

**DESCIFRANDO LAS BASES  
MOLECULARES DE LA  
INTERACCIÓN ENTRE LAS  
CEPAS ENDÓFITAS  
*KOSAKONIA* SP. UYSO10 Y  
*RHIZOBIUM* SP. UYSO24 Y  
PLANTAS DE CAÑA DE  
AZÚCAR**

Abril, 2020

**SERIE  
FPTA-INIA**

**85**

# DESCIFRANDO LAS BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CEPAS ENDÓFITAS *KOSAKONIA* SP. UYSO10 Y *RHIZOBIUM* SP. UYSO24 Y PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

**Proyecto FPTA-331 Estudio de la interacción entre bacterias endófitas nativas promotoras del crecimiento vegetal y variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), cultivadas en Uruguay**

**Responsable:** Dr Federico Battistoni\*

**Institución:** Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM),  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE),  
Ministerio de Educación y Cultura (MEC).

**Equipo técnico:** Dra Cecilia Taulé,  
MSc Cintia Mareque,  
MSc. Martín Beracochea,  
Dr Raúl Platero  
Dr Federico Battistoni

---

\* Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM), Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Ministerio de Educación y Cultura (MEC).

**Título:** DESCIFRANDO LAS BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CEPAS ENDÓFITAS *KOSAKONIA* SP. UYSO10 Y *RHIZOBIUM* SP. UYSO24 Y PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR

**Responsable:** Dr Federico Battiston

**Institución:** Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM), Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Ministerio de Educación y Cultura (MEC).

eISBN: 978-9974-38-442-2

**Serie:** FPTA N° 85

© 2020, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA  
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay  
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## Integración de la Junta Directiva



## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

# CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>12</b>
1.1 Interacción planta-bacteria .....	12
1.2 Interacción planta-endófito .....	12
1.3 Promoción del crecimiento vegetal por bacterias endófitas .....	13
1.3.1 Reguladores del crecimiento vegetal o fitoestimulantes .....	13
1.3.2 Bio-fertilización .....	14
1.3.3 Control biológico .....	15
1.4 Colonización de las plantas por las bacterias endófitas .....	15
1.4.1 Acercamiento y adhesión bacteriana a la superficie radicular .....	16
1.4.2 Anclaje bacteriano y colonización de la superficie radicular .....	16
1.4.3 Infección y colonización de los tejidos internos radiculares .....	17
1.4.4 Bases moleculares de la interacción planta-endófito .....	17
1.5 Hipótesis general .....	18
1.6 Objetivo general .....	18
<b>PARTE 1: Respuesta de variedades de caña de azúcar a la inoculación con bacterias diazótrofes</b> .....	<b>19</b>
1.1 Introducción .....	19
1.2 Hipótesis .....	19
1.3 Objetivos particulares .....	19
1.4 Materiales y Métodos .....	20
1.4.1 Cepas bacterianas utilizadas en esta investigación .....	20
1.4.2 Plantas y suelo .....	20
1.4.3 Promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar por bacterias en condiciones de invernáculo .....	20
1.4.3.1. Promoción del crecimiento de esquejes de variedades comerciales de caña de azúcar .....	20
1.4.3.2. Estudio de los efectos combinados de la fertilización nitrogenada y la inoculación bacteriana en cultivares de caña de azúcar .....	21
1.4.3.3 Enumeración bacteriana .....	21
1.4.3.4 Cosecha de plantas y análisis estadístico de los ensayos en invernáculo .....	21
1.4.4 Promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar por bacterias en condiciones de campo .....	21
1.5 Resultados .....	23
1.5.1 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de las variedades comerciales de caña de azúcar más comunes por probables endófitos diazótrofes .....	24
1.5.1.1 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. LCP en condiciones de invernáculo .....	24

1.5.1.2 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. TUC en condiciones de invernáculo .....	26
1.5.1.3 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. LCP en condiciones de campo .....	29
1.5.1.4 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. TUC en condiciones de campo .....	30
1.6 DISCUSIÓN .....	31
1.6.1 La promoción del crecimiento vegetal dende de la especificidad planta-bacteria .....	31
1.6.2 Los niveles de fertilización química nitrogenada afectan la promoción del crecimiento vegetal .....	32
1.7 CONCLUSIONES .....	33
 <b>PARTE 2: Infección y colonización de plantas de caña de azúcar por las cepas</b>	
<b><i>Kosakonia</i> sp. UYSO10 y <i>Rhizobium</i> sp. UYSO24 .....</b>	<b>34</b>
2.1 HIPÓTESIS .....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
2.3.1 Cepas bacterianas y plantas .....	34
2.3.2 Identificación in vitro de factores bacterianos vinculados a la interacción planta-bacteria .....	34
2.3.2.1 Búsqueda de actividades enzimáticas potencialmente relacionadas a la degradación de la pared celular vegetal .....	34
2.3.2.2 Determinación de la presencia de enzimas antioxidantes .....	36
2.3.2.3 Determinación de la movilidad bacteriana .....	36
2.3.2.4 Determinación de la capacidad de formar biopelículas .....	36
2.3.2.5 Determinación de la capacidad de producir polihidroxibutirato .....	37
2.3.3 Búsqueda de factores promotores del crecimiento vegetal .....	37
2.3.3.1 Determinación de la capacidad de solubilizar potasio .....	37
2.3.3.2 Determinación de la capacidad de producir sideróforos .....	37
2.3.4 Determinación de la capacidad de las cepas de crecer en distintos pH, fuentes de carbono y nitrógeno .....	37
2.3.5 Descripción del proceso de infección y colonización de plantas de caña de azúcar micropropagadas, por parte de las cepas UYSO10 y UYSO24 .....	38
2.3.5.1 Estudio de la colonización e infección de plantas micropropagadas de caña de azúcar por la cepa UYSO24, mediante microscopía .....	38
2.3.5.2 Identificación de las cepas en estudio en cortes semi-finos y ultrafinos de tejidos de plantas, empleando antisueros específicos .....	39
2.3.5.3 Cuantificación de la colonización endófito por las cepas UYSO10 y UYSO24 en tejidos de plantas cañas de azúcar micropropagadas .....	39
2.4 RESULTADOS .....	41
2.4.1 Identificación de características fenotípicas bacterianas en las cepas UYSO10 y UYSO24, posiblemente vinculadas a la interacción planta-bacteria .....	41

2.4.1.1	Determinación de la presencia de enzimas potencialmente degradadoras de la pared celular vegetal .....	41
2.4.1.2	Determinación de la presencia de actividades enzimáticas antioxidantes .....	41
2.4.1.3	Determinación de la movilidad bacteriana .....	42
2.4.1.5	Determinación de la capacidad de formación de biopelículas .....	43
2.4.1.6	Determinación de la producción de polihidroxitirato .....	43
2.4.2	Identificación de características fenotípicas en las cepas UYSO10 y UYSO24 posiblemente involucradas en la promoción del crecimiento vegetal .....	43
2.4.3	Determinación de la capacidad de las cepas UYSO10 y UYSO24 de crecer en diferentes fuentes de C, N y en distintos pH .....	44
2.4.4	Localización y cuantificación de las cepas UYSO10 y UYSO24 en los tejidos internos de plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP .....	46
2.4.4.1	Colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24 .....	46
2.4.4.2	Colonización de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO10 .....	48
2.4.5	Puesta a punto de la detección de las cepas en estudio por PCR cuantitativa .....	49
2.4.6	Cuantificación de la colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24 .....	49
2.4.7	Cuantificación de la colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO10 .....	50
2.4.6	Tratamientos control y referencia .....	51
2.5	DISCUSIÓN .....	51
2.5.1	Atracción y movimiento hacia la rizósfera .....	52
2.5.2	Colonización de la rizósfera .....	52
2.5.3	Ingreso y colonización de los tejidos de las plantas .....	53
2.5.4	La cepa UYSO24 es un endófito verdadero .....	54
<b>PARTE 3: Análisis de la respuesta de las cepas <i>Kosakonia</i> sp. UYSO10 y <i>Rhizobium</i> sp. UYSO24 a la presencia de exudados radiculares de plantas de caña de azúcar .....</b>		<b>55</b>
3.1	HIPÓTESIS .....	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	55
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	55
3.3.1	Cepas bacterianas y plantas .....	55
3.3.2	Ensayo biológico .....	55
3.3.3	Extracción de proteínas totales bacterianas .....	56
3.3.4	Cuantificación y visualización de los extractos proteicos .....	56
3.3.5	Análisis proteómico por DIGE .....	57
3.3.6	Preparación de la muestra para DIGE .....	57
3.3.7	Evaluación de la compatibilidad muestra-fluoróforos .....	58
3.3.8	Marcado de las muestras .....	58
3.3.9	Análisis de las muestras por 2D SDS-PAGE .....	59



	<b>Página</b>
3.3.10 Obtención y análisis de las imágenes .....	59
3.3.11 Análisis de los spots de interés por espectrometría de masas .....	59
3.3.12 Análisis proteómico por nano LC-MS/MS y conteo de espectros .....	60
3.3.13 Preparación de las muestras para shotgun .....	61
3.3.14 Análisis mediante espectrometría de masa .....	61
3.3.15 Análisis informático de los espectros obtenidos .....	61
3.4 RESULTADOS .....	62
3.4.1 Preparación de los extractos proteicos .....	62
3.4.2 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO10 a los exudados radiculares, mediante DIGE .....	65
3.4.3 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO24 a los exudados radiculares, mediante DIGE .....	65
3.4.4 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO10 a los exudados radiculares, por nano LC-MS/MS .....	65
3.5 DISCUSIÓN .....	73
3.5.1 Los exudados radiculares son la primera señal en la interacción planta-bacteria .....	73
3.5.2 Aplicación de una aproximación proteómica global al estudio de la interacción planta-bacteria .....	73
3.5.3 Respuesta de la cepa UYSO10 a la presencia de exudados radiculares de caña de azúcar .....	74
3.5.3.1 Transporte y metabolismo de nutrientes .....	74
3.4 Respuesta de la cepa UYSO24 a los exudados radiculares de caña de azúcar .....	81
3.4.1 Transporte y metabolismo de nutrientes .....	81
3.4.2 Chaperonas y funciones relacionadas al estrés .....	81
3.4.3 Interacción con la planta .....	82
<b>PARTE 4: ESTUDIO DEL ROL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL N<sub>2</sub> EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE CAÑA DE AZÚCAR POR LA CEPA <i>KOSAKONIA SP. UYSO10</i> .....</b>	<b>83</b>
4.1 HIPÓTESIS .....	83
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	83
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	83
4.3.1 Estrategia general .....	83
4.3.2 Construcción de la cepa mutante derivada de UYSO10 desprovista de los genes nifH y anfH .....	83
4.3.3 Caracterización de la cepa UYSO10 y las mutantes obtenidas .....	83
4.3.3.1 Evaluación de la capacidad de las cepas en estudio, de crecer en medio de cultivo rico (condiciones de no FBN) .....	84
4.3.3.2 Evaluación de la actividad nitrogenasa en las diferentes cepas en estudio .....	84
4.3.3.3 Evaluación de la respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las diferentes mutantes .....	84
4.4 RESULTADOS .....	85

**Página**

4.4.1	Caracterización in vitro de las cepas UYSO10 parental y mutantes .....	85
4.4.2	Caracterización in vivo de las cepas UYSO10 parental y mutantes .....	86
4.5	DISCUSIÓN .....	87
4.5.1	FBN en gramíneas por endófitos diazótrofos .....	87
4.5.2	Nitrogenasas .....	88
4.5.3	Caracterización de las nitrogenasas presentes en la cepa UYSO10 .....	89
4.5.4	La FBN es responsable en parte de la PCV de cañas de azúcar inoculadas con la cepa UYSO10 .....	89
5.	CONCLUSIONES GENERALES .....	91
	<b>ANEXO A: Medios de cultivo y soluciones .....</b>	<b>92</b>
A.1.	Medios de cultivo para bacterias .....	92
A.2.	Medio de cultivo para plantas .....	94
A.3.	Soluciones .....	94
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>95</b>

Dra Cecilia Taulé,  
MSc. Cintia Mareque,  
MSc. Martín Beracochea,  
Dr Raúl Platero,  
Dr Federico Battistoni

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

Proyecto FPTA 331

Período de Ejecución: Jun. 2014-Nov. 2017

## RESUMEN

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

En este trabajo nos basamos en la hipótesis de que las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 presentan características asociadas a la interacción planta-endófito, las cuales determinan la promoción del crecimiento vegetal. Para esto, como objetivo nos planteamos profundizar en el conocimiento de la interacción entre plantas de caña de azúcar y las cepas UYSO10 y UYSO24.

En una primera instancia se estudió la respuesta de diferentes variedades de caña de azúcar, a la inoculación con cepas diazotrofas (capaces de fijar biológicamente el N<sub>2</sub> atmosférico), en condiciones de invernáculo y de campo. Los resultados mostraron que las cepas UYSO10 y UYSO24 son promotores del crecimiento de esquejes de las variedades comerciales comumente cultivadas en el país, siendo la respuesta de la planta diferencial según el genotipo de la misma, el inóculo bacteriano y la concentración de fertilizante químico nitrogenado. Asimismo en condiciones de campo la cepa UYSO10 mostró una mejora significativa en la productividad medida como el número de tallos por hectárea.

Posteriormente se realizó una caracterización *in vitro* e *in vivo* de las cepas bacterianas en estudio, demostrándose que ambas cepas presentan diferentes características posiblemente involucradas en la interacción y la promoción del crecimiento vegetal. Asimismo, mediante una aproximación microscópica y de biología molecular se logró definir a las cepas UYSO10 y UYSO24 como endófitos verdaderos, describiéndose el proceso de infección y colonización de los tejidos de la planta hospedera.

A continuación se analizó el primer paso de la interacción planta-bacteria, evaluándose la

respuesta de las cepas UYSO10 y UYSO24 a la presencia de exudados radiculares de plantas de caña de azúcar, mediante un abordaje proteómico. Los resultados mostraron que en presencia de exudados, las cepas en estudio adaptan su proteoma con la finalidad de transportar y metabolizar los nutrientes presentes en los exudados, así como para su posterior interacción con la planta.

Finalmente, se estudió en la cepa UYSO10 el rol de la fijación biológica del  $N_2$ , en la promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar. La misma se realizó mediante la construcción y caracterización de cepas mutantes en los genes *nifH* y *anfH*, codificantes de la enzima nitrogenasa, clave en el proceso. Los resultados obtenidos sugieren que los dos tipos de nitrogenasas presentes en esta cepa son funcionales y que la FBN está implicada en la PCV de plantas de caña de azúcar.

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1 INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

A lo largo del tiempo, los microorganismos y las plantas han co-evolucionado formando distintos tipos de interacciones, entre ellas sinérgicas, antagónicas o neutras (1, 2). Desde el punto de vista de las plantas una interacción sinérgica puede mejorar su crecimiento, mientras que una relación deletérea significa una disminución en el crecimiento de la planta y el posible desarrollo de una enfermedad. Dentro de las interacciones sinérgicas más estudiadas y mejor entendidas se encuentran la simbiosis rizobio-leguminosa, así como la que incluye los hongos micorrícicos (3). Estudios de las vías de comunicación en ambas interacciones planta-microorganismo, han mostrado similitudes en el proceso de reconocimiento y señalización. En particular, la señalización utilizada por rizobios y hongos micorrícicos para invadir las raíces de leguminosas se encuentra solapada, sugiriendo la hipótesis que la simbiosis micorrícica pudo ser el precursor de la simbiosis leguminosa-rizobio (2, 3). Por otro lado, la interacción planta-patógeno ha sido también muy estudiada, principalmente debido a las pérdidas económicas asociadas a los cultivos enfermos (4, 5).

Actualmente, el **microbioma** o conjunto de genomas de la comunidad microbiana asociada a las plantas, se considera una extensión del genoma del huésped (6). En este sentido, en los últimos años varios trabajos han tenido como objetivo entender cuál es la función ecológica de la **microbiota** o conjunto de microorganismos de una comunidad asociada a los tejidos de las plantas, debido a que se considera que es una determinante de la productividad y salud vegetal

(7). En ese sentido, la manipulación del microbiota vegetal tiene el potencial de reducir la incidencia de enfermedades, aumentar la producción agrícola, reducir la incorporación de químicos y la emisión de gases con efecto invernadero, lo que en su conjunto resulta en el desarrollo y empleo de prácticas agrícolas más sustentables (6). Si bien, dentro de la microbiota existen interacciones con la planta bien entendidas, la mayoría de la microbiota y su contribución al fenotipo del huésped no se encuentra bien comprendida (6). A su vez, se ha reportado que las plantas y posiblemente su sistema inmune poseen un rol clave en determinar la estructura y composición de la misma (6, 7).

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

## 1.2 INTERACCIÓN PLANTA-ENDÓFITO

El término **endófito** fue inicialmente definido en referencia a hongos o bacterias que durante parte o todo su ciclo de vida invaden los tejidos de plantas vivas causando una infección no aparente, o sea no provocando síntomas de enfermedad (8). Más tarde y con fines prácticos se definió el término endófito en referencia a las bacterias que pueden ser aisladas o extraídas de tejidos de plantas esterilizadas en su superficie y que no causan un daño visible en la misma (9). Posterior-

mente se propuso el criterio para identificar «**endófitos verdaderos**», el cual hace referencia a bacterias que no solamente fueron aisladas de tejidos estériles, sino que además se tiene evidencia microscópica de su presencia dentro de los tejidos (10). A su vez, los endófitos deben cumplir con el postulado de Koch y ser capaces de infectar nuevamente al hospedero. A diferencia de los rizobios, no viven dentro de las células vivas y no inducen la formación de una estructura vegetal diferenciada como lo es el nódulo radicular (11).

En términos evolutivos, se considera a las bacterias endófitas como intermediarios entre bacterias saprófitas y patógenas, bacterias que potencialmente pueden evolucionar a un estado patogénico o como bacterias más evolucionadas que han sido conservadas por el beneficio resultante para la planta (12). Debido a que ocupan en la planta un hábitat muy parecido al de las bacterias patógenas, varios autores han buscado la presencia de características únicas en los endófitos, con el fin de entender las diferencias genómicas entre éstos y los patógenos (13, 14). Los resultados mostraron la ausencia de características únicas que permitan la categorización de una bacteria como endófito (13). Sin embargo, a pesar de que los endófitos pueden presentar varias características similares a los patógenos, los mecanismos de expresión y regulación génica son diferentes, así como la coordinación de actividades y la comunicación célula-célula en comunidad (14). Estos autores sostienen que, si bien el límite entre estas formas de vida sigue siendo difuso, la diferencia podría venir de una interacción compleja y multifactorial.

El hábitat endofítico constituye un ambiente protegido en comparación con el suelo o la rizósfera, confiriendo una ventaja ecológica a las bacterias capaces de colonizarlo (12, 15). En ese sentido, las bacterias encuentran en él una fuente rica en nutrientes, baja competencia por los mismos y protección frente al estrés ambiental, asegurándose su dispersión por transferencia en forma pasiva (16). Por otro lado, el interior de los tejidos vegetales puede considerarse también un ambiente hostil si se tienen en cuenta los mecanismos de defensas presentes en la planta. Sin embargo, la vida dentro de los tejidos permite a estas bacterias interactuar en una forma más

directa con la planta, pudiendo ser la transferencia de los efectos beneficiosos, mayores que en las interacciones rizosféricas (15, 17).

En general se ha reportado que existe cierta especificidad genotipo bacteriano-genotipo planta (18), donde también influyen en la colonización las condiciones ambientales (19-21). Finalmente, es importante remarcar que las bacterias endófitas son de interés por su potencial aplicación biotecnológica en los sistemas agrícolas (16). Dentro de los beneficios posibles potencialmente explotables, se encuentra la promoción del crecimiento vegetal y el control de enfermedades (16).

