 y B39, los resultados mostraron que las secuencias de las bandas B6 y B39 tienen una alta similitud con el cloroplasto de *Sorghum timorense*; mientras que la banda comigrante (B28) presentó una alta similitud con el género *Pseudomonas* (Tabla 10B).

3.6.2 Identificación de bandas de interés obtenidas a partir del gel DGGE de la clase Alfabroteobacteria

De las bandas seleccionadas y secuenciadas a partir del gel de DGGE en el que se estudió la diversidad de la clase Alfabroteobacteria, el 45% de las mismas presentó identidad con secuencias pertenecientes a la clase esperada. Del conjunto de bandas identificadas según la clase esperada, se obtuvieron los siguientes géneros; *Agrobacterium*, *Ancylobacter*, *Mesorhizobium*, *Brevundimonas*, *Blastochloris*, *Pleomorphomonas* y *Caulobacter*. De los mismos, el único género obtenido en la aproximación cultivable fue *Agrobacterium* (Tablas 3 y 11A).

Tabla 11A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen *ADNr16S* de las bandas obtenidas de los geles de DGGE de Alfabroteobacteria

Bandas	Numero de acceso NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
B5a	NR_074136.1	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	87%	0.0	86%
B12a	NR_026519.1	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> AF3.10	90%	0.0	99%
B13a	NR_044393.1	<i>Ancylobacter oerskovii</i> NS05	98%	0.0	94%
B14a	NR_042358.1	<i>Mesorhizobium thioganicum</i> SJT	63%	0.0	90%
B15a	NR_041712.1	<i>Blastochloris viridis</i> DSM 133	43%	0.0	91%
B16a	NR_042358.1	<i>Mesorhizobium thioganicum</i> SJT	63%	0.0	88%
B17a	NR_037106.1	<i>Brevundimonas variabilis</i> CB17	93%	0.0	99%
B18a	NR_114056.1	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> NBRC 102288	91%	0.0	98%
B19a	NR_114056.1	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> NBRC 102288	92%	0.0	99%
B20a	NR_074208.1	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756	50%	0.0	91%

Tabla 11B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del análisis del gel de DGGE de las Alfaproteobacteria

+ Fertilización (+F)			- Fertilización (-F)		
Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior	Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior
B5 (<i>Brevundimonas</i>)	-	B12 (<i>Agrobacterium</i>)	B16 (<i>Mesorhizobium</i>)	* (↵)	* (↵)

Las letras contiguas al número hacen referencia al grupo bacteriano en estudio (**a**) Alfaproteobacteria. (*) Presencia de banda (-) Ausencia de banda (+, =, ↵) Mayor, igual y menor intensidad respectivamente

En relación a la presencia diferencial de algún género en un tratamiento u órgano determinado, los resultados mostraron que en los gels DGGE de las Alfaproteobacteria no se observaron bandas únicas. Sin embargo, se detectó una disminución de la intensidad de las bandas comigrante del tallo en el tratamiento -F, al compararse las con las bandas comigrantes B5a, B12a y B16a del tratamiento +F, las cuales pertenecieron a géneros distintos y presentaron igual intensidad entre ellas (Tabla 11B).

3.6.3 Identificación de bandas de interés, obtenidas a partir del gel DGGE de la clase Betaproteobacteria

Cuando se analizaron las secuencias de las bandas seleccionadas a partir del gel de la clase Betaproteobacteria, los resultados mostraron que el 100% de las mismas pertenecieron a géneros de la clase esperada. En este caso se identificaron únicamente los géneros *Massilia* y *Methyloversatilis*, los cuales no fueron identificados mediante la aproximación cultivable (Tablas 3 y 12A). Como se mencionó anteriormente, el perfil de bandas en este caso fue similar para cada tratamiento y órgano sin embargo las bandas presentaron estar relacionadas con diferentes géneros bacterianos, *Massilia* (bandas B1b-B5b y B8b-B11b) y *Methyloversatilis* (bandas B6b y B7b)

Tabla 12A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen *ADNr16S* de las bandas obtenidas de los gels de DGGE de Betaproteobacteria

Bandas	Numero de acceso NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
B1b	NR_043308.1	<i>Massilia albidiflava</i> 45	92%	0.0	99%
B2b	NR_043308.1	<i>Massilia albidiflava</i> 45	83%	0.0	98%
B3b	NR_043310.1	<i>Massilia lutea</i> 101	93%	0.0	98%
B4b	NR_043308.1	<i>Massilia albidiflava</i> 45	91%	0.0	98%
B5b	NR_043308.1	<i>Massilia albidiflava</i> 45	81%	0.0	98%
B6b	NR_043813.1	<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5	35%	0.0	92%
B7b	NR_043813.1	<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5	53%	0.0	97%
B8b	NR_042653.1	<i>Massilia niastensis</i> 5516S-1	91%	0.0	97%
B9b	NR_044570.1	<i>Massilia niastensis</i> 5516S-1	84%	0.0	96%
B10b	NR_044570.1	<i>Massilia niastensis</i> 5516S	44%	0.0	90%
B11b	NR_044570.1	<i>Massilia niastensis</i> 5516S	88%	0.0	97%

La letra contigua al número hacen referencia al grupo bacteriano en estudio; (**b**) Betaproteobacteria

3.6.4 Identificación de bandas de interés obtenidas a partir del gel DGGE del filo

Actinobacteria

Por otra parte, cuando se identificaron las bandas seleccionadas del gel en el cual se estudió la diversidad del filo Actinobacteria, los resultados mostraron una gran diversidad de géneros pertenecientes a este filo incluyendo *Streptoalloteichus*, *Catenulispora*, *Frigoribacterium*, *Cryobacterium*, *Sediminihabitans*, *Acidothermus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Actinokineospora* y *Williamsia*, ninguno de los cuales fue identificado mediante la aproximación cultivable (Tablas 3 y 13A).

Los resultados obtenidos en este gel mostraron que las bandas comigrantes y exclusivas del tallo (B6ac, B7ac y B11ac), pertenecieron a géneros bacterianos diferentes. Lo mismo ocurrió con las bandas comigrantes B2ac y B8ac, así como las bandas comigrantes B3ac y B9ac, exclusivas de la raíz (Tabla 13B).

Tabla 13A: Identidad de secuencia nucleotídica del gen *ADNr16S* de las bandas obtenidas de los geles de DGGE de Actinobacteria

Bandas	Numero de acceso NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
B1ac	NR_041652.1	<i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> NBRC 16177	49%	0.0	96%
B2ac	NR_109018.1	<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928	39%	0.0	94%
B6ac	NR_104994.1	<i>Cryobacterium luteum</i> Hh15	70%	0.0	95%
B7ac	NR_114322.1	<i>Sediminihabitans luteus</i> H97-3	98%	0.0	96%
B8ac	NR_074501.1	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	63%	0.0	94%
B9ac	NR_104839.1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317	84%	0.0	99%
B10ac	NR_041099.1	<i>Microbacterium hominis</i> DSM 12509	87%	0.0	88%
B11ac	NR_044544.1	<i>Actinokineospora enzanensis</i> IFO 16517	74%	0.0	89%
B12ac	NR_041199.1	<i>Williamsia marianensis</i> MT8	78%	0.0	93%
B13ac	NR_112004.1	<i>Microbacterium hominis</i> IFO 15708	84%	0.0	99%
B14ac	NR_040872.1	<i>Actinokineospora enzanensis</i> IFO 16517	88%	0.0	93%
B15ac	NR_043263.1	<i>Williamsia marianensis</i> MT8	87%	0.0	98%