### 1.3 PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL POR BACTERIAS ENDÓFITAS

Los mecanismos por los cuales las **bacterias promueven el crecimiento vegetal** pueden clasificarse en **mecanismos directos** como la regulación del crecimiento y la biofertilización, y en **mecanismos indirectos** como el control de organismos patógenos (biocontrol) y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas (22, 23). Si bien algunos de estos mecanismos han sido confirmados para bacterias endófitas, en general se asume que estos mecanismos descritos en principio para bacterias rizosféricas son los mismos que presentan las bacterias endófitas.

#### 1.3.1 Reguladores del crecimiento vegetal o fitoestimulantes

La regulación del crecimiento engloba diversos mecanismos por los cuales el crecimiento vegetal se ve modulado o alterado. Las bacterias pueden producir **fitohormonas** como auxinas, giberelinas, ácido abscísico y citoquininas o modular su concentración como en el caso del etileno. Las fitohormonas son fundamentales como reguladoras del desarrollo vegetal, contribuyen a la coordinación de diversos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, floración, la ramificación, macollaje y la maduración de los frutos, e influyen en la resistencia de las plantas a factores ambientales (24). La producción de hormonas de crecimiento

vegetales es considerada una característica importante y posiblemente el mayor mecanismo de promoción vegetal por bacterias endófitas (15). Dentro de la fito-estimulación también se incluye la modulación del desarrollo radicular mediante la producción de óxido nítrico (25) o compuestos orgánicos volátiles como la acetoina y el 2, 3 butanodiol (26).

#### *i-Producción de auxinas.*

Se considera que casi el 80 % de las bacterias rizoféricas son capaces de sintetizar ácido indol acético (AIA) (27). El AIA suministrado por la bacteria a la planta, puede incrementar el desarrollo de las raíces, permitiendo a la planta explorar mejor el suelo, accediendo a más nutrientes y agua (27). Se conocen 6 vías de síntesis del AIA, incluyendo 5 vías dependientes de triptófano: que presentan como enzimas características la indol-3-piruvato, la indol-3-acetamida, la triptamina, la triptófano oxidasa de cadena lateral o la indol-3-acetonitrilo; así como una vía independiente del triptófano (24). De las vías descritas, las más comunes son las dependiente del triptófano, el cual es secretado por la planta (28).

#### *ii-Modulación de los niveles de etileno*

La modulación de la concentración de etileno es realizada por la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, la cual hidroliza el ACC que es el precursor inmediato del etileno, produciendo amonio y á-cetobutirato (29). En particular, la disminución de los niveles de etileno posee como consecuencia la promoción en la elongación de la raíz y la disminución de la respuesta de defensa en algunas plantas. .

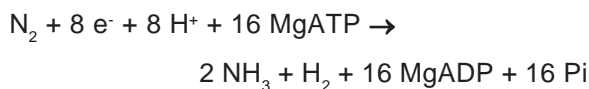
### **1.3.2 Bio-fertilización**

Las bacterias pueden actuar como **biofertilizantes** convirtiendo nutrientes y minerales como N, P, K y Fe, en formas biodisponibles por las plantas. Estos procesos son muy importantes para la agricultura ya que constituyen una alternativa a los fertilizantes químicos utilizados en los sistemas productivos. A su vez, el uso de fertilizantes químicos con lleva graves problemas ambientales, debido a que las plantas pueden asimilar hasta un 50 % de los fertilizantes suministrados perdiéndose el resto por escorrentía y lixiviación, pudiendo contaminar cursos de agua (30).

#### *i-Fijación biológica del nitrógeno*

El N es un constituyente esencial de la mayoría de las biomoléculas. Si bien el N<sub>2</sub> conforma el 78 % de la atmósfera, este se encuentra poco biodisponible dado que la mayoría de los organismos no son capaces de reducir el N<sub>2</sub> y utilizarlo como fuente de N (31). La FBN es el proceso por el cual el N<sub>2</sub> es reducido a amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y es realizado por un grupo de procariotas denominados diazótrofos (*diazo*=N, *trofos*=comida). Este proceso es muy importante en el ciclo del N, ya que aporta un 60 % del N fijado (31).

La enzima encargada de llevar a cabo la FBN es la **nitrogenasa**, la cual es sensible al oxígeno. Esta enzima cataliza la reducción del N<sub>2</sub> dependiente de ATP, formando dos moléculas de NH<sub>3</sub>, según la siguiente reacción:



La nitrogenasa o MoFe-nitrogenasa está conformada por dos componentes metaloproteicos, la dinitrogenasa (Fe proteína) y la dinitrogenasa reductasa (FeMo proteína), codificados por los genes *nifHDK* (32). Si bien todos los diazótrofos poseen la nitrogenasa clásica (MoFe-nitrogenasa), existen algunos microorganismos que poseen además una o dos nitrogenasas alternativas (VFe- y FeFe-nitrogenasa) (32). En las enzimas alternativas, el Mo del sitio catalítico es sustituido por V o Fe.

Con el objetivo de adaptar el proceso de FBN a las restricciones fisiológicas, las bacterias diazótroficas presentan varios mecanismos para sensar múltiples señales ambientales como la disponibilidad de N fijado (principalmente amonio y glutamina) o de O<sub>2</sub>. La regulación del proceso es principalmente a nivel transcripcional y en algunos casos, se ha reportado la regulación post-traducciona de la nitrogenasa mediante una inactivación reversible (33).

#### *ii-Solubilización de fosfato*

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos aumentan el P disponible para las plantas por solubilización del P inorgánico o mineralización de P orgánico (34). Las bacterias pueden solubilizar el P inorgánico a partir de fosfatos de

calcio, aluminio o hierro, proceso que se asocia generalmente a la liberación de ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, láctico, succínico y glucónico), con la consecuente quelación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  y liberación de los iones ortofosfato.

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

### 1.3.3 Control biológico

El control biológico implica la prevención de la proliferación de organismos patógenos por microorganismos [42]. El mismo puede deberse por un lado, al establecimiento de una competencia por los nutrientes, como ser N, Fe, P, espacio,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$  o luz. Por otro lado, las bacterias biocontroladoras pueden también producir metabolitos secundarios tóxicos como antibióticos o bacteriocinas, inhibiendo así el crecimiento de los patógenos.

#### *i- Solubilización de hierro*

En condiciones aeróbicas y a pH neutro o alcalino, el Fe se encuentra en forma de hidróxidos insolubles, por lo que su biodisponibilidad para las plantas es muy baja. En estas condiciones, las plantas responden produciendo y excretando fitosideróforos, compuestos quelantes que unen  $\text{Fe}^{3+}$  y lo transportan a la superficie de la raíz donde es reducido y absorbido por la planta (35). Por otro lado, muchas bacterias en condiciones de deficiencia de Fe producen sideróforos con alta especificidad por el  $\text{Fe}^{3+}$ , el cual es internalizado en la célula a través de receptores de membrana externa que reconocen específicamente el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo (36). Debido a esta característica, los sideróforos bacterianos afectan la comunidad rizosférica, por ser buenos competidores por el Fe nutricional (35).

#### *ii- Inducción de la resistencia sistémica en plantas*

La resistencia sistémica inducida (RSI) es un estado de elevada capacidad de defensa desarrollado por una planta al ser adecuadamente estimulada (23). Los disparadores de la RSI son variados, incluyendo diferentes componentes bacterianos como los flagelos, LPS, surfactantes lipopeptídicos, sideróforos, así como la producción de compuestos orgánicos volátiles como la acetoina y el 2,3 butanodiol (23, 37).

## 1.4 COLONIZACIÓN DE LAS PLANTAS POR LAS BACTERIAS ENDÓFITAS

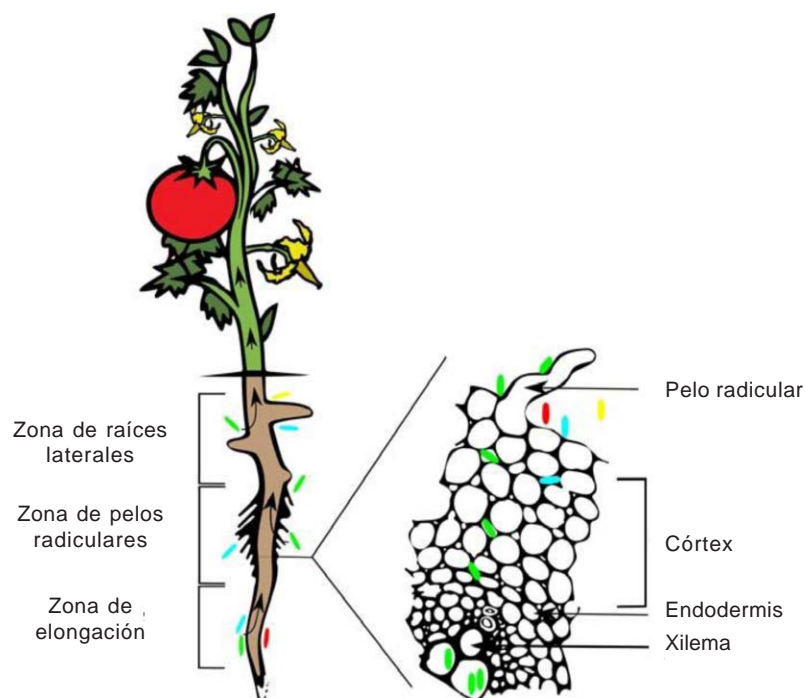
La interacción de las bacterias con las plantas constituye un proceso dinámico que depende de un ambiente adecuado y de factores genéticos. Las bacterias endófitas son bacterias del suelo, del filoplano o que están presentes en las semillas o en el material de propagación vegetativa, las cuales colonizan el interior de los tejidos de las plantas (12).

A continuación, se describirá la principal vía de colonización de la planta por las bacterias del suelo. El proceso involucra el reconocimiento inicial de señales moleculares, seguido del movimiento de la bacteria en dirección a la planta hospedera, su adhesión a la superficie vegetal, colonización del rizoplaneo y posterior penetración y multiplicación en el interior de los tejidos, pudiendo alcanzar una dispersión sistémica a través de los tejidos vasculares (11) (Figura 1). Una colonización endofítica exitosa involucra un huésped compatible.

### 1.4.1 Acercamiento y adhesión bacteriana a la superficie radicular

Los mecanismos de acercamiento espacial de la bacteria pueden ser **pasivos**, si la bacteria se encuentra en la semilla o en la yema de propagación vegetativa, o **activos** a través del movimiento por atracción quimiotáctica hacia la superficie de la raíz (38). Para las plantas, los exudados radiculares representan un componente importante en la comunicación con los microorganismos de la rizósfera. En los mismos se encuentran un amplio grupo de sustancias ricas en carbono y energía, así como moléculas señales (39). Asi-





**Figura 1. Principales rutas de colonización de la planta por bacterias endófitas.** Las bacterias endófitas ingresan a la planta en distintas zonas de la raíz. Una vez dentro, pueden permanecer cerca de la zona de entrada (bacterias celestes) o moverse hacia el interior de la raíz, ocupando los espacios intercelulares del córtex y los vasos del xilema (bacterias verdes). Algunas bacterias pueden moverse y colonizar nuevos órganos o tejidos. Las bacterias rojas y amarillas representan las bacterias rizósfericas que son incapaces de colonizar los tejidos internos de la planta. Modificado de Malfanova y colaboradores (2013).

mismo, las plantas pueden modificar sus exudados dependiendo de su estado fisiológico y de la microbiota presente en la rizósfera (40). De esta forma las plantas reconocen y responden específicamente a microorganismos benéficos o patógenos presentes, iniciando la comunicación mediante la producción de señales que pueden modular su colonización (39, 41). Entre los quimioatrayentes más comunes se encuentran moléculas exudadas por las raíces como los ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos (42). Particularmente, se ha demostrado en algunos endófitos, que los flavonoides actúan como señales al igual que en las interacciones leguminosa-rizobio y actinorrizas-frankia (43, 44). Por ejemplo, ciertos flavonoides estimulan la colonización de plantas de trigo por *Azorhizobium caulinodans* y de maíz por *Herbaspirillum seropedicae* (45, 46). Asimismo, diversos compuestos químicos liberados por las plantas, reclutan específicamente a determinado tipo de bacteria como el caso de la secreción de la benzoxazina DIMBOA (2,4-

dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4 benzoxazin-3(4H)) por plantas de maíz y la rizobacteria *Pseudomonas putida* KT2440; o la secreción de ácido málico por *Arabidopsis*, y la cepa *Bacillus subtilis* FB17 (55, 56).

Una vez que la bacteria se ha desplazado, generalmente por medio de flagelos, hacia la superficie radicular, comienza el desarrollo de la interacción entre la bacteria con la pared celular vegetal, a través de uniones electrostáticas débiles, las cuales son rápidas, **inespecíficas y reversibles** (47).

#### 1.4.2 Anclaje bacteriano y colonización de la superficie radicular

En esta etapa la interacción es **específica e irreversible** involucrando estructuras bacterianas para la adhesión a la superficie de la raíz como fimbrias, pilis, lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS) y proteínas de membrana externa como porinas y la proteína mayor de membra-

na externa (18, 44, 48–53). El establecimiento bacteriano en los sitios de adhesión puede ser en forma de agregados y/o formando películas bacterianas (11). Se considera que tanto los agregados como las biopelículas constituyen un microambiente óptimo para la transferencia horizontal de genes así como para el intercambio de señales de *quorum sensing*, adjudicándole a las finas capas que los cubren, posiblemente compuestas de EPS, la función de barrera de difusión de dichas moléculas (54, 55).

La adhesión junto con el desarrollo de una población bacteriana presenta una ventaja selectiva para la bacteria, aumentando la probabilidad de ingresar a los tejidos internos. Por lo tanto, los endófitos que infectan plantas tienen que ser colonizadores competitivos y posicionarse estratégicamente en los sitios de potencial ingreso a la raíz (42).

#### 1.4.3 Infección y colonización de los tejidos internos radiculares

El ingreso a los tejidos de la planta normalmente es **pasivo** y se realiza a través de las aperturas naturales como el área de emergencia de las raíces laterales y de la cofia (11, 56). Asimismo, la infección puede darse pasivamente a través de heridas causadas por factores bióticos o abióticos.

Por otro lado, se han descrito también procesos **activos** de ingreso a los tejidos, los cuales involucran vectores (insectos) o la participación de enzimas del tipo endoglucanasas y pectinolíticas como en el caso de *Azoarcus*, *Klebsiella* y *Burkholderia* (57–59).

La colonización interna de los tejidos por parte de las bacterias ocurre primariamente en los espacios intercelulares, reportándose en el caso de *Azoarcus* sp. BH72 su presencia intracelular pero únicamente en células muertas (56). Una vez dentro de la planta, las bacterias endófitas pueden permanecer en un tejido específico o colonizar la planta sistemáticamente, transportándose por los tejidos vasculares o el apoplasto (60). Se considera que las bacterias para atravesar la barrera que constituye la endodermis e ingresar al tejido vascular, utilizan las rupturas naturales causadas por la aparición de raíces secundarias o a través de células indiferenciadas de la cofia.

En este sentido, se han definido como **endófitos competentes**, a aquellas bacterias que poseen la maquinaria genética para infectar el espacio endofítico y persistir en él. Por lo tanto, son bacterias que poseen mecanismos que le aportan una rápida adaptación a un ambiente muy diferente en cuanto a pH, presión osmótica, fuentes de C y disponibilidad de oxígeno (42).

En general se considera que las bacterias benéficas evolucionaron en términos de poder reducir la capacidad de estimular el sistema inmune del huésped. Lo mismo ocurre en los rizobios, los cuales mediante los factores Nod, suprimen la señalización de defensas de las leguminosas vía el ácido salicílico (61, 62). Por lo tanto, el estado endofítico de una bacteria dependerá de factores probabilísticos, como la presencia de los niveles bacterianos necesarios para una colonización endofítica exitosa, y que los mismos entren en contacto con zonas de activa división celular (cofia y desarrollo de raíces secundarias). Asimismo, dependerá de factores determinantes como la presencia de componentes genéticos dedicados a la interacción por ambas partes.

#### 1.4.4 Bases moleculares de la interacción planta-endófito

En los últimos años, la mayoría de los esfuerzos se han enfocado en estudiar características puntuales de la interacción planta-endófito. Gracias a estos estudios se conocen varios factores bacterianos involucrados en las distintas etapas de la interacción (63). Sin embargo, este tipo de estudios no permite comprender la naturaleza compleja y multifactorial de la interacción endofito-planta. Estudios más recientes han comenzado a analizar desde un punto de vista más amplio la naturaleza de dicha interacción.

En ese sentido, es importante conocer cómo las plantas censan las señales de los microorganismos y cuándo reconocen a las bacterias benéficas, de forma de permitir el establecimiento de una interacción benéfica (18). Otra interrogante aun no respondida es si las bacterias benéficas son siempre percibidas como benéficas y necesarias. Si bien hay muchos beneficios de la interacción, esta no siempre se establece, pudiendo ser que condiciones ambientales como la

disponibilidad de agua y nutrientes regulen conjuntamente su establecimiento.

Por otro lado, así como se conoce una comunicación química entre las partes en las simbiosis rizobio-leguminosa y planta-micorrizas arbusculares, la misma debería existir en la interacción planta-endófito (3). Si bien anteriormente se describieron los pasos de la interacción endófito-planta hospedera, es muy poco lo que se conoce de las bases moleculares de las mismas en contraste con los sistemas endosimbióticos bien estudiados, tales como los rizobios y las leguminosas, o los sistemas patogénicos (39, 43).

Entender el proceso de señalización y la regulación de la colonización, tiene implicancias en el diseño de nuevas estrategias para promover las

interacciones benéficas con las plantas huéspedes desde el punto de vista biotecnológico.

## 1.5 HIPÓTESIS GENERAL

Las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 presentan características asociadas a la interacción planta-endófito, las cuales determinan su capacidad de promover el crecimiento vegetal.

## 1.6 OBJETIVO GENERAL

Profundizar en el conocimiento de las bases moleculares imperantes en la interacción entre plantas de caña de azúcar y las cepas UYSO10 y UYSO24.

# PARTE 1:

## Respuesta de variedades de caña de azúcar a la inoculación con bacterias diazótrofes

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Diferentes nutrientes esenciales para las plantas, incluyendo los macronutrientes N y P, se encuentran normalmente escasos en el suelo, limitando el crecimiento óptimo de los cultivos (64, 65). Aunque este problema puede ser solucionado con la administración de fertilizantes químicos, los cuales son muy costosos y normalmente administrados en exceso, los mismos causan grandes daños al medio ambiente a través de la lixiviación de nitratos en las aguas subterráneas y la escorrentía superficial de fósforo y nitratos, todo lo cual resulta en la contaminación del agua potable y los ecosistemas acuáticos (30). Estos problemas resaltan la necesidad de la aplicación de nuevas tecnologías agrícolas con el objetivo de lograr sistemas de producción más sustentables ecológicamente provocando menos residuos y contaminación. Una alternativa a la fertilización química, es el uso de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (BPCV). Como se mencionó, estas pueden estimular el crecimiento y la salud general de varios cultivos mediante diversos mecanismos que se clasifican como directos o indirectos (60, 66).

En la naturaleza, las plantas y las bacterias se asocian naturalmente de diferentes maneras, incluyendo interacciones beneficiosas y no beneficiosas. Como se mencionó, las bacterias endófitas se conocen como aquellas que pueden detectarse en un momento particular dentro de los tejidos de plantas aparentemente sanas (12, 67). Dentro de la planta normalmente no causan ningún cambio morfológico sustancial como ocurre con los simbiontes de nódulos de raíz (como los rizobios en las leguminosas) y, a diferencia de los

fitopatógenos, no causan ningún síntoma perjudicial de enfermedad. En comparación con simbiontes y fitopatógenos, poco se sabe sobre la base molecular de la interacción endófito-planta, aunque se ha reportado mucha evidencia de sus efectos beneficiosos en sus huéspedes (42, 66, 68, 69).

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un cultivo multipropósito utilizado en Uruguay para la producción de azúcar, bioetanol, forraje y energía. Sin embargo, necesita de altos niveles de fertilización nitrogenada para su óptimo crecimiento en las latitudes donde se cultiva en Uruguay (70). En un estudio anterior, previamente demostramos la contribución de la FBN en los cultivares de caña de azúcar uruguayos utilizando el método de dilución de isótopos  $^{15}\text{N}$  (71, 72). En el mismo estudio, se construyó una colección de probables endófitos asociados a los mismos cultivares de caña de azúcar. Esta colección fue caracteriza genética y bioquímicamente, identificándose a partir de la misma cepas diazotróficas a las cuales se les analizó sus relaciones filogenéticas (71, 72). Asimismo, aislamientos seleccionados fueron inoculados en plantas micropropagadas de caña de azúcar, en condiciones *in vitro*, identificándose las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 (formalmente *Kosakonia* sp. UYSO10) y *Shinella* sp. UYSO24 (formalmente *Rhizobium* sp. UYSO24), como PCV de la variedad comercial de caña LCP 85384 (72–74).

### 1.2 HIPÓTESIS

En la colección bacteriana de probables endófitos asociados a variedades de caña de

azúcar, se encuentran aislamientos promotores del crecimiento vegetal en condiciones de invernáculo y campo.

### 1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Estudiar los efectos de la inoculación con aislamientos diazotrófos seleccionados, sobre los cultivares comerciales de caña de azúcar TUC 7745 y LCP 85384 en condiciones de invernáculo.
- 2- Estudiar los efectos de la inoculación con los aislamientos diazotrófos PCV identificados en 1, en combinación con fertilizante químico nitrogenado; sobre los mismos cultivares comerciales de caña de azúcar en condiciones de invernáculo.
- 3- Estudiar los efectos de la inoculación bacteriana con los aislamientos diazotrófos PCV identificados en 2, sobre los cultivares comerciales de caña de azúcar en estudio en condiciones de campo.

## 1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.4.1 Cepas bacterianas utilizadas en esta investigación

Los diazotrofos bacterianos a analizar fueron seleccionados a partir de una colección de probables cepas endófitas asociadas con cultivares comerciales de caña de azúcar cultivados en Uruguay, de acuerdo con sus características PCV detectadas *in vitro* y sus relaciones filogenéticas (71, 72). Teniendo en cuenta ese criterio, las cepas utilizadas en este estudio fueron *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Kosakonia* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rahnella* sp. UYSO22, *Rhizobium* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27. Por otra parte, las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 y *Azospirillum brasilense* SP7 (75, 76) fueron empleadas como cepas de referencia.

### 1.4.2 Plantas y suelo

Para los ensayos de invernáculo se tomaron muestras de plantas de caña de azúcar a partir de

plantaciones comerciales ubicadas en el Departamento de Artigas, Uruguay (30° 21' 11.5"S, 57° 37' 11.1" W). Los trozos de tallos pertenecientes a las principales variedades plantadas en Uruguay TUC 7742 (TUC) y LCP 85384 (LCP), fueron recolectados aleatoriamente de sitios con aplicación de bajas tasas de fertilización nitrogenada durante los 4 años anteriores. En paralelo se tomaron muestras de suelo del mismo sitio, a una profundidad de 0-20 cm, para su uso como sustrato en experimentos con macetas (véase a continuación). El análisis físico-químico del suelo se realizó en el Laboratorio de Suelos, Facultad de Ciencias-UdelaR, revelando que tenía una baja concentración de N (1,6 ppm de N-NO<sub>3</sub>).

### 1.4.3 Promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar por bacterias en condiciones de invernáculo

#### 1.4.3.1. Promoción del crecimiento de esquejes de variedades comerciales de caña de azúcar

Las semillas de tallo («esquejes»), de las variedades de caña de azúcar a evaluar, se desinfectaron en superficie con EtOH 70%, se cortaron para dejar una yema por esqueje y se sembraron en macetas conteniendo como sustrato 1,5 kg de arena estéril: suelo (1:1). Cada esqueje fue inoculado con  $1 \times 10^7$  células planta<sup>-1</sup> de cada aislamiento a evaluar, así como de las cepas referencia, a los 20 y 65 días después de la siembra. Asimismo se incluyó un tratamiento (MIX), en el que se inoculó con una mezcla de todas las cepas evaluadas. Como control positivo se realizó un tratamiento en el cual a cada esqueje se le adicionó una solución de urea (concentración final equivalente a 100 kg N ha<sup>-1</sup>); mientras que en el tratamiento empleado como control negativo, las plantas no fueron ni fertilizadas ni inoculadas. El experimento incluyó 10 repeticiones por tratamiento con un diseño completamente al azar. Las macetas se ubicaron en un invernadero con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y se regaron con agua del grifo según fue necesario.

#### **1.4.3.2. Estudio de los efectos combinados de la fertilización nitrogenada y la inoculación bacteriana en cultivares de caña de azúcar**

Para esto se partió de tallos de las variedades en estudio desinfectados superficialmente e inoculados como se describió anteriormente. En este estudio, los efectos de los niveles de fertilización química nitrogenada (N 0, 75, 100 y 150 kg N ha<sup>-1</sup>), se evaluaron conjuntamente con la inoculación bacteriana. En la diagramación de los tratamientos, las plantas sin fertilización nitrogenada se utilizaron como control negativo. Por otro lado, como control positivo, se emplaron plantas a las cuales se le añadió urea como fertilizante nitrogenado a una concentración final de 75, 100 o 150 kgN ha<sup>-1</sup>, de acuerdo con el nivel de fertilización nitrogenada a ser evaluado. El experimento incluyó 6 repeticiones por tratamiento con un diseño completamente al azar. Las macetas se ubicaron en un invernadero con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y se regaron con agua del grifo según fue necesario.

#### **1.4.3.3 Enumeración bacteriana**

Los esquejes de tallos de los cultivares de caña de azúcar en evaluación se desinfectaron superficialmente y se inocularon como se describió anteriormente con las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 para el caso de la variedad TUC, o con las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Neorhizobium* sp. UYSO24 para el caso de la variedad LCP. La enumeración bacteriana endofítica total presente en las raíces y en los tejidos aéreos, se realizó por triplicado a los 15 días pi y 2 meses pi en placas TY.

#### **1.4.3.4 Cosecha de plantas y análisis estadístico de los ensayos en invernáculo**

En todos los experimentos de PCV de caña de azúcar, la altura de la planta (medida desde la base del tallo hasta la hoja más reciente) y el diámetro del tallo basal, se determinaron cuatro meses después de la primera inoculación bacteriana. En todos los casos, las raíces y las partes aéreas se secaron a 65 °C hasta un peso constante para la determinación de biomasa seca. El

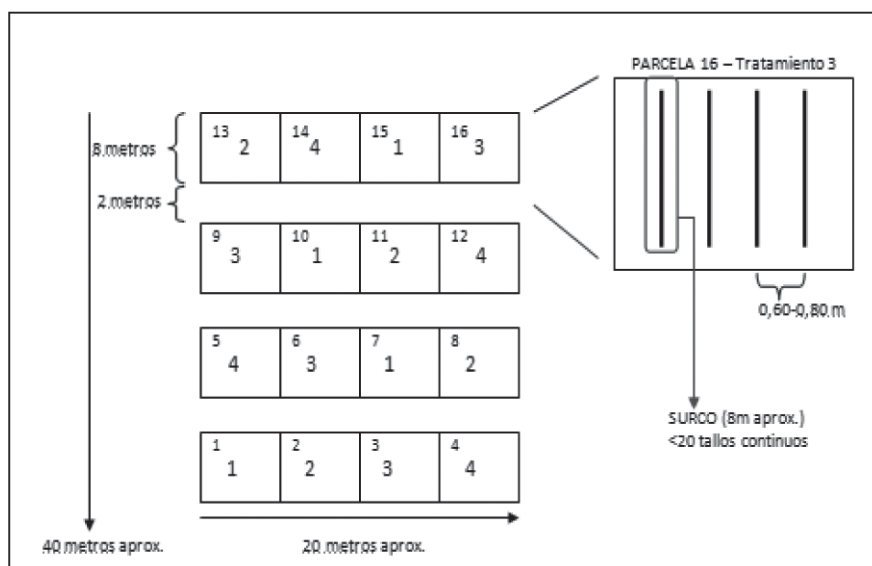
contenido total de N de las partes aéreas se determinó con el método Kjeldhal en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía-UdelaR.

Los datos paramétricos se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de diferencias menos significativas (LSD) en  $p < 0,05$  (77). Los datos no paramétricos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y las medias de cada tratamiento se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney a  $p < 0,05$  (programa IBM Statistics 10).

#### **1.4.4 Promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar por bacterias en condiciones de campo**

Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar, en condiciones de campo, la respuesta de dos las mismas dos variedades evaluadas anteriormente (LCP y TUC), a la inoculación con bacterias seleccionadas por su capacidad PCV, teniendo en cuenta los resultados de la sección 1.4.3. Para el caso de la variedad LCP, en el presente proyecto se evaluó el efecto de la inoculación al primer corte (1 año), de un ensayo previamente instalado en el marco del proyecto FPTA 275 (72). El mismo fue re-inoculado en el marco del presente proyecto, evaluándose posteriormente el efecto de la inoculación en el rebrote (1 año).

Por otro lado, para el caso del cultivar TUC, en el marco de este proyecto se montó un nuevo ensayo el cual fue evaluado durante dos años. En ambos casos, para la realización de esta actividad se eligió un sitio en el campo experimental de ALUR (Bella Unión), de forma de que la preparación del suelo y el manejo del cultivo en el ensayo fuera idéntico a las siembras comerciales de la zona. El sitio elegido se encuentra en las coordenadas: 30° 19' 55'' S 57° 36' 54'' O. Análisis de suelo: 1.88 % M.O., 6.46 pH, P 8 ppm, K 0,11 meq/100 g. El diseño experimental fue de bloques completamente al azar con 4 repeticiones. Cada bloque (4 en total) fue de 8m de ancho por 20 m de largo separados entre sí por calles de 2 m de ancho. Asimismo, cada bloque estaba constituido por 4 parcelas (una por tratamiento) y cada parcela por 4 surcos separados por 0,60-0,80 m



**Figura 2. Diagramación de los ensayos realizado en el de campo experimental de ALUR, Bella Unión.** Los números centrales corresponden a los tratamientos y los números en los vértices izquierdos corresponden a las parcelas.

(Figura 2). Los surcos fueron abiertos con una sembradora convencional momentos antes de la siembra para evitar pérdida de humedad del suelo.

Para el caso de la variedad TUC, el ensayo se montó en los primeros días de octubre del año 2014, retrasado por las abundantes lluvias existentes, la primera cosecha se realizó a mediados de julio del 2015 y la segunda el mes de julio del año 2016. En este ensayo se evaluaron 4 tratamientos: 1- inoculación con *Achromobacter* sp. UYSO01; 2- inoculación con *Acinetobacter* sp. UYSO03; 3- control positivo (fertilización con urea equivalente a 150 kg N/ha) y 4- control negativo (sin inoculación y sin fertilización).

Por otro lado, para el caso de la variedad LCP, el ensayo se montó el 15 de setiembre del año 2011, siendo la primera cosecha el 13 de setiembre del 2012 y la segunda el 18 de setiembre del 2013. En este ensayo se evaluaron 4 tratamientos: 1) inoculación con *Kosakonia* sp. UYSO10; 2) inoculación con *Rhizobium* sp. UYSO24; 3) control positivo (fertilización con urea equivalente a 150 kg N/ha) y 4) control negativo (sin inoculación y sin fertilización).

La inoculación de los esquejes con las cepas a evaluar se realizó en tanques limpios de 200 l. Para cada tratamiento, se mezcló en 150 l de agua, 200 g del bioprotector A.D.Cell (se-

gún recomendaciones del fabricante, Lage y Cía), con 600 g de turba (Lage y Cía), inoculada con la cepa a evaluar a una concentración de  $1 \times 10^9$  células/g. Los esquejes se sumergieron durante 1 h para luego sembrarlos inmediatamente a razón de 20 esquejes continuos por



**Figura 3. Implantación de uno de los ensayos de campo.** Forma de inoculación: **a)** mezcla inicial del adherente, **b)** incubación de las cañas en suspensión con adherente y turba inoculada, **c)** sembrado en campo.

surco (Figura 3). La inoculación y la siembra se realizaron con todas las precauciones necesarias para evitar contaminación entre los tratamientos. Los esquejes se taparon inmediatamente de colocados en los surcos para evitar su desecación y previo al riego inicial se añadió al voleo fertilizante fosfatado (120 unidades de P/ha).

En la instalación y manejo del ensayo se siguió el paquete tecnológico recomendado por ALUR a los agricultores de caña de azúcar. Por lo tanto, a los 5 días después de la siembra se aplicó herbicida (erbacil 0,8 kilos, atrazina 1,0 litros, ametrina 1,5 litros), en forma total con máquina pulverizadora de barra de 400 litros con boquillas 150-06 abanico plano y un gasto de agua fue de 200 litros por hectárea. A los 90 días se adicionó fertilizante potásico (160 unidades de K/ha) y a los 100 días se añadió 150 unidades de N/ha a los tratamientos con N.

Por otra parte, la re-inoculación de las plantas luego del corte del primer año, se realizó mediante asperjado utilizando una mochila de 16 l, en forma dirigida sobre la caña de azúcar ya emergida (lo más al ras del suelo posible (Figura 4).

En ambos experimentos de campo, al momento de las cosechas se analizaron las características biométricas del cultivo, así como las determinaciones estándar de productividad que realiza ALUR al cultivo.

## 1.5 RESULTADOS

### 1.5.1 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de las variedades comerciales de caña de azúcar más comunes por probables endófitos diazotófos

#### 1.5.1.1 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. LCP en condiciones de invernáculo

Los resultados del ensayo de respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación bacteriana mostraron que todos los tratamientos en los cuales se inoculó, a excepción de aquellos con la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO21, resultaron en una altura de tallo significativamente mayor en comparación con el control no inoculado (control negativo) (Tabla 1). Sin embargo, solo los tratamientos con plantas inoculadas con *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Kosakonia* sp. UYSO10, mostraron un diámetro del tallo significativamente mayor. Con respecto a los pesos secos radiculares, todos los tratamientos a excepción del tratamiento MIX, fueron significativamente mayores que el control negativo. Sin embargo, debe señalarse que la inoculación con las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02, *Kosakonia* sp. UYSO10, *Pseudomonas* sp. UYSO21 y *Rahnella* sp. UYSO22, fueron significativamente iguales del



**Figura 4.** Re-inoculación del ensayo de campo mediante asperjado utilizando una mochila de 16 l, en forma dirigida sobre la caña de azúcar ya emergida. **a)** Preparación de la mezcla de agua y turba inoculada, **b y c)** asperjado realizado por los técnicos de ALUR sobre el ensayo.



**Tabla 1.** Efecto de la inoculación con probables endófitos bacterianos sobre esquejes de caña de azúcar var. LCP, en condiciones de invernáculo

Tratamiento <sup>†</sup>	Altura del tallo (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso seco (g planta <sup>-1</sup> )		Concentración de N (mg N g <sup>-1</sup> peso seco)	Acumulación de N (mg planta <sup>-1</sup> )
			Raíces	Parte aérea		
Control negativo (-) <sup>a</sup>	13,19 a <sup>†</sup>	6,97 a	0,7491 a	1,7893 a	5,90 bcde	10,57 a
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	16,44 c	7,56 abc	1,4843 cde	2,2372 abc	5,11 abc	11,44 ab
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	16,25 c	7,99 c	1,378 bcd	2,6416 bcd	4,89 a	12,90 bc
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10	16,00 c	7,72 bc	1,6687 de	2,3595 bc	6,06 cde	14,30 cd
<i>Pantoea</i> sp. UYSO13	16,86 c	7,19 ab	1,4548 bcd	2,9210 d	4,98 ab	14,55 cde
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	14,43 ab	7,12 ab	1,4766 cde	2,1463 ab	6,17 ef	13,25 bc
<i>Rhanella</i> sp. UYSO22	15,57 bc	7,58 abc	1,6273 cde	2,6690 bcd	5,10 abcd	13,86 c
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24	16,25 c	7,25 ab	1,3536 bcd	2,6701 bcd	6,10 de	16,28 de
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27	16,36 c	7,03 a	1,2689 cd	2,7224 cd	5,17 abcd	14,07 c
MIX	16,43 c	7,38 abc	1,0973 ab	2,5889 bcd	5,09 ab	13,18 bc
<i>G. diazotrophicus</i> Pal5	16,19 c	7,41 abc	1,2680 bc	2,4314 bcd	6,84 ef	16,61 e
Control positivo (+)	22,20 d	9,06 d	1,8269 e	4,5594 e	7,06 f	32,17 f

<sup>†</sup>(-) plantas sin inocular ni fertilizar; (+) plantas suplementadas con urea (100 kg ha<sup>-1</sup>), MIX: inóculo hecho de una mezcla de todas las cepas ensayadas. <sup>‡</sup>Las medias entre dos tratamientos que presentan distintas letras significan que son diferentes significativamente mediante el test de LSD 0.05 test.

control fertilizado con N100 (control positivo). Con respecto a los pesos secos aéreos, los tratamientos de inoculación bacteriana, con la excepción de las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Pseudomonas* sp. UYSO21, fueron significativamente más altos que el control negativo. Sin embargo, todos los tratamientos excepto la cepa *Achromobacter* sp. UYSO02, mostraron una acumulación de N significativamente mayor que el control negativo. En este parámetro analizado, la

mayor acumulación de N en la planta se obtuvo en plantas inoculadas con las cepas *Neorhizobium* sp. UYSO24 y *G. diazotrophicus* (Tabla 1). En conjunto, los resultados mostraron una PCV significativa, así como una acumulación de N significativa cuando aislamientos dizótrofos seleccionados fueron inoculados en el cv. LCP 85384.

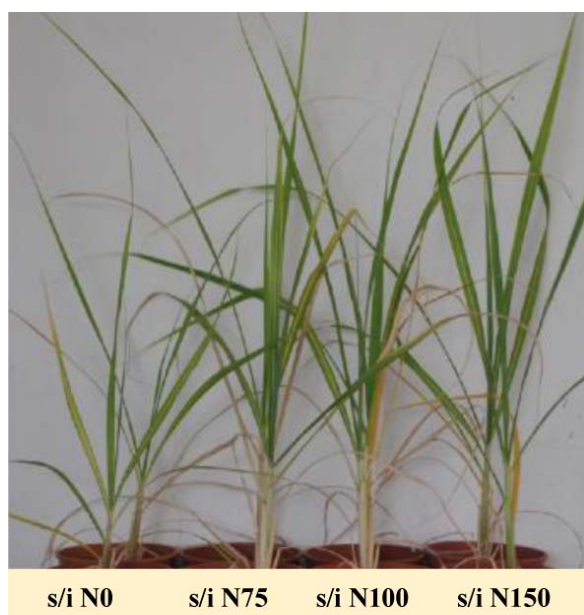
Por otro lado, se seleccionaron las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24,

**Tabla 2.** Efecto de la inoculación de las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24, en combinación con distintos niveles de fertilización química nitrogenada, sobre esquejes de caña de azúcar var. LCP.