Tabla 13B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del gel de DGGE de Actinobacteria

+ Fertilización (+F)			- Fertilización (-F)		
Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior	Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior
-	B6 (<i>Cryobacterium</i>)	B7 (<i>Sediminihabitans</i>)	-	B11 (<i>Actinokineospora</i>)	* (+)
B2 (<i>Catenulispora</i>)	-	-	B8 (<i>Acidothermus</i>)	-	-
* (+)	-	-	B9 (<i>Curtobacterium</i>)	-	-

Las letras contiguas al número hacen referencia al grupo bacteriano en estudio; **(ac)** Actinobacteria **(*)** Presencia de banda **(-)** Ausencia de banda **(+,=,≠)** Mayor, igual y menor intensidad respectivamente

3.6.5 Identificación de las bandas obtenidas a partir del gel DGGE del filo Firmicutes

Finalmente, al analizar los géneros obtenidos a partir de las bandas extraídas del gel de DGGE en el cual se estudió la diversidad dentro del filo Firmicutes, los resultados mostraron que las mismas pertenecieron a los géneros relacionados con este filo incluyendo: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Macrococcus* y *Exiguobacterium*. Dentro de estos géneros, únicamente los 2 primeros fueron identificados mediante la aproximación cultivable (Tablas 3 y 14A).

En este gel, las bandas B1f, B2f y B3f así como sus bandas comigrantes, están presentes exclusivamente en la raíz en ambos tratamientos estudiados y fueron identificados como pertenecientes al género *Bacillus*. Por otro lado, el gel mostró la presencia de un conjunto de bandas comigrantes a B10f y B11f, pertenecientes a diferentes géneros bacterianos, en todos los órganos y tratamientos estudiados (Tabla 14B).

Tabla 14A: Similitud de secuencia nucleotídica del gen *ADNr16S* de las bandas obtenidas de los gels de DGGE de Firmicutes

Bandas	Numero de acceso NCBI	Mejor hit	Cobertura	e-value	Identidad máxima
B1f	NR_074290.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	100%	0.0	98%
B2f	NR_036766.1	<i>Bacillus bataviensis</i> IDA1115	90%	0.0	98%
B3f	NR_036766.1	<i>Bacillus bataviensis</i> IDA1115	93%	0.0	98%
B4f	NR_036847.1	<i>Macrococcus brunensis</i> CCM 4811	29%	0.0	99%
B5f	NR_043478.1	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> DSM 6208	28%	0.0	99%
B6f	NR_074995.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	30%	0.0	99%
B8f	NR_042347.1	<i>Exiguobacterium indicum</i> HHS 31	28%	0.0	99%
B10f	NR_036766.1	<i>Bacillus bataviensis</i> IDA1115	28%	0.0	97%
B11f	NR_036828.1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. anaerobius MVF-7	28%	0.0	98%

Tabla 14B: Tabla comparativa de bandas comigrantes del gel de DGGE de Firmicutes entre tratamientos y sus intensidades

	+ Fertilización (+F)			- Fertilización (-F)		
	Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior	Raíz	Tallo Inferior	Tallo Superior
B1, B2 y B3 (<i>Bacillus</i>)	-	-	-	*	-	-
	*	*	*	(+)		*
	(+)	(+)	(+)	B10 (<i>Bacillus</i>)	B11 (<i>Staphylococcus</i>)	(+)

Las letras contiguas al número hacen referencia al grupo bacteriano en estudio; **(f)** Firmicutes. **(*)** Presencia de banda **(-)** Ausencia de banda **(+, =, <)** Mayor, igual y menor intensidad respectivamente

3.7 Análisis del efecto de la fertilización química sobre la diversidad bacteriana endofítica y endofítica-diazótrofa asociada a sorgo dulce según los índices de diversidad alfa

Para evaluar el impacto de la fertilización química sobre la diversidad bacteriana endofítica y endofítica-diazótrofa asociada a sorgo dulce se calcularon los índices de diversidad alfa (Simpson 1-D y Shannon H). Para esto, a partir de los geles de DGGE obtenidos y utilizando las curvas densitométricas, se obtuvieron matrices numéricas cuantitativas las cuales fueron empleadas como base para el cálculo de los índices mencionados (Tabla 15). De esta manera, se obtuvo información sobre la presencia de una banda en particular, en relación a la totalidad de las bandas presentes. Esto permite determinar que órgano es más diverso en relación al tratamiento en estudio (+/- F).

Tabla 15: Índices de diversidad alfa calculados para los órganos en condiciones contrastantes de fertilización química

Tratamiento	Población bacteriana endofítica		Población bacteriana endofítica-diazótrofa	
	Simpson 1-D	ShannonH	Simpson1-D	ShannonH
R+F*	0,87 a	2,33 a	0,71 a	1,51 a
R -F	0,91 a	2,69 a	0,62 a	1,44 a
T+F	0,88 a	2,54 a	0,81 a	1,93 a
T -F	0,87 a	2,44 a	0,75 a	1,69 a

*+F/-F: alta o baja fertilización química. R: raíz, T: tallo. Medias entre 2 tratamientos que poseen la misma letra no son significativamente diferentes por el test de LSD 0.10.

Con respecto a la población bacteriana endofítica, valores máximos para ambos índices, fueron observados en la raíz, en el tratamiento con menor dosis de fertilización (R-F). Mientras que en el caso en el que se analizó la población bacteriana endofítica-diazótrofa, valores máximos para ambos índice fueron observados en el tallo del tratamiento con mayor dosis de fertilización (T+F).

Según ambos índices, la diversidad de la población bacteriana endofítica asociada a sorgo dulce de las raíces así como de los tallos, no varía significativamente cuando se comparan los tratamientos (+/-). Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en estos índices al comprarse los diferentes órganos (raíz y tallo).

La diversidad de las poblaciones bacteriana endofítica y endofítica-diazótrofa no se ve afectada según la dosis de fertilización utilizada; sin embargo los resultados mostraron una tendencia para ambos índices calculados en la población bacteriana endofítica-diazótrofa en raíz y tallo, la cual es menos diversa cuando la fertilización química es menor.

4.0 Discusión

4.3 Análisis de la comunidad bacteriana endofítica y endofítica-diazótrofa asociada a plantas de sorgo dulce (variedad M81E), mediante PCR-DGGE

4.3.1 Análisis del efecto de la fertilización química en la comunidad bacteriana endofítica asociada a sorgo dulce

Con el fin de determinar el efecto de la fertilización química en la estructura de la comunidad bacteriana asociada a sorgo dulce, se aisló ADN bacteriano a partir de plantas de sorgo dulce crecidas en parcelas con fertilización química contrastante (alta y baja). El ADN obtenido se usó como molde para la amplificación por PCR de una región del gen *ADNr 16S* bacteriano, para estudiar la diversidad del Dominio *Bacteria*. Los amplicones obtenidos fueron analizados mediante la técnica de DGGE, analizándose los geles resultantes con el software Gel Comprer II 6.5. Bandas de interés de los diferentes tratamientos fueron recortadas y el ADN contenido en las mismas identificado por secuenciación.