Tratamiento Inoculación	Nivel de fertilización (kg N/ha)	Altura del tallo (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Peso seco (g)	
				Raíces	Parte aérea
Sin inoculación	0	13,56 a <sup>a</sup>	9,10 a	1,3569 a	2,5852 a
	75	17,83 b	10,20 cd	2,8688 bc	4,7364 d
	100	16,69 b	9,91 bcd	3,5244 c	4,0109 b
	150	17,01 b	10,26 d	3,7063 bc	4,3960 bcd
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10	75	17,07 b	9,69 abcd	2,8758 b	4,0098 b
	100	17,91 b	9,94 bcd	2,9387 bc	4,5729 cd
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24	75	17,14 b	9,62 abc	2,8736 b	4,3809 bcd
	100	17,96 b	9,43 ab	3,3433 bc	4,1456 bc

<sup>a</sup> Las medias que presentan la misma letra no son significativamente diferentes con un  $p < 0,05$ ,

con la finalidad de evaluar los efectos de la fertilización nitrogenada conjuntamente con su inoculación en la var. LCP. Ambas cepas han mostrado ser PCV de plantas micropropagadas (71, 72), así como de esquejes de tallos de la var LCP (Tabla 1). Los resultados de esta aproximación mostraron, por un lado, una respuesta significativa a los diferentes niveles de fertilización química nitrogenada aplicados, en comparación con el tratamiento no fertilizado (Tabla 2; Figura

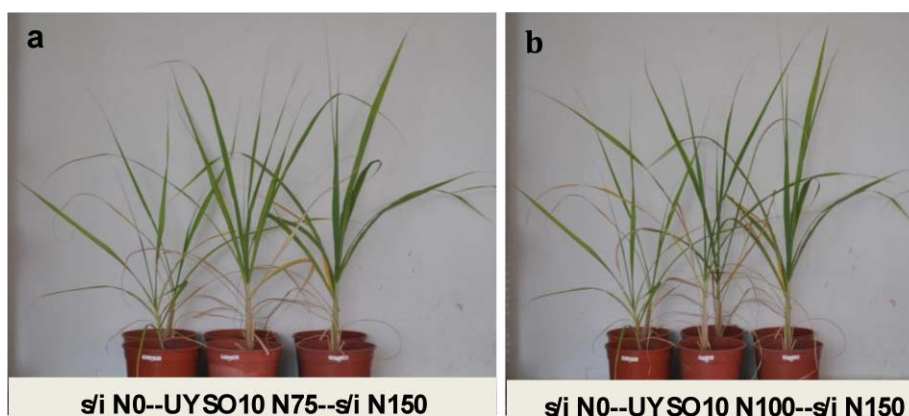


**Figura 5.** Curva de respuesta de la variedad LCP a la fertilización química nitrogenada. **s/i:** sin inocular; **N0, N75, N100 y N150:** diferentes dosis de fertilización química nitrogenada en kgN/ha. **s/i:** sin inocular

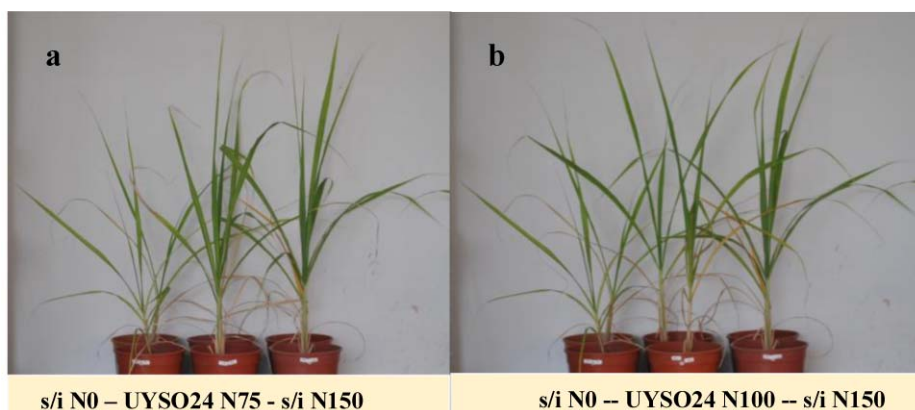
5). Por otro lado, cuando se evaluó el efecto combinado de la fertilización química (N75 y N100) y la inoculación con bacterias endófitas PCV, los resultados mostraron solo una diferencia significativamente positiva en el peso seco aéreo al inocularse la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 en combinación con una fertilización química para ambos niveles de fertilización evaluados (Tabla 2). Estos resultados muestran un claro efecto negativo de la fertilización química nitrogenada, para la mayoría de los tratamientos en las variables analizadas, para la variedad LCP (Figuras 6 y 7).

Asimismo, se determinó la población endófitica total de la raíces y tallos de los tratamientos evaluados en el ensayo anterior (Figura 8). Los resultados mostraron que la población endófitica de la raíz a los 15 dpi fue entre  $10^3$ - $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> mientras que a los 2 meses pi lo fue de entre  $10^4$ - $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup>. Por otro lado, la población endófitica del tejido aéreo fue de  $10^3$  ufc.g<sup>-1</sup> a los 15 dpi, mientras que a los 2 meses pi fue de entre  $10^1$ - $10^2$  ufc.g<sup>-1</sup>. No se observaron diferencias significativas en el número de bacterias recuperadas entre los tratamientos inoculados y bajo las diferentes dosis de fertilización nitrogenada. Sin embargo, la población total presente en las raíces fue significativamente mayor a los 2 meses pi (*p* valor 0,0003).

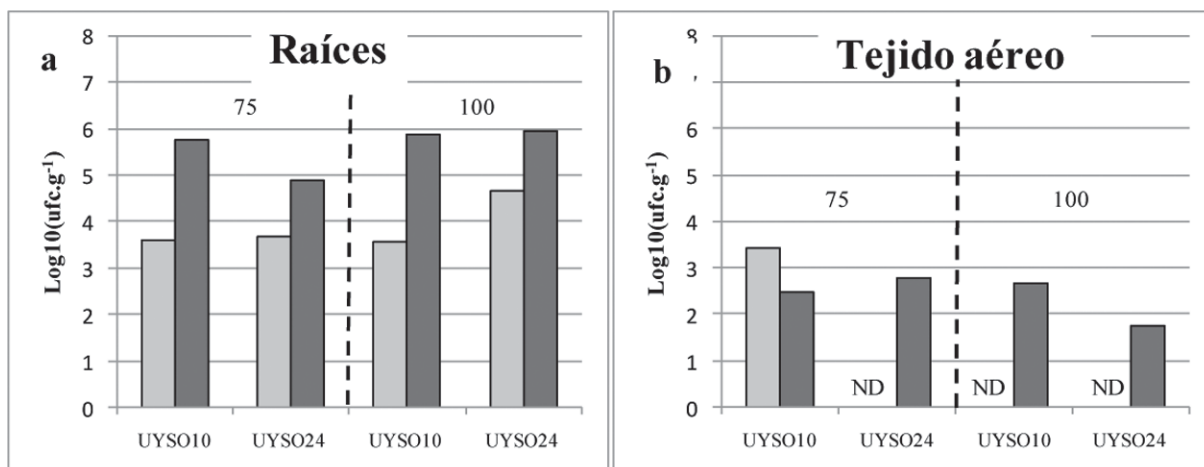
La falta de datos en el tejido aéreo a los 15 días se debe a que no todas las plantas germinadas sobrevivieron, por lo que hay tratamientos como los utilizados de referencia (macetas sin inocular), que no se incluyen en el gráfico. En su conjunto los resultados mostraron que ni la dosis



**Figura 6.** Respuesta de la variedad LCP a la inoculación con el aislamiento *Kosakonia* sp. UYSO10 a diferentes dosis de fertilización química nitrogenada **a:** 75 kgN/ha y **b:** 100 kg N/ha. **s/i:** sin inocular



**Figura 7.** Ensayo de respuesta de la variedad LCP a la inoculación con el aislamiento *Rhizobium* sp. UYSO24 a diferentes dosis de fertilización química nitrogenada **a:** 75 kgN/ha y **b:** 100 kg N/ha (**b**). **s/i:** sin inocular



**Figura 8.** Población bacteriana endófitica total presente en raíces (**a**) y tallos (**b**) de plantas de caña de azúcar var. LCP inoculadas con las cepas UYSO10 y UYSO24, en presencia de diferentes dosis de fertilización nitrogenada (75 y 100 kg N.ha<sup>-1</sup>). **ND:** No determinado. Barras gris claro: 15 dpi, Gris oscuro: 2 meses pi.

de N utilizada ni la bacteria inoculada afectó la población bacteriana endófitica total, sin embargo la misma aumenta para el caso de las población de la raíz en el tiempo evaluado.

#### 1.5.1.2 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. TUC en condiciones de invernáculo

Con el objetivo de probar si la var. TUC de caña de azúcar responde a la inoculación bacteriana, se realizó un experimento similar que con la variedad LCP (Tabla 3). Los resultados mostraron que la inoculación con las cepas de *Achromobac-*

*ter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Pantoea* sp. UYSO13, *Rhanella* sp. UYSO22 y el tratamiento MIX, presentaron valores significativamente mayores en la altura del tallo en comparación con el control negativo, siendo el tratamiento MIX el valor más alto, incluso mayor que el control positivo. Por otro lado, la inoculación con las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Rhizobium* sp. UYSO24, resultó en un diámetro del tallo significativamente mayor que el control negativo, incluso superando el control positivo como el caso de la cepa UYSO24 (Tabla 3). Con respecto al peso seco de la planta, las únicas diferencias significativamente mayo-

**Tabla 3.** Efecto de la inoculación con probables endófitos bacterianos sobre esquejes de cañas de azúcar var. TUC, en condiciones de invernáculo

Tratamiento <sup>†</sup>	Altura del tallo (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso seco (g planta <sup>-1</sup> )		Concentración de N (mg N g <sup>-1</sup> peso seco)	Acumulación de N (mg planta <sup>-1</sup> )
			Raíces	Parte aérea		
Control negativo (-)	10,28 a <sup>‡</sup>	5,88 a	0,5778 cd	1,2568 a	10,00 a	11,70 a
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	12,09 de	6,52 bcd	0,5421 cd	1,5811 bc	9,80 a	15,60 bc
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	11,69 bcde	6,73 cd	0,6542 d	1,9056 c	8,70 a	16,90 bc
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10	10,61 ab	6,22 abc	0,6172 d	1,2428 a	10,50 a	15,00 b
<i>Pantoea</i> sp. UYSO13	11,86 cde	6,13 ab	0,3176 a	1,4259 ab	N,D,	N,D,
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	10,88 abc	5,81 a	0,3863 ab	1,4237 ab	N,D,	N,D,
<i>Rhanelia</i> sp. UYSO22	11,53 bcd	6,08 ab	0,4568 bc	1,3159 ab	N,D,	N,D,
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24	11,39 abcd	6,91 d	0,5698 cd	1,5590 abc	10,30 a	14,80 b
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27	10,22 a	5,92 ab	0,3872 b	1,2157 a	N,D,	N,D,
MIX	12,76 e	6,31 abc	0,5891 cd	1,6387 bc	N,D,	N,D,
<i>G. diazotrophicus</i> Pal5	10,59 ab	6,20 abc	0,5946 cd	1,4792 ab	N,D,	N,D,
Control positivo (+)	11,53 bcd	6,15 abc	0,5473 cd	1,4250 ab	12,90 b	18,40 c

<sup>†</sup>(-) plantas sin inocular nifertilizar, (+) plantas suplementadas con urea (100 kg N ha<sup>-1</sup>), MIX: inóculo hecho de una mezcla de todas las cepas ensayadas. <sup>‡</sup>Las medias entre dos tratamientos que presentan distintas letras son diferentes significativamente mediante el test de LSD 0.05 test. N.D. no determinado.

res al control negativo se observaron en la parte área de las plantas inoculadas con las cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Achromobacter* sp. UYSO02 junto con el tratamiento MIX. En este caso el tratamiento inoculado con la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 fue significativamente mayor que el control positivo. Finalmente, aunque todos los valores de acumulación de N fueron significativamente mayores que el control negativo para todos los tratamientos inoculados, no hubo diferencias entre ellos, exceptuando los valores de control positivo sin inocular que fueron más altos.

Para el cultivar de caña en estudio, también se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes niveles de fertilización química nitrogenada (N75, N100 y N150), en combinación con la inoculación de las cepas PCV *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 (Tabla 4, Figura 10 y 11). Estas cepas fueron seleccionadas ya que mostraron diferencias altamente significativas del control negativo en la mayoría de los parámetros evaluados (Tabla 3). Los resultados para este cultivar mostraron, por un lado, un efecto PCV significativo a la fertilización química nitrogenada aplicada, en comparación con el tratamiento no fertilizado, excepto para los diámetros de los

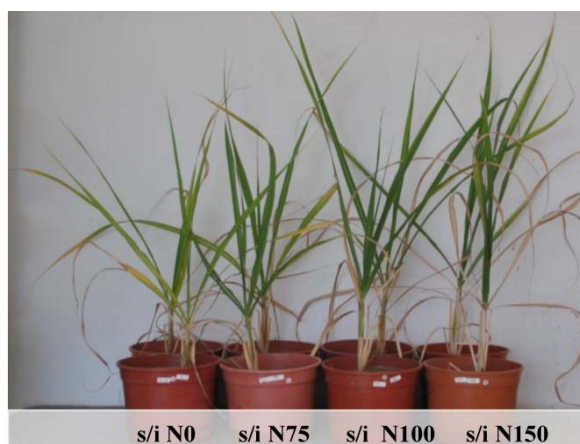
tallos (Tabla 4). Por otro lado, cuando se estudió el efecto combinado del nivel de fertilización química nitrogenada y la inoculación bacteriana, se pudo observar que las plantas inoculadas con la cepa UYSO02 a N75, tenían valores de alturas y diámetros de tallos significativamente mayores que el tratamiento no inoculado al mismo nivel de fertilización, y que los valores fueron similares a los obtenidos en los tratamientos N100 y N150 sin inoculación. Asimismo, se observó un efecto similar para la misma cepa en el tratamiento con N100, a excepción de la altura del tallo. En cuanto a los pesos secos, la única diferencia significativa observada fue en la parte aérea del tratamiento N75 inoculado con la cepa UYSO02. Dichos valores también fueron similares a los obtenidos en los tratamientos N100 y N150 sin inoculación (Tabla 4).

Asimismo, para aquellos tratamientos inoculados con la cepa UYSO03, los resultados mostraron que, de las variables evaluadas, solo el diámetro del tallo fue significativamente mayor en el tratamiento N75 con respecto al nivel de fertilización con N75 sin inocular. Cabe resaltar que este valor fue significativamente similar al de los tratamientos con N100 y N150 sin inoculación (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto de la inoculación con las cepas *Achromobacter* sp. UYSO01 y *Acinetobacter* sp. UYSO03, en combinación con distintos niveles de fertilización química nitrogenada sobre esquejes de caña de azúcar var. TUC.

Inoculación	Tratamiento Nivel de fertilización (kg N/ha)	Altura del tallo (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso seco (g planta <sup>-1</sup> )		Concentración de N (mg N g <sup>-1</sup> peso seco)	Acumulación de N (mg planta <sup>-1</sup> )
				Raíz	Aéreo		
Sin inoculación	0	10,39 a <sup>a</sup>	7,96 a	2,1049 ab	2,3171 a	4,73 a	11,33 a
	75	13,20 b	8,05 a	3,5731 bcde	3,6380 b	7,20 cd	24,46 b
	100	14,80 bc	8,50 ab	4,8915 e	4,2080 bc	7,29 cd	30,55 b
	150	14,52 bc	8,57 abc	2,7194 abc	3,9624 bc	9,14 d	43,38 c
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO01	75	15,93 c	9,27 cd	3,2077 abcd	4,5273 c	5,26 ab	24,18 b
	100	14,66 bc	9,35 d	3,4293 cde	4,3900 bc	5,75 bc	25,34 b
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	75	14,70 bc	8,90 bcd	3,5813 de	4,2384 bc	6,94 cd	29,69 b
	100	15,51 c	8,86 bcd	4,9673 cde	4,0806 bc	6,98 cd	29,73 b

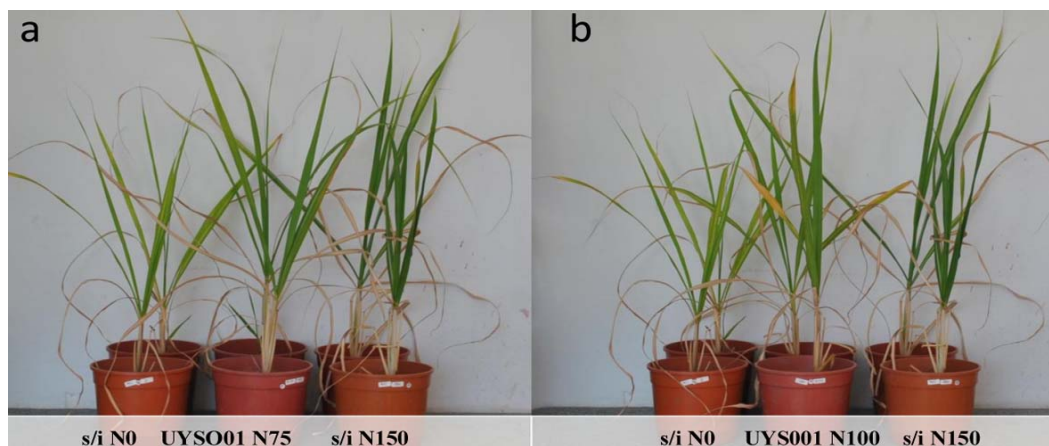
<sup>a</sup>Las medias que presentan la misma letra no son significativamente diferentes con un  $p < 0,05$ .



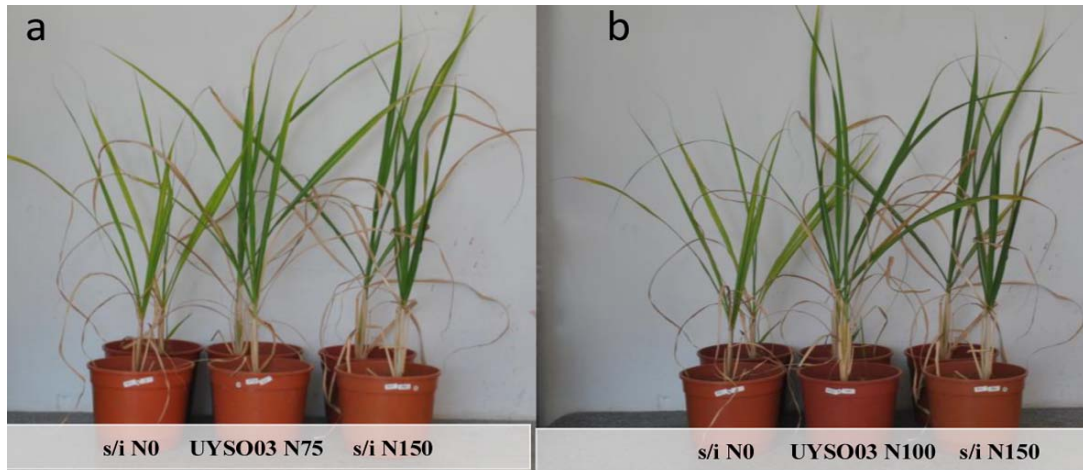
**Figura 9.** Curva de respuesta de la variedad TUC a la fertilización química nitrogenada. s/i: sin inocular; N0, N75, N100 y N150 diferentes dosis de fertilización química nitrogenada en kg N/ha.

En su conjunto, los resultados mostraron nuevamente un fuerte efecto del nivel de fertilización química nitrogenada sobre el efecto PCV de las bacterias diazotróficas inoculadas. Además, en la variedad TUC, la combinación de la fertilización y la inoculación bacteriana fue sinérgica en términos del efecto PCV evaluado.