Cuando se analizaron los patrones de banda, las comunidades bacterianas se agruparon según el órgano en estudio (raíz o tallo) y dentro de cada órgano según tratamiento.

Los resultados de esta aproximación mostraron que las bandas secuenciadas, a partir del gel en el cual se estudió la diversidad bacteriana total, presentaron identidad con géneros bacterianos pertenecientes a las clases Betaproteobacteria y Gamaproteobacteria del filo Proteobacteria. Una situación similar se observó cuando se estudió la diversidad endofítica bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce pero empleando un juego de cebadores diferentes. Al igual que aquí, en el trabajo mencionado se describió una baja diversidad de filos (Cianobacteria, Proteobacteria y Firmicutes), identificándose solamente un único género en cada uno de los mismos (170).

Por otro lado, cuando se estudió la diversidad bacteriana endofítica de plantas de pasto elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) empleando los mismos cebadores que en esta tesis, los resultados mostraron la identificación de 9 filos bacterianos diferentes (171). Asimismo, cuando los mismos cebadores fueron empleados para el estudio de la diversidad bacteriana asociada a maíz, los resultados mostraron la identificación de distintos filos bacterianos los cuales contenían a una amplia gama de géneros, destacándose una alta proporción de Proteobacteria (163).

Los resultados obtenidos en esta tesis y teniendo en cuenta que no todas las bandas fueron secuenciadas, mostraron un sesgo en los cebadores generales empleados. Esto se refleja en el hecho de que se logró la amplificación únicamente del filo Proteobacteria y que por otro lado, al emplearse cebadores específicos para filos, si se logró identificar filos bacterianos no obtenidos con los cebadores generales. También puede ser atribuido a la limitación de la técnica de PCR.

Cuando se analizó al detalle los patrones de bandas de los geles obtenidos, se observó la presencia o ausencia de diferentes géneros bacterianos según el órgano o la dosis de fertilización química estudiada. Por ejemplo, a partir de los resultados obtenidos, se puede especular que la fertilización química estaría afectando la presencia de los géneros *Pantoea*, *Klebsiella* y *Kluyvera* en la raíz. Sin embargo, para confirmar esta afirmación, sería necesario contar con la identidad del resto de las bandas comigrantes en este órgano.

Es interesante resaltar todos los géneros identificados mediante esta aproximación han sido identificados como asociados a plantas (Sección 4.1.3). Asimismo, cabe resaltar que mediante esta aproximación también se pudieron identificar los géneros *Klebsiella*, *Duganella*, *Thiomonas Bordetella*, *Cronobacter*, *Salomonella*, *Escherichia* y *Aquabacterium*, los cuales no fueron detectados mediante la aproximación cultivable. Es interesante notar que diversos reportes han descripto a los mismos como asociados a diferentes plantas de interés agrícola incluso como endófitos(14, 42, 98, 172–175).

4.3.2 Efecto de la fertilización química en la comunidad bacteriana endofítica pertenecientes a los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes asociada a sorgo dulce

Por otra parte, se estudió específicamente el efecto de la fertilización química sobre las clases Alfa, Beta y Gamaproteobacteria, mediante la amplificación de gen *ADNr 16S* con cebadores reportados como específicos para estas clases (166, 168).

Los resultados mostraron que los cebadores utilizados para la clase Alfaproteobacteria, no fueron específicos dado que el 55% de las bandas secuenciadas no mostraron identidad con géneros pertenecientes a esta clase (Tabla 11A) como lo reportado (166, 168). Al analizarse la presencia diferencial de las bandas y según los resultados obtenidos, se podría especular que la fertilización química estaría afectando la presencia del género *Agrobacterium* en tallo. Sin embargo para confirmar esta afirmación, es necesario contar con la secuencia de las bandas comigrantes presentes en el otro tratamiento. Por otra parte, cabe destacar que todos los géneros identificados mediante secuenciación de las bandas del gel de las Alfaproteobacteria, han sido previamente descriptos como asociados a plantas (Tabla 11A y Sección 5.1.3 en discusión)(134, 176–179).

En referencia al estudio de la diversidad de la clase de las BetaProteobacteria, los resultados mostraron que los cebadores utilizados fueron específicos, dado que el 100% de las secuencias obtenidas pertenecieron a géneros dentro de esta clase. Es interesante el observar que los resultados mostraron la identificación de únicamente 2 géneros, *Massilia* y *Methyloversatilis* (Tabla 12A). Ambos géneros identificados, han sido previamente descriptos como endófitos asociados a plantas de interés incluyendo arroz, maíz y álamo(176, 177, 179).

Por otro parte, otro de los filos estudiado mediante el empleo de cebadores específicos fue el de Actinobacteria. Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de bandas seleccionadas mostraron que el 100% de las mismas presentaron similitud con géneros pertenecientes al filo bacteriano en estudio (Tabla 13A). Estos resultados demostraron la especificidad de los cebadores empleados para el filo Actinobacteria como ha sido reportado en otros trabajos (165, 166). En relación a la presencia diferencial de bandas y su identidad, los resultados mostraron que los géneros *Cryobacterium*, *Sediminihabitans* y *Actinokineospora* resultaron ser específicos de tallo, no encontrándose en raíz. Por otro lado, también se observaron bandas exclusivas en raíz correspondientes a los géneros *Catenulispora*, *Acidothermus* y *Curtobacterium* (Tabla 13B). De los géneros mencionados, *Cryobacterium*, *Actinokineospora*, *Catenulispora* y *Curtobacterium*, han sido previamente descriptos como asociados tanto a la filósfera como a la rizósfera de diversas plantas (180). De la totalidad de los géneros obtenidos en esta aproximación perteneciente a

Actinobacteria (Tabla 13A) y de acuerdo a la bibliografía consultada, este sería el primer reporte de los géneros *Streptoalloteichus*, *Sediminihabitans* y *Acidothermus* como asociados a planta.

Por último, y con respecto al filo Firmicutes, el 100% de las bandas seleccionadas del gel para su identificación, dieron identidad con secuencias pertenecientes a géneros de este filo (Tabla 14A) hecho que valida los cebadores empleados tal como lo fue para el trabajo original en el que fueron reportados (167). En relación a las bandas identificadas, se pudo observar que la localización del género *Bacillus* fue exclusiva de raíz (Tabla 14B). Tal como fue expuesto en la sección 4.1.3, el género *Bacillus*, ha sido previamente reportado como asociados a la rizósfera de sorgo dulce y descrito como biocontrolador pero no como endófitos asociados a este cultivo (85, 86). Por otro lado, del resto de los géneros identificados, *Staphylococcus*, *Macroccoccus* y *Exiguobacterium*; los mismos han sido previamente reportados como endófitos de pasto elefante, álamo y papa respectivamente (171, 181, 182).

4.3.3 Análisis del efecto de la fertilización química en la comunidad bacteriana endofítica-diazótrofa asociada a sorgo dulce

La misma aproximación empleada para el estudio de la diversidad bacteriana (Sección 5.2.1) fue utilizada para el estudio de la estructura de la comunidad endofítica-diazótrofa, así como para el estudio de cómo la misma es afectada por la fertilización química. Para esto, en la técnica de DGGE se utilizaron cebadores específicos para el gen codificante de la subunidad alfa de la enzima nitrogenasa, *nifH*.