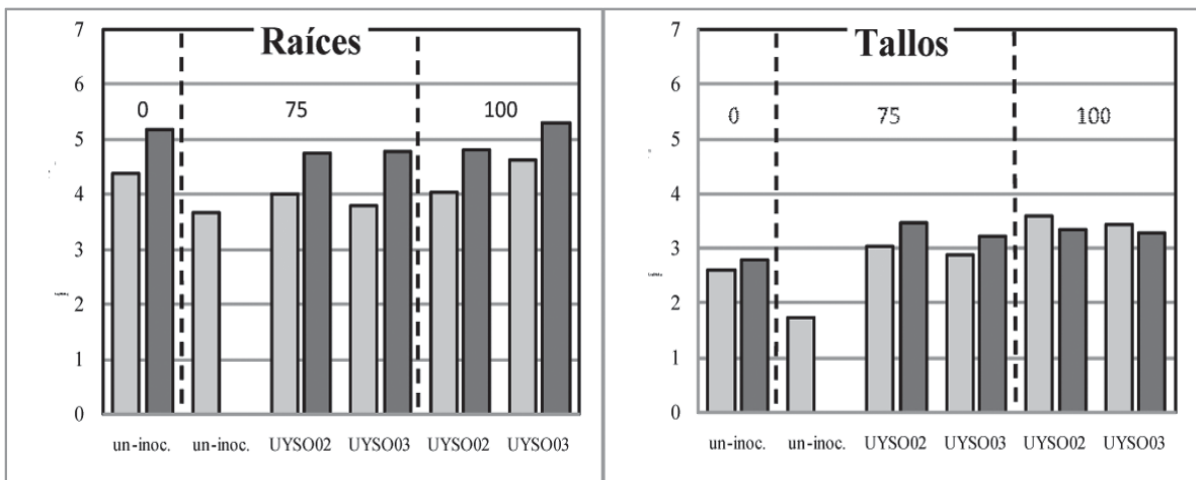
Por último, se determinó también la población endófitica total de la raíces y tallos de los tratamientos evaluados en el ensayo anterior. Para esto, el número total de bacterias endófitas cultivables se enumeró en este cultivar 15 días y 2 meses pi mediante conteo de unidades formadoras de colonia (Figura 12). Los resultados mostraron que la población endófitica de las raíces fue de  $10^3$  a  $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> a los 15 días pi, y de  $10^4$  a  $10^5$



**Figura 10.** Respuesta de la variedad TUC a la inoculación con el aislamiento *Achromobacter* sp. UYSO01 a diferentes dosis de fertilización química nitrogenada (a) 75 kg N/ha y (b) 100 kg N/ha.



**Figura 11.** Respuesta de la variedad TUC a la inoculación con el aislamiento *Acinetobacter* sp. UYSO03 a diferentes dosis de fertilización química nitrogenada (a) 75 kgN/ha y (b) 100 kg N/ha.



**Figura 12.** Población bacteriana endofítica total presente en (a) raíces y (b) tallos de plantas de caña de azúcar (var. TUC) inoculadas con las cepas UYSO02 y UYSO03, en presencia de diferentes dosis de fertilización nitrogenada (75 y 100 kg N.ha<sup>-1</sup>). Barras gris claro: 15 días pi, Gris oscuro: 2 meses pi.

ufc.g<sup>-1</sup> a los dos meses pi. Por otro lado, en el tejido aéreo, la población endofítica fue de 10<sup>1</sup> a 10<sup>3</sup> ufc.g<sup>-1</sup> 15 días pi, y de 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> ufc.g<sup>-1</sup> después de los meses pi. Asimismo, no hubo diferencias significativas en la población endofítica recuperada entre los tratamientos inoculados y no inoculados bajo diferentes dosis de N-fertilización. Sin embargo, la población endofítica total fue significativamente mayor a los 2 meses en las raíces (valor de  $p < 0,0001$ ), mientras que la población endofítica del tallo disminuyó significativamente (valor de  $p 0,0243$ ).

### 1.5.1.3 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. LCP en condiciones de campo

En este tipo de ensayos, la población, registrada como el número de tallos por hectárea, es uno de los factores más asociados al rendimiento del cultivo. En este sentido, en el primer año de crecimiento no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (72) (Tabla 5). Sin embargo, si se observaron diferencias significativas al segundo año, en

**Tabla 5.** Respuesta de plantas de caña de azúcar var. LCP, a la inoculación con *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 en condiciones de campo (segunda cosecha).

Tratamiento	Población (nº de tallos/ha)	Peso individual de tallos (g)	Productividad (ton caña/ha)	Productividad (ton azúcar/ha)
Control negativo (-)	131,01 a <sup>†</sup>	422,05 a	55,29 a	7,113 a
UYSO10	145,55 b	374,43 a	54,33 a	7,699 a
UYSO24	133,05 a	432,38 a	57,57 a	7,227 a
Control positivo (+)	147,12 b	426,70 a	62,62 a	8,231 a

<sup>†</sup>Las medias que presentan la misma letra no son significativamente diferentes con un  $p < 0,05$ .

donde el control positivo (realizado en condiciones similares al plantado por Alur) y el inoculado con la cepa UYSO10, fueron los de mayor población y se diferenciaron significativamente de los demás tratamientos (Tabla 5). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el resto de las variables evaluadas. Cabe resaltar que, en el primer año, durante la implantación y los primeros meses de desarrollo del ensayo, el ensayo fue muy afectado por el clima (72).

En su conjunto los resultados muestran un efecto PCV de la inoculación bacteriana con la cepa UYSO10 en la productividad de la variedad LCP.

#### 1.5.1.4 Estudios de promoción del crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar var. TUC en condiciones de campo

Los resultados obtenidos a partir de la primera cosecha realizada en el mes de julio para el cultivar en evaluación, se presentan en la Tabla 6. En la misma se muestran las características biométricas evaluadas, así como las

determinaciones estándares que se realizan en los ensayos de ALUR. Como se observa, el análisis estadístico de las variables evaluadas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, se puede observar que para la mayoría de las variables medidas, los tratamientos inoculados presentaron valores mayores que el control negativo, particularmente el tratamiento inoculado con la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 (Tabla 6).

Luego de la cosecha, los tratamientos fueron re-inoculados en el caso correspondiente, dejándose crecer el ensayo por un año adicional, momento en el cual fue cosechado y evaluado (Tabla 7). En este caso, las variables informativas fueron los kilos de caña por hectárea (KCH), el peso del tallo (PT), los kilos de azúcar por hectárea (KAH) y el largo del tallo (LARCAÑA). Los resultados mostraron que, para las variables mencionadas, el control positivo (fertilizado de acuerdo al paquete tecnológico de ALUR), fue significativamente mayor que el control negativo (sin fertilizar, ni inocular). Sin embargo y a pesar de que los tratamientos inoculados presentaron para la mayoría de las variables valores intermedios entre ambos con-

**Tabla 6.** Respuesta de plantas de caña de azúcar var. TUC, a la inoculación con las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 en condiciones de campo (primera cosecha).

Tratamiento	Nº de tallos/ha	Caña kg/ha	Peso de cada tallo (g)	Rinde en azúcar (%)	Azúcar/ha	% de fibra	Daños por dia-traea (%)	Largo del tallo (cm)	Entrenudos por tallo	Diámetro de tallo (cm)
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	97956,7 a	49627,4 a	507,9 a	12,0 a	5965,4 a	15,5 a	0,007 a	174 a	18,6 a	19,6 a
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	104206,7 a	51502,4 a	497,5 a	12 a	6162,3 a	15,8 a	0,017 a	168,8 a	17,8 a	19,5 a
Control (-)	97476 a	47716,3 a	491,2 a	11,9 a	5684,7 a	15,4 a	0,02 a	165,6 a	17,7 a	19,4 a
Control (+)	107572,1 a	49435,1 a	458,2 a	11,6 a	5766,8 a	15,6 a	0,001 a	160,2 a	17,2 a	18,4 a

**Tabla 7.** Respuesta de plantas de caña de azúcar de la variedad TUC, a la inoculación con las cepas *Achromobacter* sp. UYSO01 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 en condiciones de campo (segunda cosecha).

Tratamiento	NTH*	KCH	PT	RIT	KAH	FIB	LARCAÑA	ENTR	DIAM
UYSO01	109495,2	58131,0 b	529,6 b	12	7026,8 b	15,43	189,1 ab	19,9	15,34
UYSO03	111658,7	60072,1 b	538,5 b	12,5	7500,0 b	14,4	192,3 ab	20,3	20,75
Control (-)	110937,5	53287,3 b	481,0 b	11,9	6365,5 b	15,7	183,8 b	18,9	19,45
Control (+)	131610,6	84801,7 a	650,4 a	12,2	10360,0 a	13,92	205,5 a	20,5	19,75
<b>p-valor</b>	0,2106	<0,0001	0,0031	0,3034	0,0001	0,0896	0,0304	0,2545	0,3407

\*NTH: número de tallos por hectárea; KCH: kilos de caña por hectárea; PT: peso del tallo en gramos; RIT: % de rendimiento industrial teórico; KAH: kilos de azúcar por hectárea; FIB: fibra en %; LARCAÑA: largo en cm; ENTR: número de entrenudos y DIAM: diámetro en cm.

troles, los valores no se diferenciaron significativamente del control positivo (Tabla 7).

En conjunto los resultados mostraron la ausencia de un efecto PCV al inocular con las cepas evaluadas en la variedad TUC, en condiciones de campo.

## 1.6 DISCUSIÓN

### 1.6.1 La promoción del crecimiento vegetal desde de la especificidad planta-bacteria

Diferentes tipos de bacterias diazotróficas se han aislado de cultivares de caña de azúcar en varias regiones del mundo (78–82). Asimismo, los efectos PCV de bacterias asociadas o endófitas como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* y *Burkholderia* spp., sobre variedades de caña de azúcar han sido ampliamente reportados (81, 83–85). En consecuencia, en los últimos años se ha realizado por ejemplo en Brasil, un gran esfuerzo con el objetivo de desarrollar un inoculante bacteriano de caña de azúcar basado en un consorcio de bacterias diazotróficas (81, 84). En ese sentido, la evaluación de los resultados obtenidos utilizando ese consorcio como inoculante en diferentes cultivares de caña de azúcar, en diferentes zonas geográficas de Brasil, con diferentes propiedades abióticas, dio lugar a una amplia gama de respuestas, algunas de las cuales fueron tan

buenas como los controles químicos fertilizados con N (86–89).

En un estudio anterior, se construyó una colección de bacterias diazotróficas probablemente endófitas, asociadas a las variedades comerciales de caña de azúcar uruguayos, la cual fue caracterizada fenotípica y genotípicamente (71, 72). Asimismo, un conjunto de estos aislamientos fue evaluado como inoculantes en ensayos de PCV en la variedad LCP en condiciones *gnotobióticas* (72). Dichos aislamientos fueron seleccionados de acuerdo con sus características PCV *in vitro* y su afiliación filogenética (71, 72). En el presente estudio, se inoculó el mismo conjunto de cepas en esquejes de dos de los principales cultivares comerciales de caña de azúcar plantados en Uruguay: LCP y TUC.

Para el caso del cv. LCP, y de acuerdo con los resultados anteriores (72), las mejores cepas PCV para casi todos los parámetros evaluados fueron *Rhizobium* sp. UYSO24 y *Kosakonia* sp. UYSO10. Ambas cepas fueron reportadas como diazotrofas, así como productoras de auxina (71) y al ser inoculadas las plantas mostraron una acumulación significativa de N en comparación con las plantas de control negativo (26 % y 35 % de incremento para la cepa UYSO10 y UYSO24, respectivamente). En este contexto, podemos especular razonablemente que el efecto PCV observado pudo deberse a la FBN. En este sentido, previamente se reportó que la var. LCP obtiene una cantidad significativa de sus necesidades de N a través



de FBN (71, 72), necesitándose más experimentos para confirmar esta hipótesis. Con respecto al género *Kosakonia*, diversos estudios han reportado varias cepas como PCV de arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y caña de azúcar (90–93). Por otro lado, según la bibliografía consultada, no se ha reportado hasta ahora trabajos que demuestren los efectos PCV sobre la caña de azúcar por bacterias relacionadas con el género *Rhizobium*.

Por otro lado, para la var TUC, las mejores cepas PCV identificados fueron *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Acinetobacter* sp. UYSO03. Curiosamente, ambas cepas también mostraron efectos PCV para algunas de las variables evaluadas cuando se inocularon en la var. LCP. Las mismas fueron definidas previamente como diazotrofos, productores de auxina, solubilizadores de fosfato y, en el caso de la cepa UYSO03, como productora de sideróforos (71). Diferentes estudios han reportado los efectos PCV de cepas endófitas y rizosféricas del género *Achromobacter* incluyendo *Prosopis strombulifera*, trigo (*Triticum aestivum*) y colza (*Brassica napus*) (94–96). A su vez, para cepas del género *Acinetobacter* se ha reportado su capacidad PCV en maíz y mijo perla (*Pennisetum glaucum*) entre otros cultivos (97-99).

Por otra parte, cabe señalar que la cepa *G. diazotrophicus* Pal5, utilizada como referencia en los ensayos de PCV, fue PCV de la var. LCP, pero no de la var. TUC. Dicha cepa de referencia es un endófito de caña de azúcar y su efecto PCV al inoculase en caña de azúcar está bien documentado (83, 100). Sin embargo, en estudios previos, no fue posible aislar *G. diazotrophicus* a pesar de haberse empleado la metodología específica y los medios recomendados para su aislamiento (71). Probablemente esto se debió a las características bióticas y abióticas del cultivo en la zona de producción, así como al cultivar de caña de azúcar (101, 102).

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio demostraron que las respuestas de los dos cultivares de caña de azúcar a la inoculación con cepas diazotrófica, fueron diferentes, resaltando la especificidad de las interacciones beneficiosas entre plantas y bacterias. Esto está de acuerdo con varios informes

que señalan que los efectos de la PCV dependen de las condiciones bióticas y abióticas, así como de la especificidad y compatibilidad de los genotipos de plantas y bacterias (63, 87, 103, 104).

### 1.6.2 Los niveles de fertilización química nitrogenada afectan la promoción del crecimiento vegetal

El efecto positivo de la fertilización química nitrogenada en los cultivos es bien conocido y es por eso que comúnmente estas prácticas se llevan a cabo en el campo. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo en los tratamientos fertilizados, pero no inoculados, mostraron que hubo una respuesta diferencial dependiendo del cultivar evaluado, siendo la respuesta más acentuada en la var. TUC. Esta observación está de acuerdo con las evaluaciones en campo de los mismos cultivares en respuesta a la fertilización química nitrogenada realizadas previamente por ALUR (Hackembruch com. pers.). Por otro lado, si se observaron diferencias significativas en algunas de las variables evaluadas cuando se inocularon bacterias en combinación con el fertilizante químico nitrogenado. En este sentido, las mejores respuestas se obtuvieron para lavar. TUC inoculado con la cepa *Achromobacter* sp. UYSO02 con un nivel de fertilización N75. Teniendo en cuenta que no se espera que las bacterias endofíticas satisfagan las necesidades totales de N de la planta como se esperaría, por ejemplo, de rizobios inoculados en algunas leguminosas (105), es razonable evaluar sus contribuciones en combinación con diferentes niveles de la N-fertilización. Los resultados obtenidos están de acuerdo con previos los cuales destacan que se podrían lograr buenos resultados utilizando dosis de fertilización química nitrogenada de nivel medio en combinación con la inoculación bacteriana y que se debería concentrar más esfuerzos de investigación en esta dirección (106).

En ese sentido en este trabajo se realizaron también ensayos de campo en los que se evaluó la respuesta de la inoculación bacteriana, en ambas variedades, empleando como inoculantes los mismos aislamientos evaluados en combinación con diferentes dosis de fertilización química

nitrogenada. En este caso, también se observó un efecto diferencial en cada cultivar destacándose la respuesta de la var. LCP en la productividad al inocularse con la cepa UYSO10, resultado muy prometedor.

## 1.7 CONCLUSIONES

En este trabajo se demostraron los efectos PCV de cuatro diazotrofos, probables endófitos, al inocularse en las variedades de caña de

azúcar más comunes cultivados en Uruguay. Estos efectos fueron modificados por el genotipo de la planta, así como por el nivel de fertilización química nitrogenada, sugiriendo la posible participación de la FBN en los efectos PCV observados. Los resultados obtenidos en este trabajo resaltan la importancia de continuar las evaluaciones de las cepas PCV de la colección como inoculantes en sistemas más complejos, ya que son los pasos necesarios y sientan las bases para su aplicación biotecnológica como bioinoculantes.

## PARTE 2:

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

### 2.1 HIPÓTESIS

Las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 son endófitos verdaderos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar en las cepas UYSO10 y UYSO24 características fenotípicas posiblemente involucradas en la colonización e infección radicular.
2. Describir el proceso de colonización superficial, infección y colonización de los tejidos internos de las plantas de caña de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24, mediante microscopía.
3. Cuantificar la población endofítica de las cepas UYSO10 y UYSO24 en los tejidos internos de plantas inoculadas de caña de azúcar var. LCP.

### 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.3.1 Cepas bacterianas y plantas

Las cepas bacterianas empleadas en este capítulo se listan en la Tabla 8. Por otra parte, se utilizaron plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP, amablemente cedidas por la Dra. Alicia Castillo de la Unidad de Biotecnología del INIA (72, 107).

#### 2.3.2 Identificación *in vitro* de factores bacterianos vinculados a la interacción planta-bacteria

##### 2.3.2.1 Búsqueda de actividades enzimáticas potencialmente relacionadas a la degradación de la pared celular vegetal

Las actividades **endoglucanasa** y **hemicelulasa** fueron evaluadas inoculando con ansa las cepas en estudio, en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI sólido (Anexo A), suplementado con carboximetil celulosa sal (CMC) 0,2 % (p/v) o avicel 0,5 % (p/v), respectivamente (108). A los 7 días posteriores a su inoculación (pi), las colonias fueron removidas utilizando algodón humedecido en NaCl 1 M y las placas incubadas con 10 ml de Rojo Congo 0,05 % (p/v), por 16 h a 4 °C, para finalmente, ser lavadas con NaCl 1 M durante 20 min. En ambos casos, las cepas positivas fueron identificadas por la aparición de un halo de degradación alrededor de la colonia y se empleó como control positivo la cepa *Acinetobacter* sp. UYSB41 (Tabla 8).

La actividad **proteasa** fue evaluada en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con leche en polvo 5 % (p/v). Las cepas fueron consideradas positivas cuando a las 48 h pi se observó un halo translúcido alrededor de las colonias (109). Como control positivo se utilizó el aislamiento UYFA144 (Tabla 8).

En la evaluación de la actividad **lacasa**, las cepas se inocularon en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY (Anexo A), suplementado con Azul brillante de Remazol (ABR) 0,04 % (p/v)

**Tabla 8.** Cepas empleadas en el trabajo realizado en la parte 2.

Cepa	Características	Referencia
<b>Cepas en estudio</b>		
<i>Kosakonia</i> sp. UYSO10	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad FAM 81-77, en medio de cultivo LGI-P. Promotora del crecimiento de cañas de azúcar var. LCP	(71, 72)
<i>Rhizobium</i> sp. UYSO24	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad TUC 77-42, en medio de cultivo LGI-P. Promotora del crecimiento de cañas de azúcar var. LCP	(71, 73)
<b>Cepas usadas como referencia</b>		
<b>De la colección de aislamientos de plantas de caña de azúcar del laboratorio</b>		
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO01, <i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03, <i>Pantoea</i> sp. UYSO13 y	Aisladas de tallos de caña de azúcar de las variedades CP 92-618, TUC 77-42 y FAM 81-77. Utilizadas en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros y de los cebadores utilizados para qPCR	(71)
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21 <i>Agrobacterium</i> sp. UYSO04, <i>Enterobacter</i> sp. UYSO08, <i>Enterobacter</i> sp. UYSO09, <i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27 y <i>Xanthomonas</i> sp. UYSO35	Aisladas de tallos de caña de azúcar de las variedades TUC 77-42 y TUC 78-12. Utilizadas en los ensayos de evaluación de la especificidad de los cebadores empleados para qPCR.	idem
<i>Rhanelia</i> sp. UYSO22	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad TUC 77-42. Utilizada en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos	idem
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO14	Aislada de tallos de caña de azúcar, variedad TUC 78-12, no promotora del crecimiento de cañas de azúcar var. LCP. Cepa utilizada como referencia en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos y en los estudios de colonización	(71, 73)
<b>De otras colecciones de aislamientos del laboratorio</b>		
<i>Rhizobium</i> sp. UYPR7. 63	Aislada de nódulos de angico, utilizada en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos	(112)
<i>Bacillus</i> sp. UYSB04	Aislada de plantas de sorgo dulce, variedad M81E. Utilizada como control positivo de la solubilización de potasio (observación del laboratorio)	(113)
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSB41	Aislada de plantas de sorgo dulce, variedad M81E. Utilizada como control positivo para la actividad endoglucanasas y hemicelulasas	(113)
Aislamiento UYFA144	Aislamiento de plantas de festuca. Utilizada como control positivo para la actividad proteasas	(114)
<b>Otras cepas usadas como referencia</b>		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	Endófito y PCV de caña de azúcar. Utilizada en los ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos y en los estudios de colonización	(115)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 242	Usada en ensayos de evaluación de la especificidad de los antisueros producidos	(116)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> CE52G	Utilizada como control positivo para la actividad lacasa	(117)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	Usada como control positivo para la actividad catalasa, superóxido dismutasa producción de sideróforos	(118, 119)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Usada como control positivo para la presencia de la enzima ACC desaminasa	(120)

o con guaiacol 0,01 % (p/v) (110). Las colonias se consideraron positivas cuando a los 5 días pi cambiaron su color a azul o marrón-rojizo, dependiendo del sustrato utilizado: ABR o guaiacol respectivamente. Como control positivo se utilizó la cepa *Sinorhizobium meliloti* CE52G (Tabla 8).