La FBN ha sido demostrada como una fuente de entrada de N muy importante en el suelo (183). Los diazótrofos están adaptados a suelos con distintas condiciones físicas y químicas siendo poco dominantes en los ecosistemas terrestres. Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados demostraron que la PCR anidada es necesaria para el estudio de la diversidad de esta población, dado que el número de diazótrofos en relación a la comunidad total es menor.

Los resultados mostraron que las comunidades diazotróficas se estructuraron según la dosis de fertilización química empleada (+/-F). Asimismo, dentro cada dosis de fertilización empleada, las comunidades se agruparon según los órganos (raíz/tallo). En este caso, es interesante el hecho de que en el tratamiento con baja fertilización química (-F), la comunidad del tallo se agrupó de acuerdo a si era la parte superior o inferior. Según lo antes expuesto, en las condiciones estudiadas en nuestro trabajo y los resultados obtenidos a partir del dendograma, se puede concluir que la comunidad bacteriana endofita-diazótrofa asociada a sorgo dulce se ve afectada por la dosis de fertilización química utilizada.

Nuestros resultados concuerdan con trabajos previos los cuales estudiaron el efecto de la fertilización química en la comunidad diazótrofa asociada a diferentes variedades de sorgo dulce (184). Sin embargo, en un reporte en el cual se estudió la expresión y actividad de la enzima nitrogenasa en la comunidad rizosférica asociada a cultivos de arroz, los resultados mostraron que no hubieron diferencias significativas entre tratamientos con dosis contrastante de fertilizante químico (185). Teniendo en cuenta lo antedicho se puede concluir que las comunidades diazotrófica asociadas a estos 2 cultivos, son influenciadas distintamente por la fertilización química hecho que probablemente dependa del tipo de planta así como de la variedad.

4.4 Efecto de la fertilización química sobre la diversidad de las comunidades bacterianas endófitas y endofítica-diazótrofa asociadas a sorgo dulce

Con la finalidad de estudiar el efecto de la fertilización química sobre ambas comunidades, se emplearon los índices de diversidad alfa de Shannon y Simpson. Esto nos permitió evaluar si la diversidad bacteriana observada, es afectada por la fertilización química empleada.

En ambas poblaciones estudiadas, se obtuvieron valores de H (índice de Shannon) que pueden estar explicados por la gran cantidad de bandas obtenidas y la ausencia de pocas bandas pertenecientes a bacterias dominantes.

En conjunto, los resultados del análisis mostraron que no hubo diferencias significativas entre los 2 tratamientos (+/-F) ni entre órganos en ninguna de las 2 poblaciones endofítica bacteriana y bacteriana endofítica-diazótrofa. Por el contrario, si se reportaron diferencias significativas cuando se estudió el efecto de la fertilización química nitrogenada en la comunidad rizosférica asociada a pepino y cebada (186). La diferencia con los resultados obtenidos en esta tesis, podrían estar explicados en base a la comunidad bacteriana en estudio (rizosférica/endofítica). En el caso de la población rizósfera, la misma está constantemente expuesta a fluctuaciones de nutrientes presentes en el suelo así como a los exudados de las plantas, mientras que por otro lado el ambiente dentro de la planta es más estable en relación a las fluctuaciones nutricionales, lo cual no afectaría notoriamente a la comunidad.

Por otro lado, el análisis del efecto de la fertilización química sobre la población bacteriana endofítica-diazótrofa, asociada a la variedad M81E de sorgo dulce, mostró resultados similares a los obtenidos cuando se determinó el impacto de la fertilización química nitrogenada, en condiciones de invernáculo, sobre la comunidad diazótrofa asociada a variedades de sorgo dulce cultivadas en Brasil (187). Sin embargo, estudios similares en plantas de arroz, pero empleando la técnica TRFLP, mostraron que la aplicación de fertilizante nitrogenado conlleva a la disminución de la diversidad bacteriana diazótrofa (188). Una posible explicación a la diferencia en los resultados obtenidos, podría radicar en el cultivo estudiado así como en las diferentes técnicas utilizadas.

A modo de resumen, en las condiciones estudiadas y con la metodología utilizada no se pudo determinar estadísticamente un efecto de la fertilización química sobre la diversidad de la comunidad bacteriana endofítica o endofítica-diazótrofa.

Conclusiones

Construcción y caracterización de una colección de probables endófitos bacterianos nativos asociados a la variedad comercial M81E de sorgo dulce (Sorghum bicolor).

En el presente trabajo se construyó y caracterizó una colección de probables endófitos bacterianos asociados a la variedad de sorgo dulce comercial M81E comúnmente utilizada en Uruguay. La misma presenta una amplia variedad de características PCV las cuales hacen a esta colección de gran interés. Más aún, los aislamientos *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45, mostraron ser PCV cuando se utilizaron como inoculantes en plantas de sorgo dulce, en condiciones de invernáculo.

Es interesante destacar que muchos de los aislamientos obtenidos en este trabajo han sido descritos por primera vez como posibles endófitos asociados a sorgo dulce, así también como promotores del crecimiento vegetal. La colección construida posee un gran potencial biotecnológico por lo que se continuará con su caracterización en sistemas más complejos con el objetivo final de producir un bioinoculante para las variedades de sorgo dulce de interés nacional.

Efecto de la fertilización química sobre la estructura de la comunidad bacteriana endofítica y endofítica-diazotrófica asociada a plantas de sorgo dulce

Los resultados obtenidos mediante la aproximación independiente de cultivo de esta tesis, mostraron que la comunidad endofítica se estructura según el órgano, mientras que la comunidad endofítica-diazótrofa se estructura según fertilización asociadas a plantas de sorgo dulce de la variedad en estudio.

Mediante esta aproximación se pudieron identificar géneros bacterianos no detectados en la aproximación cultivable los cuales en su mayoría han sido previamente descritos como asociados a plantas, ya sea como rizosféricos o como endófitos. Por último, los análisis estadísticos mediante el empleo de los índices de diversidad, concluyeron que en las condiciones ensayadas y mediante la metodología empleada, la fertilización química no afecta la diversidad alfa de las comunidades endofítica y endofítica-diazótrofa en ninguno de los casos estudiados.

Se debe considerar la fertilización química a la hora de modular el microbioma asociado con el fin de obtener el efecto benéfico a través de la inoculación bacteriana.

Perspectivas

A: Con respecto al capítulo 1 se plantea:

(1) Realizar estudios de infección de plantas de sorgo dulce inoculadas con los aislamientos PCV *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45, con la finalidad de definirlos como endófitos verdaderos. Para ello es necesario utilizar técnicas de microscopia, partiendo de plantas esterilizadas superficialmente y crecidas en condiciones *gnotobióticas*. Las técnicas a considerar serían:

(i) Microscopia de transmisión y marcaje con anticuerpos específicos contra los aislamientos *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45. De esta manera se confirmaría que los aislamientos sean los de interés y no bacterias presentes dentro de la semilla, estudiándose la colonización tanto exterior como interior a distintos tiempos.

(ii) Microscopia de barrido, mediante esta se visualizarían los primeros estadios de la colonización exterior y;

(iii) Microscopia de fluorescencia y técnicas moleculares utilizando cepa bacterianas marcadas con un gen reportero, con el fin de estudiar la colonización exterior e interior de las plantas.