Por último, para la determinación de la actividad **peroxidasa**, las cepas se crecieron en pla-

cas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con 250 mg/l de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6ácido sulfónico) (ABTS) y para las Mn-peroxidasas medio LGI suplementado con 250 mg/l de ABTS y 100 mg/l de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (111). A los 5 días pi las placas se revelaron mediante incubación con 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10X (v) durante 20 min. Las cepas fueron consideradas

positivas cuando las colonias se tornaron de color verde oscuro o marrón (111).

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

### 2.3.2.2 Determinación de la presencia de enzimas antioxidantes

La presencia de las actividades **catalasa** y **superóxido dismutasa** (SOD), fueron evaluadas en extractos de proteínas totales de ambas cepas. Para ello, 5 ml de un cultivo bacteriano de cada cepa, crecido en tubos conteniendo medio de cultivo TY, fueron centrifugados a 5.000 g durante 5 min y las células suspendidas en buffer fosfato 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, pH 7,2. Posteriormente, las suspensiones fueron sonicadas 5 veces a potencia máxima durante 15s con un sonicador Ultrasonic Homogeneizer (Cole-Parmer Instruments Co.), y la suspensión obtenida centrifugada a 10.000 g por 10 min, conservándose el sobrenadante a -20 °C. Los extractos proteicos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida 8 % (p/v) naturalizantes, a 80 V durante 2 h. Cada actividad fue evaluada en geles independientes. En la determinación de la actividad catalasa, los geles fueron lavados 3 veces con agua destilada durante 20 min, e incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,015 % (v/v) en agitación. A continuación, fueron transferidos a un recipiente conteniendo una solución de FeCl<sub>3</sub> 1 % (p/v) y K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1 % (p/v). La actividad se evidenció por la aparición de bandas de color amarillo sobre fondo verde, momento en el que se detuvo la reacción con agua (121).

Por otro lado, los geles utilizados para visualizar la actividad SOD fueron lavados con agua destilada, e incubados en primera instancia en una solución conteniendo Nitro azul de tetrazolio 2,45 mM por 20 min, para luego incubarse en la oscuridad en una solución de riboflavina 0,028 mM, tetrametilendiamina (TEMED) 28 mM en buffer fosfato 50 mM pH 7,2, durante 20 min (121). Por último, se expuso el gel a la luz detectándose la actividad SOD por la aparición de bandas acromáticas sobre fondo oscuro. Como control positivo se incluyó la cepa *H. seropedicae* Z67 (Tabla 8).

### 2.3.2.3 Determinación de la movilidad bacteriana

En ambas cepas se analizó la presencia de flagelos, así como la capacidad de realizar *swimming*, *swarming* y *twitching*. La presencia de **flagelos** bacterianos se evaluó utilizando el método de tinción negativa (122). Para esto, células crecidas en medio de cultivo TY líquido, fueron lavadas con agua y fijadas en glutaraldehído 2,5 % (v/v) durante 1 h, para posteriormente ser lavadas cuatro veces con agua ultra pura estéril. Las células fijadas se transfirieron a grillas cubiertas con una película de Formvar (Fluka). Pasados 2 min de exposición al cultivo, la grilla se expuso a acetato de uranilo 2 % (p/v) por 1 min y fue lavada varias veces con agua ultra pura estéril por 1 min. Las grillas fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL (100 CXII, Japón), de la plataforma de Microscopía del IIBCE. Para cada cepa se observaron varias células a partir de dos experimentos independientes.

Para evaluar la capacidad de realizar *swimming* y *twitching*, se crecieron las cepas en medio de cultivo líquido TY, toda la noche. A partir de ese cultivo se inocularon por punción usando un escarbadiantes, placas conteniendo medio de cultivo TY y agar 0,3 % (p/v) o agar granulado 1 % (p/v), de acuerdo a cada determinación (122).

La capacidad de realizar *swarming* fue evaluada en placas conteniendo medio de cultivo TY suplementado con glucosa 0,5 % (p/v) y agar 0,5 % (p/v), e inoculadas con escarbadiantes a partir de las placas de *swimming* (122).

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

### 2.3.2.4 Determinación de la capacidad de formar biopelículas

La capacidad de formar biopelículas fue evaluada en microplacas de 96 pocillos utilizando el método de cristal violeta (CV) (123). Para esto, cada pocillo conteniendo 200 µl de medio de cultivo TY o MS suplementado con exudados (MS + exudados), fue inoculado con 1 x 10<sup>8</sup> células de cada cepa. El medio de cultivo MS + exudados se obtuvo a partir del medio de cultivo MS 1/10 sin N (124), el cual se expuso por 72 h a las secreciones

radiculares de plantas de caña de azúcar micro-propagadas. La microplaca fue incubada sin agitación durante 48 o 96 ha 30 °C. Posteriormente el sobrenadante fue removido y los pocillos se tiñeron con CV 0,1 % (p/v) durante 20 min. El exceso de CV fue removido mediante lavados con buffer fosfato y el CV unido a las paredes de los pocillos se solubilizó con etanol 95 %. Finalmente se midió la absorbancia de la suspensión a 570 nm. Como control se incluyeron pocillos sin inocular. Esta determinación fue realizada por quintuplicado para cada una de las cepas y condiciones.

### 2.3.2.5 Determinación de la capacidad de producir polihidroxibutirato

La producción de polihidroxibutirato (PHB) se evaluó en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LGI suplementado con glucosa en exceso (30 g/l) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  40 mM. Las placas inoculadas fueron incubadas por 48 ha 30 °C, momento en que fueron cubiertas con una solución de Rojo Nilo 0,01 % (p/v) en acetona. Una vez evaporada la acetona, las placas se observaron en un transiluminador bajo luz UV. Las colonias que presentaron fluorescencia fueron consideradas como positivas para la acumulación de lípidos y posible acumulación del polímero PHB (125). Como control positivo se utilizó *H. seropedicae* Z67 y como control negativo una cepa de *Escherichia coli* (125). La determinación se realizó por triplicado.

## 2.3.3 Búsqueda de factores promotores del crecimiento vegetal

### 2.3.3.1 Determinación de la capacidad de solubilizar potasio

La capacidad de solubilizar potasio fue evaluada en placas de Petri conteniendo medio de cultivo Aleksandrov (Anexo A). Las placas inoculadas fueron incubadas por 5 días a 30 °C, considerándose a una cepa solubilizadora de potasio, cuando se observó un halo traslúcido alrededor de la colonia. Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus* sp. UYSB04 (observación del laboratorio) (Tabla 8).

### 2.3.3.2 Determinación de la capacidad de producir sideróforos

Si bien anteriormente se había determinado que las cepas UYSO10 y UYSO24 no eran capaces de producir sideróforos en medio Cromo Azurol S. (CAS) (126), se decidió realizar una nueva determinación utilizando placas conteniendo medio de cultivo CAS modificado. En este caso se sustituyó en la receta original del medio CAS (Anexo A), la fuente de C, utilizando ácido málico 5 % (p/v), glucosa 2,5 % (p/v), piruvato de sodio 2,53 % (p/v) y acetato de sodio 2,46 % (p/v), teniendo en cuenta la composición del medio NFCC. Las placas inoculadas fueron incubadas por 48 ha 30 °C, considerándose una cepa positiva, cuando se observó un halo alrededor de la colonia. Como control positivo se utilizó la cepa *H. seropedicae* Z67 (Tabla 8). Ambas determinaciones descriptas se realizaron por triplicado.

### 2.3.4 Determinación de la capacidad de las cepas de crecer en distintos pH, fuentes de carbono y nitrógeno

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

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

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

Las fuentes de C y N se incorporaron en concentración final 0,05 % (p/v) o (v/v), según correspondiese. Las fuentes de C ensayadas

fueron: fructosa, lactosa, ácido pirúvico, citrato de amonio, cis-aconitato, glicerina y vinaza de ALUR, etanol, CMC, avicel y celobiosa y la fuente de N ensayada fue urea. Por otra parte, y también mediante curvas de crecimiento, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en: 1) medio de cultivo rico TY, 2) medio MS 1/10 sin N, empleados en los ensayos de interacción con plantas, 3) medio MS 1/10 sin N sin fuente de C y suplementado con apoplasto de caña de azúcar, obtenido a partir de plantas adultas y 4) medio MS 1/10 sin N suplementado con exudados radiculares, obtenido de plantas micropropagadas de la var. LCP. El apoplasto se obtuvo mediante centrifugación de los internodos de tallos de plantas de caña de azúcar provenientes de campo, previamente cortadas en trozos de 5 cm y esterilizados en su superficie por flambeo. Los mismos fueron colocados en tubos Falcon de 50 ml y sometidos a una primera centrifugación de 300 g durante 5 min. El líquido obtenido fue descartado y se realizó una nueva centrifugación a 3.000 g durante 20 min, considerándose el líquido obtenido como apoplasto (71, 127).

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

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

### **2.3.5 Descripción del proceso de infección y colonización de plantas de caña de azúcar micropropagadas, por parte de las cepas UYSO10 y UYSO24**

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

(3) cuantificación de la colonización endófito de plantas de caña de azúcar por conteo de unidades formadoras de colonia (ufc) en placa y PCR cuantitativa.

#### **2.3.5.1 Estudio de la colonización e infección de plantas micropropagadas de caña de azúcar por la cepa UYSO24, mediante microscopía**

En esta aproximación se emplearon técnicas de microscopía óptica (MO), electrónica de transmisión (MET), electrónica de barrido (MEB) y observaciones de microscopía electrónica de barrido (MEB).

Para ello, plantas de caña de azúcar var. LCP micropropagadas en etapa de enraizamiento, fueron transferidas de a 4, a un nuevo frasco conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS modificado (124) y como soporte bolitas de polipropileno. Al tercer día los frascos que no mostraron contaminación visible fueron inoculados con  $1 \times 10^7$  células de la cepa UYSO24 por planta. Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. El experimento se mantuvo en cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad a 30 °C y las plantas fueron cosechadas a 1, 6, 12, 24, 48 h y 6 días pi. Se procesaron 2 plantas (réplicas biológicas) por tiempo de cosecha evaluado. En el momento de la cosecha se separaron con un bisturí estéril, la base del tallo y las raíces. Los segmentos obtenidos fueron lavados con buffer fosfato y fijados con una solución de glutaraldehído 5 % (v/v) y paraformaldehído 4 % (p/v) en buffer fosfato, durante toda la noche a temperatura ambiente (100). El fijador residual fue removido mediante sucesivos lavados. Posteriormente se procedió a la deshidratación del material mediante la incubación de los tejidos en una serie de soluciones de concentración creciente de EtOH (15, 30, 50, 70, 90 y 2 veces en 100 % (v/v)), durante 15 minutos en cada una de las soluciones.

Las muestras procesadas para MO y MET se sometieron a infiltración con la resina acrílica LR White (Sigma). La misma se realizó mediante la inmersión de la muestra en soluciones de concentraciones crecientes de la resina, durante 7 días a 4 °C (100). Posteriormente, las muestras individuales, fueron cuidadosamente transferidas a

cápsulas transparentes de gelatina conteniendo resina fresca, y orientadas para obtener cortes transversales. Las cápsulas se polimerizaron a 60 °C durante toda la noche.

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

Para los estudios con MET se realizaron cortes ultrafinos de 60-70 nm en el ultramicrotomo utilizando una cuchilla de diamante. Las secciones fueron colectadas en gradillas de cobre hexagonal de malla 300-400. Las muestras fueron secadas con papel de filtro y contrastadas por inmersión en una solución de acetato de uranilo 5 % (p/v) durante 20 minutos, seguido de 2 lavados con agua destilada. A continuación, el material se incubó con citrato de plomo 0,2 % (p/v) en NaOH 0,01 N por 4 -5 min, seguido de 2 lavados con agua destilada (54). Las muestras fueron examinadas en un MET Zeiss EM-900.

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

### **2.3.5.2 Identificación de las cepas en estudio en cortes semi-finos y ultrafinos de tejidos de plantas, empleando antisueros específicos**

La identificación de las bacterias inoculadas en los cortes de microscopía se realizó mediante una inmuno-localización, utilizando antisueros

específicos para las cepas UYSO10 y UYSO24 disponibles en el laboratorio. En esta sección se analizaron también cortes obtenidos a partir de muestras de plantas de caña de azúcar var. LCP micropropagadas e inoculadas con la cepa UYSO10, que fueron procesadas para estudios de MO y MET previamente (107).

Para la visualización por MO, se realizaron cortes semi-finos como se describió anteriormente, los cuales fueron colectados en portaobjetos de vidrio cubiertos con BioBond (Life Science, USA). Posteriormente, los mismos fueron incubados primero durante 1 h en SIB y luego por 1 h con una dilución 1:10 del antisuero purificado o del suero pre-inmune en SIB\*. Luego de 3 lavados, los cortes fueron incubados durante 1 h en una dilución 1:50, del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo con una partícula de oro de 5 nm (British Biocell International, UK) en SIB (100). La marca de oro fue potenciada utilizando el kit de multiplicación de plata (BB Solutions, UK), siguiendo la recomendación del fabricante.

En el caso de la observación por MET se utilizó el mismo protocolo, pero en este caso, el anticuerpo secundario utilizado tenía asociado una partícula de oro de 15 nm (BB Solutions, UK). Los controles realizados en el análisis de los cortes seriados fueron: omisión del antisuero primario y reemplazo del antisuero primario por suero pre-inmune en la dilución apropiada. Las muestras fueron visualizadas mediante el uso de un MO de campo claro y un MET Zeiss EM-900.

### **2.3.5.3 Cuantificación de la colonización endófitas por las cepas UYSO10 y UYSO24 en tejidos de plantas cañas de azúcar micropropagadas**

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



### *i-Cuantificación de la colonización endófitas mediante recuento bacteriano: método de la gota*

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

### *ii a-Puesta a punto de la cuantificación de las cepas UYSO10 y UYSO24 en tejidos de plantas por PCR cuantitativa*

Previamente, se diseñaron cebadores específicos para las cepas UYSO10 (UYSO10for: 5' CCGTGCTGATTGACGGTTA 3' y UYSO10rev: 5' TCACATCCGGACTTGACAGAC 3') y UYSO24 (UYSO24for: 5' TGACTGTAGTCGGAGAAGAAGC 3' y UYSO24rev: 5' CAGTATCAAAGGCAGTTC-CG 3'), a partir de la secuencia del gen *ARNr* 16S (72, 107). La especificidad de los mismos fue evaluada *in silico* y el producto de la reacción de PCR confirmado mediante secuenciación. En este estudio se comenzó evaluando la especificidad de los cebadores *in vitro*, empleando como molde ADN genómico de las cepas: *Pseudomonas* sp. UYSO01, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Agrobacterium* sp. UYSO04, *Enterobacter* sp. UYSO08, *Enterobacter* sp. UYSO09, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27 y *Xanthomonas* sp. UYSO35 (Tabla 8).

La reacción de PCR cuantitativa fue realizada utilizando el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR (BIORAD) y las medidas correspondientes mediante la aproximación Sybr Green (129). La mezcla de reacción de PCR se realizó con el kit iQ SYBR Green Supermix (BIORAD), utilizando 1  $\mu$ M de cada cebador y 4 ng de ADN molde, en un volumen total de 25  $\mu$ l. Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo durante 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 58 °C (al final de este paso se tomó la medida de fluorescencia) y finalmente durante 30 s a 72 °C. La especificidad del producto fue confirmada en una curva de disociación

realizada entre 65 - 95 °C, aumentando de 0.5 °C cada 5 s. Los datos se analizaron en el software BIORAD CFX Manager 3.1.

### *ii b- Cuantificación de la colonización endófitas en los tejidos de las plantas mediante PCR cuantitativa*

Con el objetivo de desprender las células adheridas a las raíces de las plantas, las mismas fueron sonicadas durante 5 min en buffer fosfato y agitadas con vortex por 1 min en buffer fosfato fresco. A continuación, la parte aérea fue separada de la radicular con un bisturí estéril. A partir de 200 y 500 mg de raíces y parte aérea respectivamente, se extrajo el ADN total utilizando el kit comercial PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.). El ADN obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific) y su calidad evaluada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (p/v).

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

Número de copias =

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

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

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

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Identificación de características fenotípicas bacterianas en las cepas UYSO10 y UYSO24, posiblemente vinculadas a la interacción planta-bacteria

#### 2.4.1.1 Determinación de la presencia de enzimas potencialmente degradadoras de la pared celular vegetal

Los resultados mostraron que la única actividad positiva común a ambas cepas fue la presen-

cia de endoglucanasas (celulasas). Por su parte, la cepa UYSO24 presentó actividad lacasa, y ninguna de las cepas mostró actividad hemicelulasa, proteasa o peroxidasa bajo las condiciones ensayadas (Figura 13; Tabla 9).

#### 2.4.1.2 Determinación de la presencia de actividades enzimáticas antioxidantes

Los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas presentaron actividad superóxido dismutasa y catalasa (Tabla 9, Figura 14).

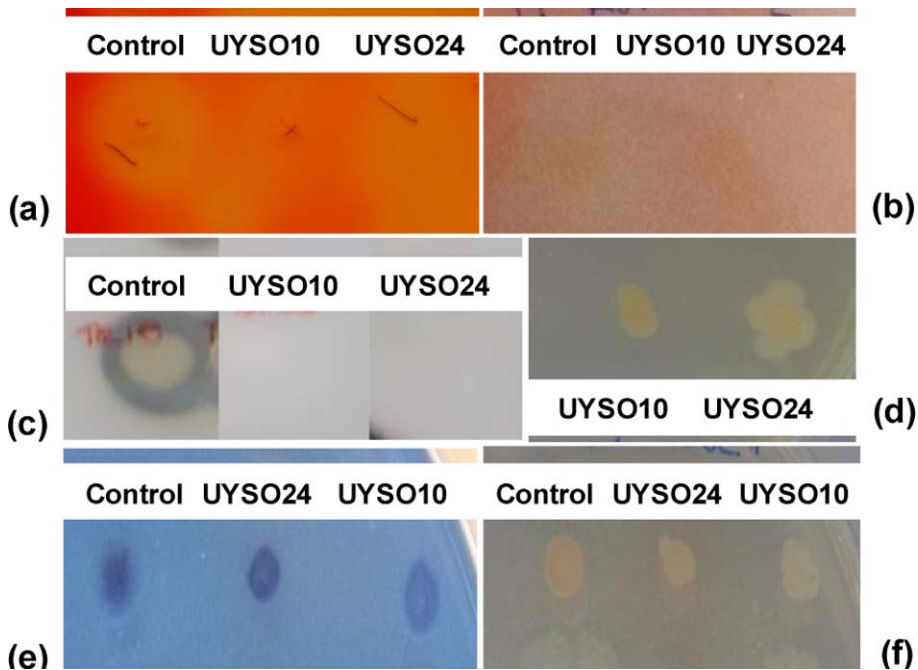


Figura 13. Vista de los ensayos en placa realizados para evaluar las actividades: endoglucanasas (a), hemicelulasas (b), proteasas (c), peroxidasas (d), lacasas usando como sustrato guaiacol (e) y ABR (f).

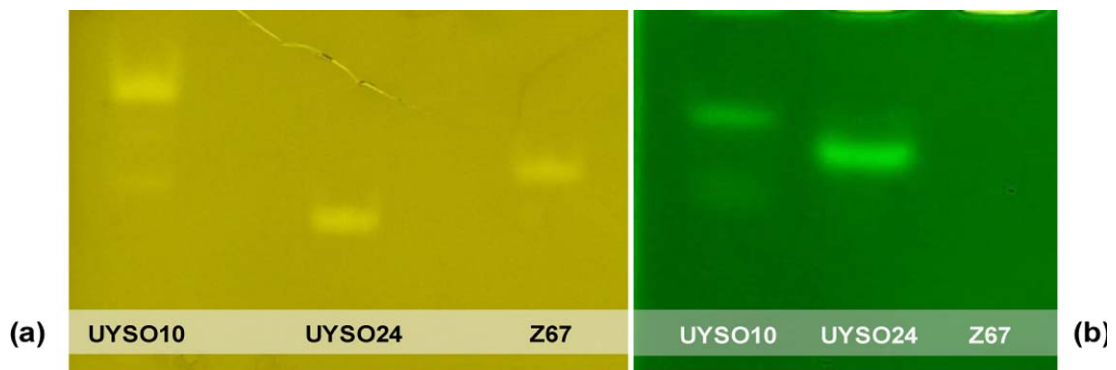


Figura 14. Vista de las actividades: (a) superóxido dismutasa y (b) catalasa, mediante geles de poliacrilamida nativos. Las cepas evaluadas fueron: UYSO10, UYSO24 y la cepa de referencia Z67.

**Tabla 9.** Determinación de potenciales características fenotípicas bacterianas involucradas en la interacción planta-bacteria.

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

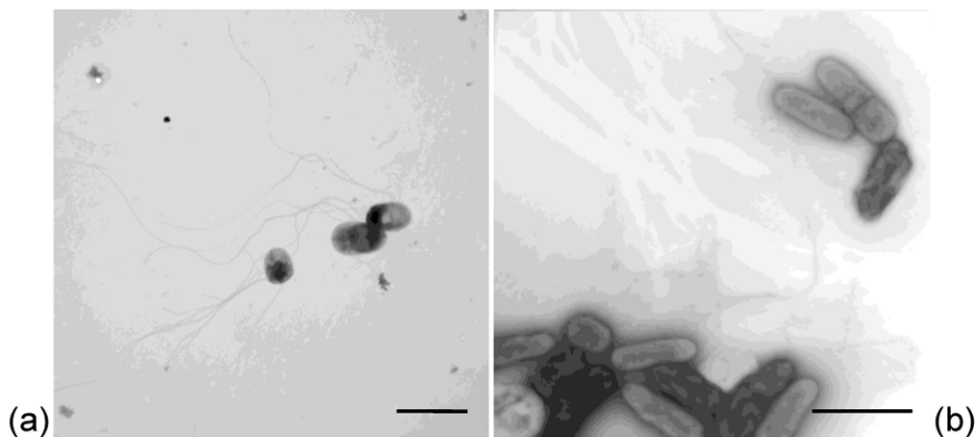
<sup>a</sup>La actividad se observó positiva a las 72 h pi; <sup>b</sup>medio de cultivo TY incubado a diferentes tiempos; <sup>c</sup>medio de cultivo MS suplementado con exudados.

#### 2.4.1.3 Determinación de la movilidad bacteriana

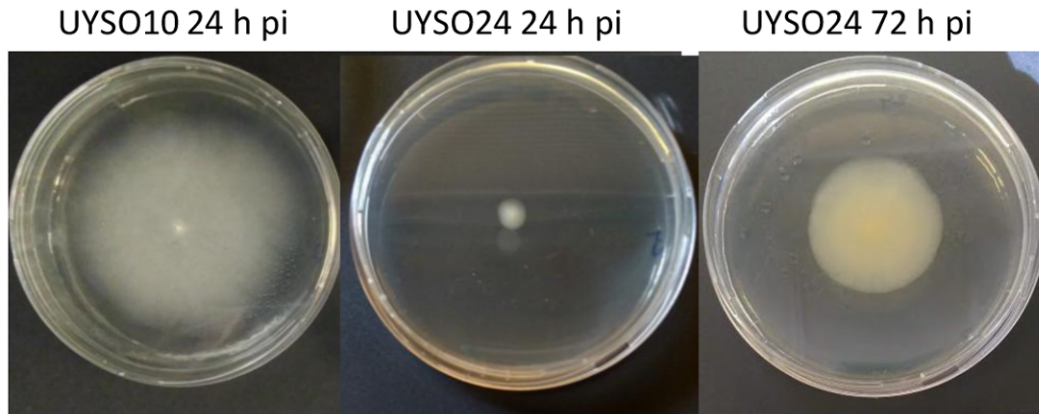
Mediante MET y utilizando la técnica de tinción negativa, se confirmó la presencia de 5-6 flagelos en la cepa UYSO10 y estructuras flagelares en la cepa UYSO24 (Tabla 9, Figura 15).

En referencia a los ensayos de placa, la cepa UYSO10 mostró ser capaz de moverse en forma

de *swimming* y *twitching*, mientras que la cepa UYSO24 no mostró ninguno de este tipo de movilidades bajo las condiciones evaluadas (Tabla 9, Figura 16) Curiosamente, luego de 72 h pi la cepa UYSO24 comenzó a desplazarse en el ensayo de *swimming*, aunque dicho movimiento no logro cubrir la placa de Petri como la cepa UYSO10 (Figura 16).



**Figura 15.** Micrografía electrónica de suspensiones bacterianas de las cepas (a) UYSO10 (barra = 2 µm) y (b) UYSO24 (barra = 2 µm), contrastadas con tinción negativa.



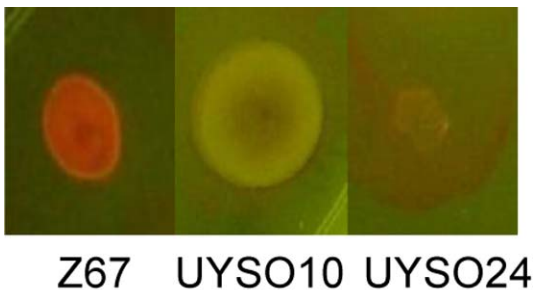
**Figura 16.** Vista de las placas donde se evaluó la capacidad de moverse en forma de *swimming*, en las cepas UYSO10 (a) y UYSO24 (b y c). La observación se realizó a las 24 h (a y b) y 72 h (c) pi.

#### 2.4.1.5 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

Los resultados mostraron que las cepas UYSO10 y UYSO24 no fueron capaces de formar biopelículas en el medio de cultivo TY, a las 48 h. Sin embargo, se detectó la formación de biopelículas a las 96 h por la cepa UYSO24 (Tabla 9).

#### 2.4.1.6 Determinación de la producción de polihidroxibutirato

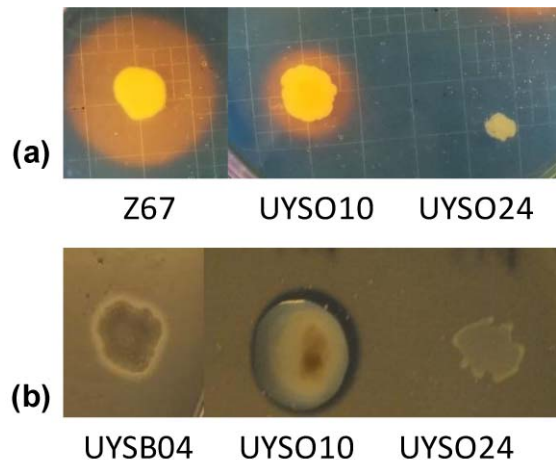
En este caso, los resultados mostraron que ninguna de las cepas evaluadas acumuló lípidos en las condiciones ensayadas (Tabla 9, Figura 17).



**Figura 17.** Vista del ensayo en placa realizado para la detección de PHB y/o acumulación de lípidos. Se evaluaron las cepas UYSO10 y UYSO24 y como control positivo se utilizó la cepa Z67.

#### 2.4.2 Identificación de características fenotípicas en las cepas UYSO10 y UYSO24 posiblemente involucradas en la promoción del crecimiento vegetal

A partir de la evaluación de una variante del medio de cultivo para la detección de sideróforos (CAS), se identificó como positiva la cepa UYSO10 en las condiciones ensayadas (Figura 18a). Por último, se observó que la cepa UYSO10 también fue capaz de solubilizar potasio (Figura 18b).



**Figura 18.** Vista de los ensayos en placa para la detección de productores de sideróforos (a) y solubilizadores de potasio (b). UYSO10: cepa *Kosakonia* sp. UYSO10, UYSO24 *Rhizobium* sp. UYSO24, Z67: cepa *H. seropedicae* Z67 (control positivo) y UYSB04: *Bacillus* sp. UYSB04 (control positivo).

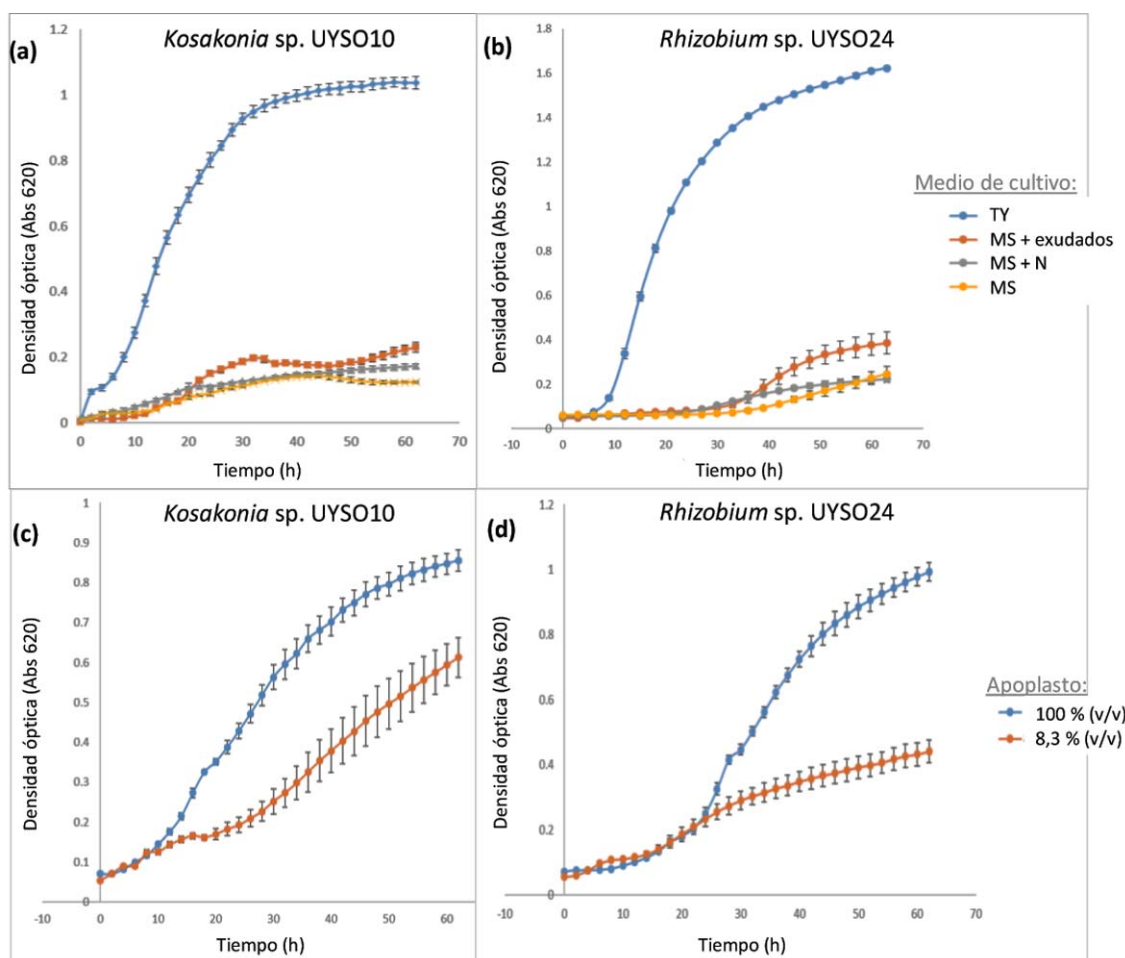
### 2.4.3 Determinación de la capacidad de las cepas UYSO10 y UYSO24 de crecer en diferentes fuentes de C, N y en distintos pH

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

Los resultados mostraron que ambas cepas fueron capaces de crecer tanto en la suspensión de apoplasto pura obtenida a partir de la centrifugación de tallos de cañas de azúcar var. LCP cosechados en campo, así como en la suspensión diluida en medio MS (Figura 19, Tabla 10 y 11). En estas condiciones, la cepa UYSO10

mostró una fase de adaptación menor a la cepa UYSO24 (6-8 h vs 14-16 h) (Figura 19).

Por otra parte, en ambas cepas el crecimiento bacteriano en presencia de exudados radiculares cosechados a partir de plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP, fue lento alcanzando la fase estacionaria con un menor incremento en la biomasa, con poblaciones de  $10^8$  células/ml (Figura 19, Tabla 10 y 11). No obstante, dicho crecimiento fue mejor, en comparación con el medio de cultivo MS suplementado o no con N (Figura 19). Es de destacar que todas las curvas realizadas en medio MS mostraron una fase de adaptación larga, siendo mayores los tiempos de esta fase nuevamente para la cepa UYSO24 (8-12 h vs 28-32 h).



**Figura 19.** Curvas de crecimiento de las cepas UYSO10 (a y c) y UYSO24 (b y d), en los medios de cultivo TY, MS, MS + N y MS + exudados (a y b), apoplasto puro y MS + apoplasto (c y d).

**Tabla 10:** Parámetros de crecimiento de las cepas UYSO10 y UYSO24, en los medios de cultivo TY, MS, MS + N, MS + exudados, apoplasto puro y MS + apoplasto.

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

**Tabla 11.** Capacidad de las cepas UYSO10 y UYSO24 de crecer en diferentes fuentes de C y N.

	UYSO10	UYSO24	Referencia
<b>Fuentes de C</b>			
<i>Azúcares</i>			
Sacarosa (5,100 y 200 g/l)	+	+	(126)
Fructosa	+	+	Este trabajo
Acnr <sup>a</sup> (5,100 y 200 g/l)	+	+	(126)
Glucosa	+	+	(126)
Lactosa	-	-	Este trabajo
Manitol	+	+	(126)
<i>Ácidos orgánicos</i>			
Ácido málico	+	+	(126)
Ácido pirúvico	+	+	Este trabajo
Citrato	+	+	Este trabajo
Cis-aconitato	-	-	Este trabajo
<i>Productos y subproductos de la producción de etanol</i>			
Glicerol comercial	+	+	(126)
Glicerina de ALUR	+	+	Este trabajo
Vinaza	-	-	Este trabajo
Etol	+	-	Este trabajo
<i>Componentes vegetales</i>			
Apoplasto de caña de azúcar <sup>b</sup>	+	+	Este trabajo
CMC	+	+	Este trabajo
Avicel	-	-	Este trabajo
Celobiosa	-	-	Este trabajo
<b>Fuentes de N</b>			
<i>Principales formas inorgánicas de N</i>			
Cloruro de amonio	+	+	(126)
Sulfato de amonio	+	+	(126)
Nitrato de potasio	+	+	(126)
<i>N orgánico: aminoácidos con N</i>			
L-tirosina	+	+	(126)
L-asparagina	+	+	(126)
L-ácido glutámico	+	+	(126)
<i>Otras moléculas orgánicas</i>			
Urea	+	+	Este trabajo
<i>Componente vegetal</i>			
Exudados radiculares	+	+	Este trabajo
Apoplasto de caña de azúcar <sup>b</sup>	+	+	Este trabajo

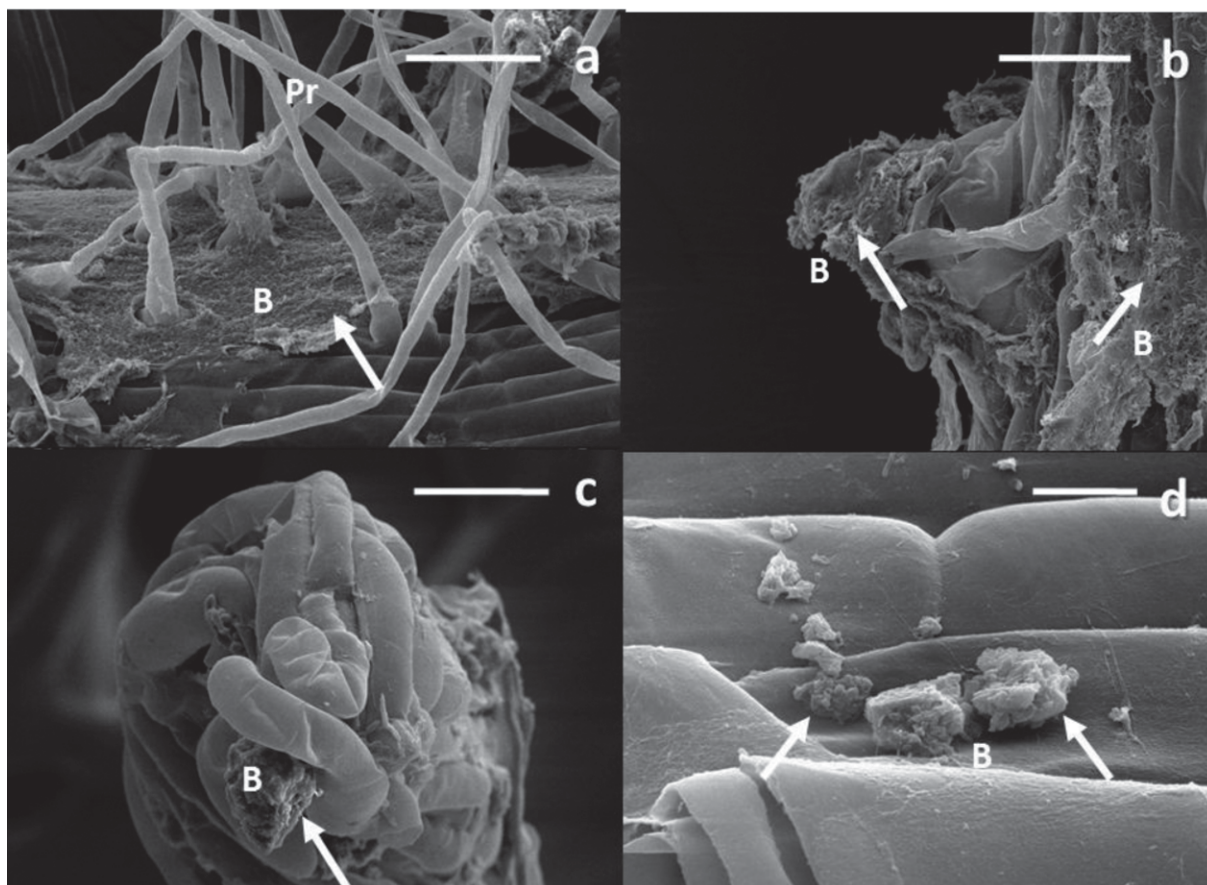
<sup>a</sup>Azúcar de caña no refinada, obtenida en ALUR; <sup>b</sup>El apoplasto fue evaluado como fuente de C y N.