(2) Ensayar los aislamientos con capacidad PCV *Rhizobium* sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 en condiciones de campo y concluir si los mismos son capaces de PCV en dichas condiciones

B: Con respecto al Capítulo 2, se plantea:

(1) Identificar las bandas extraídas del gel obtenido en el estudio de la comunidad endofítica-diazótrofa, mediante secuenciación del gen *nifH*. Con los resultados que se obtendrán, se podrá detectar si algún género diazótrofo en particular es afectado por la fertilización química.

(2) Realizar estudios filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas de ambas comunidades (endofítica general y endofítica-diazótrofa). De esta manera se podrá inferir las relaciones filogenéticas entre los géneros obtenidos en este trabajo así como con trabajos previos.

(3) Realizar estudios empleando la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) utilizando ambos genes (*ADNr 16S* y *nifH*). De esta manera se podrá relacionar la diversidad obtenida mediante la metodología de PCR-DGGE con la abundancia obtenida a partir de qPCR en ambas comunidades

Anexo

1. Medios de cultivo para bacterias

Medio DYGs

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

pH 6,5. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 18 g/l.

Medio LGI

Componentes	Cantidad
Azúcar cristal	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,015 g
Solución FeEDTA 1,64 %	4,0 mL
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g
Sol de vitaminas	1,0 mL
Extracto de levadura*	0,05 g
Azul de bromotimol 0,5 %	1,0 mL
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

pH 6,0-6,2. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 18 g/l. *Solo para medio sólido.

Solución de micronutrientes

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

Solución de vitaminas

Componentes	Cantidad
Biotina	0,01 g
Pyrodoxal-HCl	0,02 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

Medio para evaluar cepas solubilizadoras de fosfatos

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

Medio GL

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

pH 5,8. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 15 g/l.

2. Medio de cultivo para plantas

Medio Jensen

Componentes	Cantidad
CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,01 g
Solución de micronutrientes	1,0 mL
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

3. Otras soluciones

Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE)

Componentes	Concentración
Tris-Acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE)

Componentes	Concentración
Tris	0,089 M
Ácido Bórico	0,089 M
EDTA	0,002 M

Buffer PBS

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

pH 7,2.

Ann Microbiol
DOI 10.1007/s13213-014-0951-7

ORIGINAL ARTICLE

Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench)

Cintia Mareque · Cecilia Taulé · Martín Beracochea · Federico Battistoni

Received: 21 April 2014 / Accepted: 28 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2014

Abstract Sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) is cultivated in Uruguay in complementation with sugarcane (*Saccharum officinarum*) as a feedstock for bioethanol production. It requires the application of high levels of chemical fertilizer for optimal growth, which causes environmental degradation. Plant growth-promoting (PGP) bacteria are of biotechnological interest since they can improve the growth of several important agronomical crops. Of particular interest are endophytes, which are those bacteria that can be detected at a particular moment within the internal tissues of healthy plants from where they can promote their growth. The aims of this work were to isolate and characterize, as well as identify putatively endophytic bacteria associated with sweet sorghum (cv-M81E), and also to study the inoculation effects of selected isolates on sorghum growth. A collection of 188 putative endophytes from surface-sterilized stems and roots was constructed and characterized. Bacterial isolates were shown to belong to different genera including *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Herbaspirillum*, *Achromobacter*, *Rhizobium*,

Chryseobacterium, *Kocuria*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* and *Staphylococcus*. PGP and infection features were investigated in vitro, and revealed some promising biotechnological candidates. In addition, isolates UYSB13 and UYSB45 showed PGP effects in greenhouse assays. This work provides the basis for further studies under field conditions, with the final aim of developing an effective inoculant for sorghum.

Keywords Endophytes · Sweet sorghum · Plant growth promotion

Introduction

Fossil energy resources are depleting dramatically in order to meet the increasing world energy demands. Moreover, climate change caused by carbon emissions from fossil fuels reinforces the need to search for alternatively energy sources. Crop plants are one of the best sources of renewable energy, as they can be used as feedstock for biofuel production. With this aim, several complementary crops are cultivated in Uruguay, such as

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13213-014-0951-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Bibliografía

1. **Masjuki HH, Kalam M a., Mofijur M, Shahabuddin M.** 2013. Biofuel: Policy, Standardization and Recommendation for Sustainable Future Energy Supply. *Energy Procedia* **42**:577–586.
2. **Reis V, Lee S, Kennedy C.** 2007. Biological nitrogen fixation in sugarcane, p. 213–232. *In* Elmerich, C, Newton, W. (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria*.
3. **Gnansounou E, Dauriat A, Wyman CE.** 2005. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresour. Technol.* **96**:985–1002.
4. **Almodares A, Hadi MR.** 2009. Production of bioethanol from sweet sorghum : A review. *African J. Agric. Res.* **4**:772–780.
5. **Fogliata F.** 1995. Agronomía de la caña de azúcar, p. 1–10. *In* Tomo I: Tecnología, costos y producción. El graduado (Ed.), Tucumán, Argentina.
6. **Tesso TT, Claflin LE, Tuinstra MR.** 2005. Analysis of Stalk Rot Resistance and Genetic Diversity among Drought Tolerant Sorghum Genotypes. *Crop Sci.* **45**:645–652.
7. **Woods J 2000. ISS and S for BM the P for E and EP in SZ.** 2000. Integrating Sweet Sorghum and Sugarcane for Bioenergy: Modelling the Potential for Electricity and Ethanol Production in SE Zimbabwe. PhD Thesis: King's College London.
8. **Viator H, Alison M, Gravois K, Han K, Harrell D, Hogan A, Pittman W, Salassi M, Whatley J.** 2009. Sweet sorghum for biofuel production in Louisiana. *LA Agric.* **53**:16–17.
9. **Siri-Prieto G, Ernst O, Martinez-Haedo M, Albano S.** 2008. Productividad del sorgo dulce para la producción de etanol según variedad, época de siembra y población en el noroeste uruguayo.
10. **Adesemoye AO, Kloepper JW.** 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**:1–12.
11. **Döbereiner J.** 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* **29**:771–774.
12. **James EK, Olivares FL.** 1998. Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **17**:77–119.
13. **James EK.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *F. Crop. Res.* **65**:197–209.
14. **Rosenblueth M, Martínez-Romero E.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. plant-microbe Interact.* **19**:827–837.
15. **Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J.** 2005. Bacterial biofertilizers, p. 143–172. *In* Siddiqui, ZA (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
16. **Peters JW, Fisher K, Dean DR.** 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:335–366.
17. **Capone DG.** 1993. Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*.

18. **Lloret L, Martínez-Romero E.** 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**:43–60.
19. **Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y.** 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **22**:107–149.
20. **Lipton DS, Blanchar RW, Blevins DG.** 1987. Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings. *Plant Physiol.* **85**:315–317.
21. **Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL.** 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **157**:423–447.
22. **Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G.** 2013. Plant Growth Promotion by Microbes, p. 561. *In* Bruijin, FJ de (ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Vol 2 First Edit. John Wiley and Sons, Inc.
23. **Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J.** 2009. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* **321**:513–535.
24. **Schalk IJ, Hannauer M, Braud A.** 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**:2844–2854.
25. **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 Biol. Biochem.* **42**:669–678.
26. **Gyaneshwar P, James EKEK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK.** 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **183**:2634–2645.
27. **Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R a, Ulrich A, Hallmann J.** 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**:215–29.
28. **Li C-H, Zhao M-W, Tang C-M, Li S-P.** 2009. Population dynamics and identification of endophytic bacteria antagonistic toward plant-pathogenic fungi in cotton root. *Microb. Ecol.* **59**:344–356.
29. **Yang J-H, Liu H-X, Zhu G-M, Pan Y-L, Guo J-H.** 2008. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *J. Appl. Microbiol.* **104**:91–104.
30. **Lugtenberg B, Kamilova F.** 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**:541–556.
31. **Gray EJ, Smith DL.** 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**:395–412.
32. **Patten C, Glick B.** 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Micorbiology* **42**:207–220.
33. **Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R.** 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:425–48.
34. **Pliego C, Kamilova F, Lugtenberg B.** 2011. Plant Growth-Promoting Bacteria: Fundamentals and Exploitation, p. 295–343. *In* Maheshwari, DK (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

35. **Spaepen S, Das F, Luyten E, Michiels J, Vanderleyden J.** 2009. Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS Microbiol. Lett.* **291**:195–200.
36. **Pliego C, Kamilova F, Lugtenberg B.** 2011. Plant Growth-Promoting Bacteria: Fundamentals and Exploitation, p. 295–343. *In* Maheshwari, DK (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
37. **Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G.** 2013. Plant Growth Promotion by Microbes, p. 561. *In* Bruijn, FJ de (ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Vol 2 First Edit. John Wiley and Sons, Inc.
38. **Glick B, Cheng Z, Czarny J, Duan J.** 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:329–339.
39. **Ryan RPR, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**:1–9.
40. **Malfanova N, Lugtenberg B, Berg G.** 2013. Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there?, p. 393–403. *In* de Bruijn, FJ (ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley and Sons.
41. **Berg G.** 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**:11–18.
42. **Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W.** 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.* **55**:415–424.
43. **Hallmann J, Berg G.** 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes, p. 355. *In* Schulz, B, Boyle, C, Sieber, T (eds.), *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
44. **Mengoni A, Pini F, Huang L-N, Shu W-S, Bazzicalupo M.** 2009. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* Desv. *Microb. Ecol.* **58**:660–667.
45. **Manter D, Delgado J, Holm D, Stong R.** 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb. Ecol.* **60**:157–166.
46. **Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B.** 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**:28–36.
47. **Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, Friedrich F, Hurek T, Krause L, Linke B, McHardy AC, Sarkar A, Schneiker S, Syed AA, Thauer R, Vorhölter F-J, Weidner S, Pühler A, Reinhold-Hurek B, Kaiser O, Goesmann A.** 2006. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* **24**:1385–91.
48. **Bertalan M, Albano R, Pádua V De, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França L, Magalhães V, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Loureiro M, Nogueira E, Cidade D, Oliveira D, Simão T, Macedo JJ, Valadão A, Dreschsel M, Freitas F, Vidal M, Guedes H, Rodrigues E, Meneses C, Brioso P, Pozzer L, Figueiredo D, Montano H, Junior J, Souza G De, Flores Quintana VM, Ferreira B, Branco A, Gonzalez P, Guillobel H, Lemos M, Seibel L, Alves-Ferreira M, Satchetto-Martins G, Coelho A, Santos E, Amaral G, Neves A, Pacheco AB, Carvalho D, Lery L, Bisch P, Rössle SC, Úrményi T, Pereira AR, Silva R, Rondinelli E, Von Krüger W, Martins O, Baldani JI, Ferreira PCG.** 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* **10**:450.

49. **Deng Y, Zhu Y, Wang P, Zhu L, Zheng J, Li R, Ruan L, Peng D, Sun M.** 2011. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.* **2070-2071**:2070–2071.
50. **Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, Zhang Y-B, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S.** 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet.* **6**:e1000943.
51. **Weilharter A, Mitter B, Shin M V, Chain PSG, Nowak J, Sessitsch A.** 2011. Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *J. Bacteriol.* **193**:3383–4.
52. **Pedrosa O, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, Madeira HMF, Nodari RO, Osaku CA, Petzl-Erler ML, Terenzi H, Vieira LGE, Steffens MBR, Weiss VA, Pereira LF, Almeida MIM, Alves LR, Marin A, Araujo LM, Balsanelli E, Baura VA, Chubatsu LS, Faoro H, Favetti A, Friedermann G, Glienke C, Karp S, Kava-cordeiro V, Raittz RT, Ramos HJ, Ribeiro EMSF, Rigo LU, Rocha SN, Schwab S, Silva AG, Souza EMEM, Tadra-sfeir MZ, Torres RA, Dabul ANG, Soares MA, Gasques LS, Gimenes CCT, Valle JS, Ciferri RR, Correa LC, Murace NK, Pamphile J, Patussi E, Prioli AJ, Prioli SMA, Rocha C, Arantes OMN, Furlaneto M., Godoy LP, Oliveira CEC, Satori D, Vilas-boas LA, Watanabe M, Dambros P, Guerra MP, Mathioni SM, Santos KL, Steindel M, Vernal J, Barcellos FG, Campo RJ, Chueire LMO, Nicolás FM, Pereira-Ferrari L, Silva J, Gioppo N, Margarido V, Menck-Soares M, Pinto FGS, Simao R, Takahashi E, Yates MG.** 2011. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet.* **7**:1–10.
53. **Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D.** 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:748–757.
54. **Ryan R, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison M, Berg G, van der Lelie D, Dow J.** 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:514–525.
55. **Suzuki T, Shimizu M, Meguro A, Hasegawa S, Nishimura T, Kunoh H.** 2005. Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. *Actinomycetologica* **19**:7–12.
56. **Dörr J, Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* **30**:7–17.
57. **Balsanelli E, Serrato R, de Baura V, Sasaki G, Yates M, Rigo L, Pedrosa F, de Souza E, Monteiro R.** 2010. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environ. Microbiol.* **12**:2233–2244.
58. **Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka E.** 2005. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth- Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1685–1693.
59. **Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T.** 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. plant-microbe Interact.* **19**:181–188.
60. **Reinhold-Hurek B, Hurek T.** 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **17**:29–54.

61. **James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PPM, Olivares FL, Ladha JK.** 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. plant-microbe Interact.* **15**:894–906.
62. **Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S-W, Weon H-Y, Lakshminarasimhan C.** 2008. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microb. Ecol.* **55**:21–37.
63. **Ji X, Lu G, Gai Y, Zheng C, Mu Z.** 2008. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microb. Ecol.* **65**:565–573.
64. **Ji X, Lu G, Gai Y, Gao H, Lu B, Kong L, Mu Z.** 2010. Colonization of *Morus alba* L. by the plant-growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC Microbiol.* **10**:243.
65. **James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JI, Dobereiner J.** 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* **45**:757–766.
66. **Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM.** 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**:39–47.
67. **Bacon CW HD.** 2006. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility, p. 155–194. *In* Gnanamanickam, S (ed.), *Plant-associated bacteria*. Springer, The Netherlands.
68. **Sattelmacher B.** 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* **22**:167–192.
69. **James EK, Olivares FL, de Oliveira a L, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM.** 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* **52**:747–760.
70. **Suzuki T, Shimizu M, Meguro A, Hasegawa S, Nishimura T, Kunoh H.** 2005. Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. *Actinomycetologica* **19**:7–12.
71. **Grönemeyer JL, Burbano CS, Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 2011. Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. *Plant Soil* **356**:67–82.
72. **Sun Y, Cheng Z, Glick B.** 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**:131–136.
73. **Egener T, Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 1998. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Mol. plant-microbe Interact.* **11**:71–75.
74. **You M, Nishiguchi T, Saito A, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K.** 2005. Expression of the *nifH* Gene of a *Herbaspirillum* Endophyte in Wild Rice Species : Daily Rhythm during the Light-Dark Cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8183–8190.
75. **Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C.** 2001. Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and 15 N 2 Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif- Mutant Strains. *Mol. plant-microbe Interact.* **14**:358–366.

76. **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. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5285–5293.
77. **Boddey RM, Oliveira OCO, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VL, Dobereiner J.** 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* **174**:195–209.
78. **Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis VM, Sicardi M, Battistoni F.** 2012. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* **356**:35–49.
79. **Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R.** 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.* **24**:7–11.
80. **Brandi M, Clark E, Lindow S.** 1996. Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. *Can. J. Microbiol.* **42**:586–592.
81. **Glick B, Cheng Z, Czarny J, Duan J.** 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:329–339.
82. **Glick B.** 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**:1–7.
83. **Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT.** 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One* **3**:e2702.
84. **Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK.** 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Appl. Environmental Microbiol.* **68**:2198–2208.
85. **Budi SW, van Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S.** 1999. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5148–50.
86. **Martinez-Absalon SC, del C Orozco-Mosqueda M, Martinez-Pachecom M, Farias-Rodriguez R, Govindappa M, Santoyo G.** 2012. Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genet. Mol. Res.* **11**:2665–73.
87. **Bashan Y, Luz E.** 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth — A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 1st ed. Elsevier Inc.
88. **Okon Y, Labandera-Gonzalez CA.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1591–1601.
89. **Hugenholtz P.** 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* **3**:Reviews.
90. **Kent AD, Triplett EW.** 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:211–36.
91. **Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Oveas L.** 1998. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**:53–62.

92. **Rastogi G, Sani RK.** 2011. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment, p. 29–57. *In* Ahmad, I, Ahmad, F, Pichtel, J (eds.), *Microbes and Microbial Technology*. Springer New York, New York, NY.
93. **Hugenholtz P.** 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* 3:Reviews.
94. **Dahllöf I.** 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:213–217.
95. **Magurran AE.** 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing.
96. **Hill TCJ, Walsh K a, Harris J a, Moffett BF.** 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:1–11.
97. **Gilbert JA, Meyer F, Jansson J, Gordon J, Pace N, Ley R, Fierer N, Field D, Kyrpides N, Glöckner F, Klenk H-P, Wommack KE, Glass E, Docherty K, Gallery R, Stevens R, Knight R.** 2010. The Earth Microbiome Project: Meeting report of the “ 1st EMP meeting on sample selection and acquisition ” at Argonne National Laboratory October 6 th 2010. *Stand. Genomic Sci.* 3:249–253.
98. **Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM.** 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:634–63.
99. **Kennedy A, Stubbs T, Schillinger W.** 2004. Soil and Crop Management effects on Soil Microbiology, p. 295–326. *In* Magdoff, F, Weil, RR (eds.), *Soil organic matter in sustainable agriculture*. CRC Press. EE.UU.
100. **Turner TR, James EK, Poole PS.** 2013. The plant microbiome. *Genome Biol.* 14:1–10.
101. **Rastogi G, Sani RK.** 2011. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment, p. 29–57. *In* Ahmad, I, Ahmad, F, Pichtel, J (eds.), *Microbes and Microbial Technology*. Springer New York, New York, NY.
102. **Muyzer G, De Waal E, Uitterlinden A.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environmental Microbiol.* 59:695–700.
103. **Muyzer G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystem. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:317–322.
104. **Cavalcante V, Dobereiner J.** 1998. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23–31.
105. **RODRIGUES NETO J, MALAVOLTA JÚNIOR, V VICTOR O.** 1986. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol.* 12:16.
106. **Sarwar M, Kremer RJ.** 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:282–285.
107. **Penrose DM, Glick BR.** 2003. Technical Focus Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118:10–15.
108. **Sylvester-Bradley R, Askawa N, Latorraca S, Magalhães F, Oliveira L, Pereira R.** 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amaz. Acta Amazô.* 12:15–22.

109. **Schwyn B, Neilands JB.** 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 47–56.
110. **Rosconi F, Davyt D, Martínez V, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Zane H, Butler A, de Souza EM, Fabiano E.** 2013. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ. Microbiol.* **15**:916–27.
111. **Olson JB, Steppe TF, Litaker RW, Paerl H.** 1998. N₂-Fixing Microbial Consortia Associates with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microb. Ecol.* **36**:231–238.
112. **Poly F, Monrozier LJ, Bally R.** 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil **152**:95–103.
113. **Martinez-Rosales C, Castro-Sowinsky S.** 2011. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Res.* **30**:1–8.
114. **Kim S-J, Lee C-M, Han B-R, Kim M-Y, Yeo Y-S, Yoon S-H, Koo B-S, Jun H-K.** 2008. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**:44–51.
115. **Sack U, Hofrichter M, Fritsche W.** 1997. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**:227–234.
116. **Li X, Yan Z, Xu J.** 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**:353–362.
117. **Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart P.** 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods* **54**:269–276.
118. **Peeters E, Nelis HJ, Coenye T.** 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* **72**:157–65.
119. **Hulton CJS, Higgins CF, Sharp PM.** 1991. Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:825–834.
120. **Lane DJJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. *In* Stackebrandt, E, Goodfellow, M (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY.
121. **Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**:D590–6.
122. **Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lüssmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer K-H.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363–1371.
123. **Vincent JM.** 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Blackwell Scientific.
124. **InfoStat.** 2008. InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

125. **Dice LR.** 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species Lee R . Dice. *Ecol. Soc. Am.* **26**:297–302.
126. **Sokal RR, Michener CD.** 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships.
127. **Berg G, Hallmann J.** 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes, p. 53–67. *In* Schulz, B, Boyle, C, Sieber, T (eds.), *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin.
128. **Schulz BJE, Boyle CJC.** 2006. What are Endophytes?, p. 1–13. *In* Schulz, B, Boyle, C, Sieber, TN (eds.), *Microbial Root Endophytes*. Springer, Berlin.
129. **Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-kleiner AA, Azevedo JL.** 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* **6**:1244–1251.
130. **Elvira-Recuenco M, van Vuurde JW.** 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can. J. Microbiol.* **46**:1036–1041.
131. **McInroy JA, Kloepper JW.** 2007. Studies on Indigenous Endophytic Bacteria of Sweet Corn and Cotton, p. 19–28. *In* *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. Wiley-VCH Verlag GmbH.
132. **Montañez A, Blanco AR, Barlocco C, Beracochea M, Sicardi M.** 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Appl. Soil Ecol.* **58**:21–28.
133. **Shokri D, Emtiazi G.** 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogenfixing bacteria and its optimization by Taguchi design. *Curr. Microbiol.* **61**:217–225.
134. **Marasco R, Rolli E, Fusi M, Cherif A, Abou-Hadid A, El-Bahairy U, Borin S, Sorlini C, Daffonchio D.** 2013. Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *Biomed Res. Int.* **2013**:491091.
135. **Compant S, Mitter B, Colli-Mull J, Gangl H, Sessitsch A.** 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* **62**:188–197.
136. **Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Baldani JI, Passaglia LMP.** 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl. Soil Ecol.* **63**:94–104.
137. **Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL.** 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* **273**:91–99.
138. **Araújo WL, Maccheroni Jr. W, Aguilar-Vildoso CI, Barroso P a. V V, Saridakis HO, Azevedo JL.** 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* **47**:229–236.
139. **Bertrand H, Nalin R, Bally R, Cleyet-Marel JC.** 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol. Fertil. Soils* **33**:152–156.
140. **Baldani JI.** 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* **90**:35–46.
141. **James EK, Olivares FL, Baldani JI, Dobereiner J.** 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J. Exp. Bot.* **48**:785–797.

142. **Oliveira MN V, Santos TMA, Vale HMM, Delvaux JC, Cordero AP, Ferreira AB, Miguel PSB, Tótola MR, Costa MD, Moraes CA, Borges AC.** 2013. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can. J. Microbiol.* **59**:221–230.
143. **Coelho MRR, de Vos M, Carneiro NP, Marriel IE, Paiva E, Seldin L.** 2008. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**:15–22.
144. **Surette MA, Sturz A V, Lada RR, Nowak J.** 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* **253**:381–390.
145. **Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A.** 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.* **53**:306–16.
146. **Velázquez E, Rojas M, Lorite MJ, Rivas R, Zurdo-Piñeiro JL, Heydrich M, Bedmar EJ.** 2008. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stems of healthy sugarcane plants. *J. Basic Microbiol.* **48**:118–124.
147. **Brown SD, Utturkar SM, Klingeman DM, Johnson CM, Martin SL, Land ML, Lu T-YS, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier D a.** 2012. Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *J. Bacteriol.* **194**:5991–3.
148. **Asraful Islam SM, Math RK, Kim JM, Yun MG, Cho JJ, Kim EJ, Lee YH, Yun HD.** 2010. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Curr. Microbiol.* **61**:346–56.
149. **Sturz a. V, Kimpinski J.** 2004. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* **262**:241–249.
150. **Steenhoudt O, Vanderleyden J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:487–506.
151. **Lucy M, Reed E, Glick BR.** 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**:1–25.
152. **Bashan Y, Luz E.** 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth — A Critical Assessment *Advances in Agronomy*, 1st ed. Elsevier Inc.
153. **Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT.** 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One* **3**:e2702.
154. **Matiru VN, Dakora FD.** 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* **3**:1–7.
155. **Rashad M, Ragab A, Salem S.** 2001. The influence of some Bradyrhizobium and Rhizobium strains as plant growth promoting rhizobacteria on the growth and yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) plants under drought stress, p. 664–665. *In* J, HW, Schenk, MK, Bürkert, A, Claassen, N, Flessa, H, Frommer, WB, Goldbach, H, Olf, HW, Römheld, V, Sattelmacher, B, Schmidhalter, U, Schubert, S, Wirén, N, Wittenmayer, L (eds.), *Plant nutrition*. Springer Netherlands.

156. **Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN.** 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**:199–209.
157. **Verma SC, Ladha JK, Tripathi a K.** 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* **91**:127–41.
158. **Sergeeva E, Hirkala DLM, Nelson LM.** 2007. Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. *Plant Soil* **297**:1–13.
159. **Quecine MC, Araújo WL, Rossetto PB, Ferreira a, Tsui S, Lacava PT, Mondin M, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner a a.** 2012. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:7511–8.
160. **Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Nazim S, Gupta a. D, Mishra PK, Gupta HS.** 2007. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**:955–960.
161. **Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B.** 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **25**:28–36.
162. **Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM.** 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:232–6.
163. **Chelius MK, Triplett EW.** 2001. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* **41**:252–263.
164. **Heuer H, Hartung K, Wieland G, Kramer I, Smalla K.** 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1045–9.
165. **Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM.** 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3233–41.
166. **Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Mendonça-Hagler L, Smalla K.** 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* **232**:167–180.
167. **Garbeva P, van Veen J a, van Elsas JD.** 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb. Ecol.* **45**:302–16.
168. **Brons JK, van Elsas JD.** 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2717–27.
169. **Simonet P, Grosjean MC, Misra a K, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P.** 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3278–86.
170. **Ramond J-B, Tshabuse F, Bopda CW, Cowan D a., Tuffin MI.** 2013. Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities associated with arable sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Plant Soil* **372**:265–278.

171. **Videira SS, Pereira e Silva MDC, Souza Galisa P, Dias ACF, Nissinen R, Divan VLB, Elsas JD, Baldani JI, Salles JF.** 2013. Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum*—a bioenergy crop. *Plant Soil* **373**:737–754.
172. **Ringelberg D, Foley K, Reynolds CM.** 2012. Bacterial endophyte communities of two wheatgrass varieties following propagation in different growing media. *Can. J. Microbiology* **58**:67–80.
173. **Chen M-H, Jack ALH, McGuire IC, Nelson EB.** 2012. Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of *Pythium* seedling disease in a municipal biosolids compost. *Phytopathology* **102**:478–89.
174. **Sturz a. V., Christie BR, Matheson BG, Nowak J.** 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* **25**:13–19.
175. **Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TG a, Yeoh YK, Webb RI, Lakshmanan P, Chan CX, Lim P-E, Ragan M a, Schmidt S, Hugenholtz P.** 2014. A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. *Microb. Biotechnol.* **7**:142–54.
176. **Ulrich K, Ulrich A, Ewald D.** 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**:169–80.
177. **Liu Y, Zuo S, Xu L, Zou Y, Song W.** 2012. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Arch. Microbiol.* **194**:1001–1012.
178. **Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, van der Lelie D.** 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **21**:583–606.
179. **Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W.** 2008. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microb. Ecol.* **55**:415–424.
180. **Evtushenko LI, Takeuchi M.** 2006. The family Microbacteriaceae, p. 1020–1098. *In* Stackebrandt., MDSFERKHSE (ed.), *The Prokaryotes; a Handbook on the Biology of Bacteria* 3rd edn, v. Springer, New York.
181. **Yusuf K, Pulat S, Turdahun M, Hamdun M, Osman G, Abdurehim Z, Rahman E.** 2011. Phylogenetic diversity of culturable endophytic bacteria isolated from the *Populus euphratica* at the disused ancient Ugan river. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **51**:178–188.
182. **Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A.** 2002. Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2261–2268.
183. **Tate R.** 1995. Nitrogen fixation, p. 283–306. *In* Tate, RL (ed.), *The Gateway to Soil Nitrogen Cycling*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
184. **Coelho MRR, de Vos M, Carneiro NP, Marriel IE, Paiva E, Seldin L.** 2008. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**:15–22.
185. **Mårtensson L, Díez B, Warttinen I, Zheng W, El-Shehawy R, Rasmussen U.** 2009. Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant Soil* **325**:207–218.
186. **Marschner P, Crowley D, Yang CH.** 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* **261**:199–208.

187. **Coelho MRR, Marriel IE, Jenkins SN, Lanyon C V., Seldin L, O'Donnell AG.** 2009. Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Appl. Soil Ecol.* **42**:48–53.
188. **Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* **5**:1009–1015.