Al evaluarse si las cepas en estudio son capaces de utilizar como fuente de C polímeros vegetales, los resultados confirmaron la capacidad de degradar CMC por ambas cepas. A su vez, se complementó una caracterización previa sobre la capacidad de crecer en distintas fuentes de C y N (126), confirmando ambas cepas poseen una gran versatilidad para el uso de las mismas (Tabla 11). Por último, se observó que ambas cepas pueden crecer en el rango de pH entre 5 y 8.

#### 2.4.4 Localización y cuantificación de las cepas UYSO10 y UYSO24 en los tejidos internos de plantas micropropagadas de caña de azúcar var. LCP

##### 2.4.4.1 Colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24

Mediante MEB se observó a las 4 h pi, escasas células aisladas y pequeños agregados en la cofia de las raíces. A partir de las 12 h pi se observó una profusa colonización sobre las raíces, en forma de agregados, así como formando biopelículas, principalmente en la zona de los pelos radiculares (Figura 20a) y en tejidos meristemáticos en la cofia y en la zona de emergencia de las raíces laterales (Figura 20b, c). Por

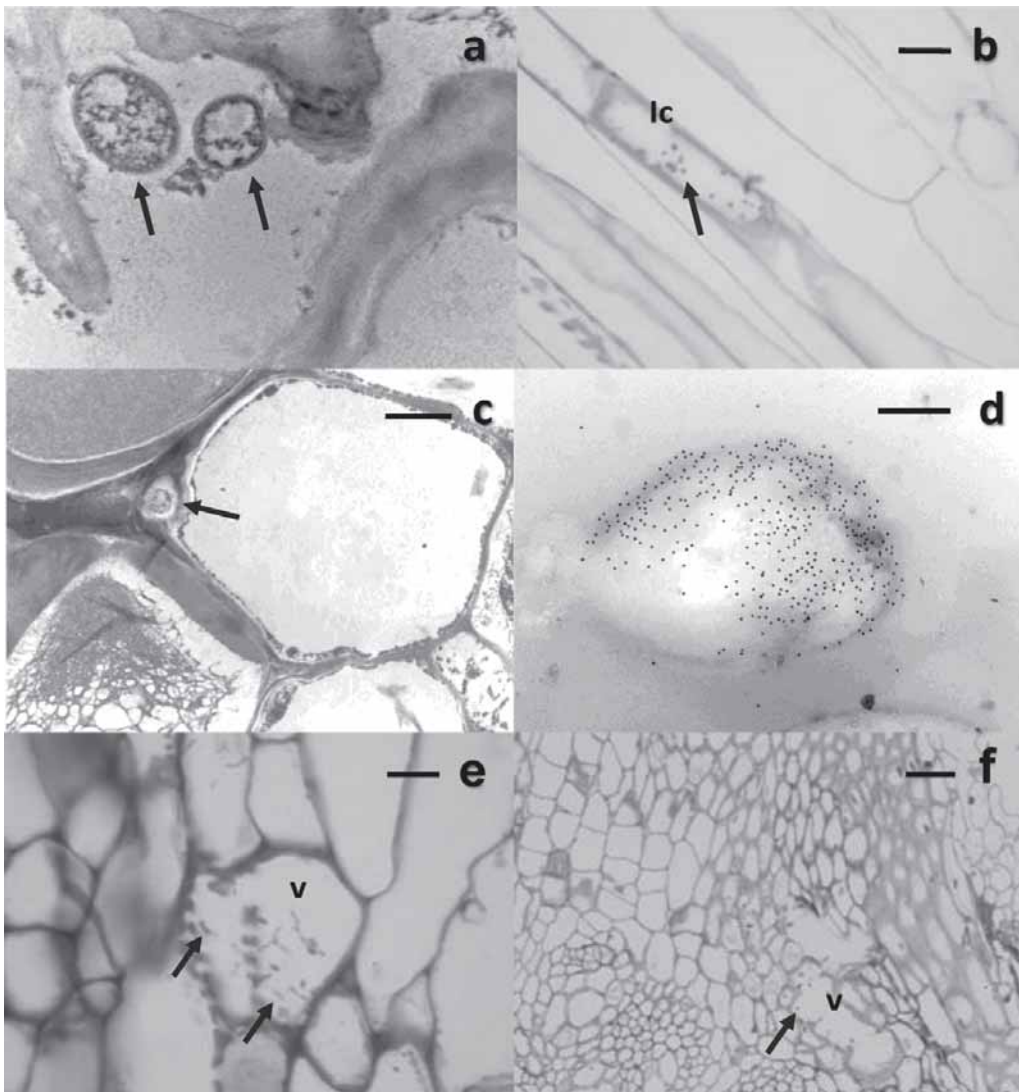


**Figura 20.** Micrografías de MEB mostrando la colonización por la cepa UYSO24, de la superficie de plantas de caña de azúcar micropropagadas a las 24 h pi. **(a)** Biopelícula en forma de capa en la zona de la raíz con pelos radiculares (barra = 50  $\mu$ m). Formación de una biopelícula en la zona de **(b)** emergencia de raíces secundarias (barra = 50  $\mu$ m) y **(c)** en la cofia (barra = 50  $\mu$ m). **(d)** Formación de agregados en la superficie del tejido aéreo a las 12 h pi (barra = 10  $\mu$ m). Las **flechas** blancas indican bacterias. **B-** biopelícula, **Pr-** pelo radicular.

otro lado, la superficie de la base del tallo fue colonizada tempranamente (4 h pi), por células individuales que se adherieron de forma no polar (datos no mostrados). Mientras que a las 12h pi, se observaron bacterias formando pequeñas bio-películas (Figura 20d).

La presencia de *Rhizobium* sp. UYSO24 dentro de los tejidos de la planta fue baja, discreta y raramente observada colonizando los espacios intercelulares (Figura 21a–d). A su vez, la coloni-

zación de los vasos de xilema fue detectada a partir de las 12 h pi, principalmente en el tallo, y por células individuales o pequeños agregados (Figura 21e,f). Por otro lado, no se observaron bacterias en la superficie de los estomas y cavidades subestomáticas. Asimismo, si bien se observó una reacción de la planta entre los espacios intercelulares en el córtex de la raíz y en algunos tejidos vasculares, la misma no necesariamente se encuentra asociada a la presencia bacteriana.



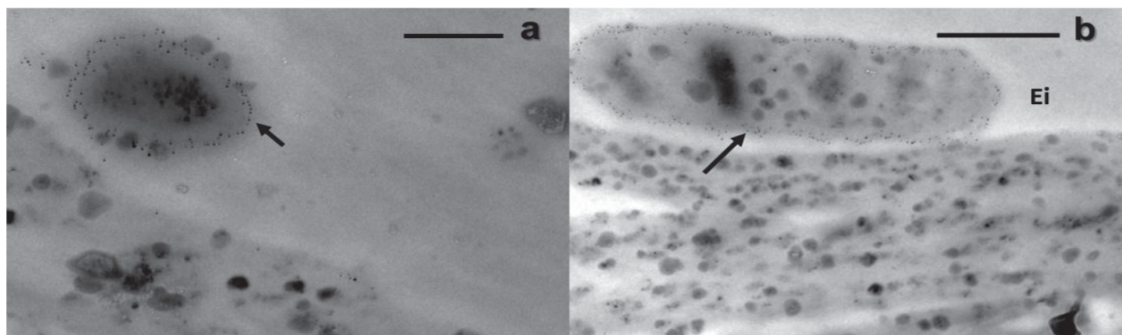
**Figura 21.** Micrografías de MO y MET de secciones transversales de tejido aéreo mostrando la colonización interna de los tejidos de cañas de azúcar micropropagadas por la cepa UYSO24. a, b y c- colonización de los espacios intercelulares del tallo a las 12 h pi (a) (barra = 1  $\mu$ m), 24 h pi (b) (barra = 10  $\mu$ m) y 48 h pi (c) (barra = 2  $\mu$ m). (d) célula en el espacio intercelular del tallo que se encuentra inmunomarcada con el antisuero contra *Rhizobium* sp. UYSO24 (barra = 500 nm). (e,f) colonización del tejido vascular del tallo a las 12 h pi (e) (barra = 10  $\mu$ m) y 48 h pi (f) (barra = 25  $\mu$ m). Las bacterias son indicadas con flechas negras. lc- espacio intercelular. v- tejido vascular.



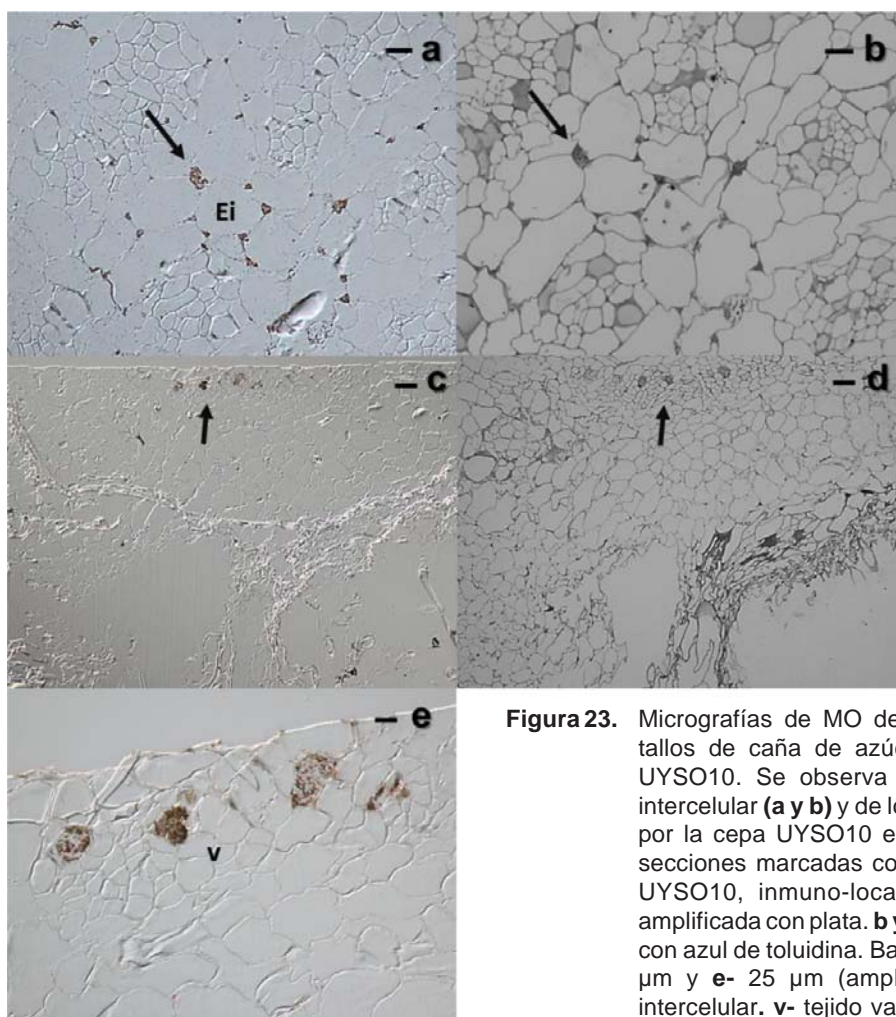
#### 2.4.4.2 Colonización de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO10

Previamente, se describió el proceso de colonización e infección de los tejidos internos de plantas de caña de azúcar en el tiempo por la cepa

UYSO10 (72, 107). En el presente trabajo se corroboró la presencia de la cepa UYSO10 dentro de los tejidos de la planta, empleando el antisuero específico producido y purificado para dicha cepa (Figura 22 y 23).



**Figura 22.** Micrográficas de MET de secciones transversales de tallos de caña de azúcar mostrando bacterias marcadas por inmuno-localización con oro, utilizando el antisuero contra la cepa UYSO10. Se observa la colonización del espacio intercelular a las (a) 24 h pi (barra = 100 nm) y (b) 48 h pi (barra = 200 nm). Las flechas negras señalan las partículas de oro asociadas al anticuerpo secundario. Ei- espacio intercelular.



**Figura 23.** Micrográficas de MO de secciones transversales de tallos de caña de azúcar colonizadas por la cepa UYSO10. Se observa la colonización del espacio intercelular (a y b) y de los haces vasculares (c, d y e), por la cepa UYSO10 en la base del tallo. a, c y e- secciones marcadas con el antisuero contra la cepa UYSO10, inmunolocalizadas con oro y la señal amplificada con plata. b y d- mismas secciones teñidas con azul de toluidina. Barras: a y b = 30 µm, c y d = 40 µm y e- 25 µm (amplificación de c). Ei- espacio intercelular. v- tejido vascular.

### 2.4.5 Puesta a punto de la detección de las cepas en estudio por PCR cuantitativa

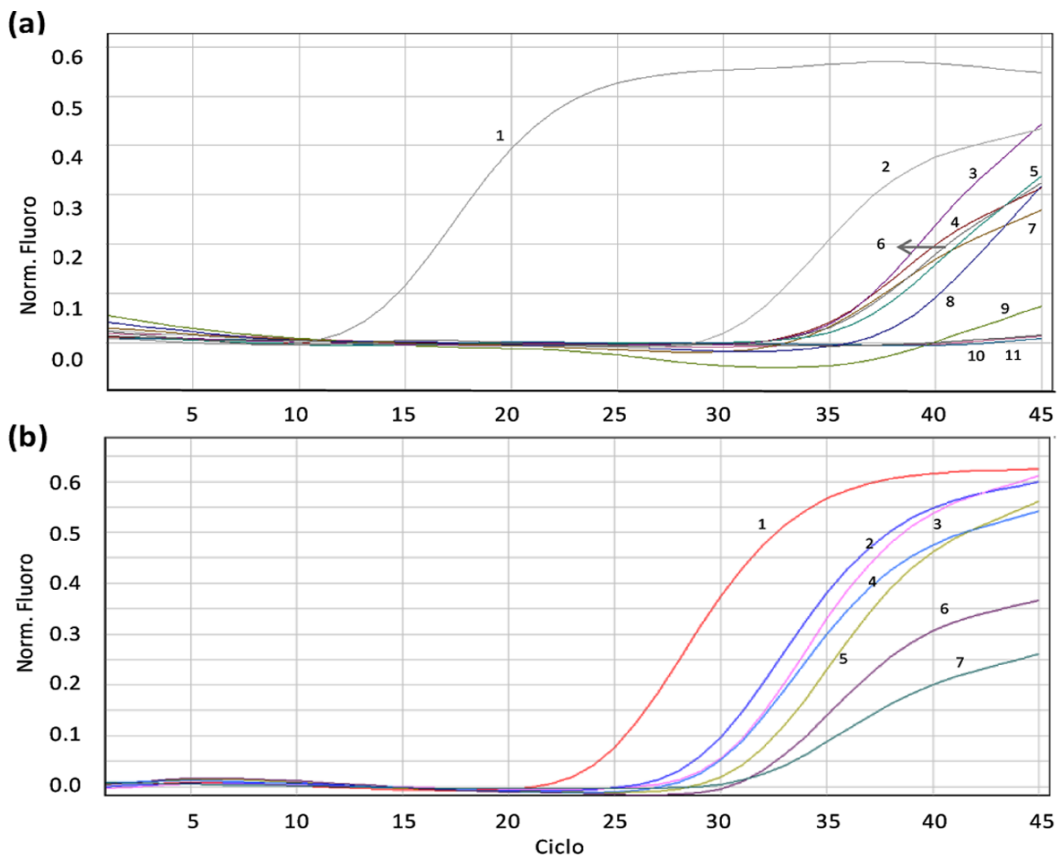
Los resultados confirmaron la especificidad de los cebadores *in vivo* utilizando como molde cepas cercanas filogenéticamente, así como cepas aisladas de plantas de caña de azúcar de colecciones del laboratorio (Figura 24). Si bien la mayoría de las cepas evaluadas mostraron amplificación (aumento de la fluorescencia), dicha amplificación se realizó en ciclos tardíos en comparación con la cepa específica.

En relación con la eficiencia de la PCR, para los cebadores de la cepa UYSO10, la más baja obtenida fue de 90,2 %, mientras que para los

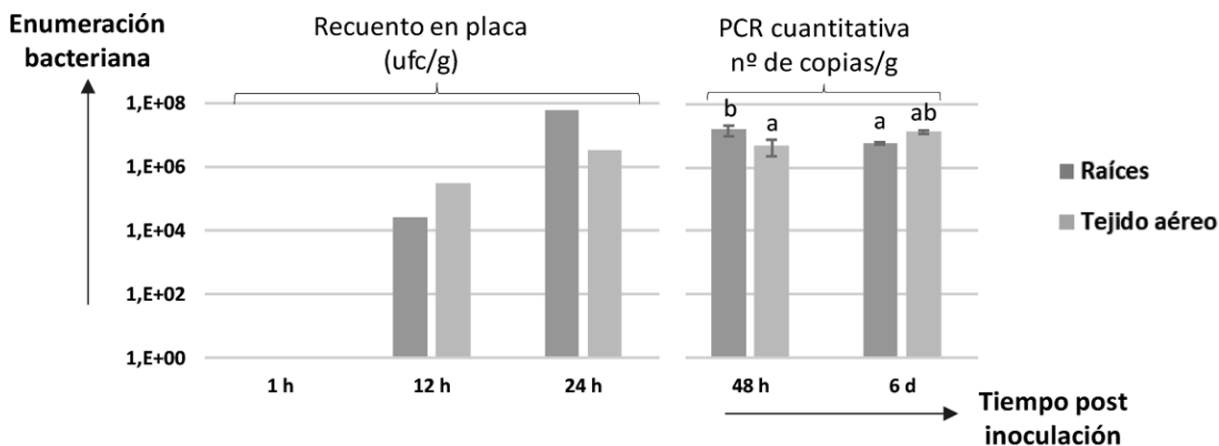
cebadores de la cepa UYSO24, la misma fue de 91,2; con valores de  $r^2$  de 0,993 y 0,997 y pendientes de  $-3,581$  y  $-3,553$  respectivamente.

### 2.4.6 Cuantificación de la colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO24

El recuento de la cepa UYSO24 en los tejidos internos de la planta se realizó de manera secuencial mediante recuento en placa (1, 12 y 24 h pi), y mediante PCR cuantitativa (48 h y 6 días pi). Los resultados detectaron la presencia de la cepa en estudio a partir de 12 h pi en la raíz. A partir de ese momento la población endófitica de la raíz fue aumentando hasta alcanzar un máximo



**Figura 24.** Análisis de la especificidad *in vivo* de los cebadores utilizados para las cepas UYSO10 y UYSO24, en los experimentos PCR cuantitativa. **(a)** Corrida de PCR utilizando los **cebadores específicos para UYSO10**: 1- *Kosakonia* sp. UYSO10, 2- *Acinetobacter* sp. UYSO03, 3- *Enterobacter* sp. UYSO09, 4- *Enterobacter* sp. UYSO08, 5- *Pantoea* sp. UYSO13, 6- *Rhizobium* sp. UYSO24, 7- *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, 8- *Pseudomonas* sp. UYSO21, 9- *Agrobacterium* sp. UYSO04, 10- *Pseudomonas* sp. UYSO01 y 11- control sin ADN. **(b)** Corrida de PCR utilizando los **cebadores específicos para UYSO24**: 1- *Rhizobium* sp. UYSO24, 2- *Pantoea* sp. UYSO13, 3- *Pseudomonas* sp. UYSO01, 4- *Kosakonia* sp. UYSO10, 5- *Xanthomonas* sp. UYSO35, 6- *Agrobacterium* sp. UYSO04 y 7- control sin ADN.

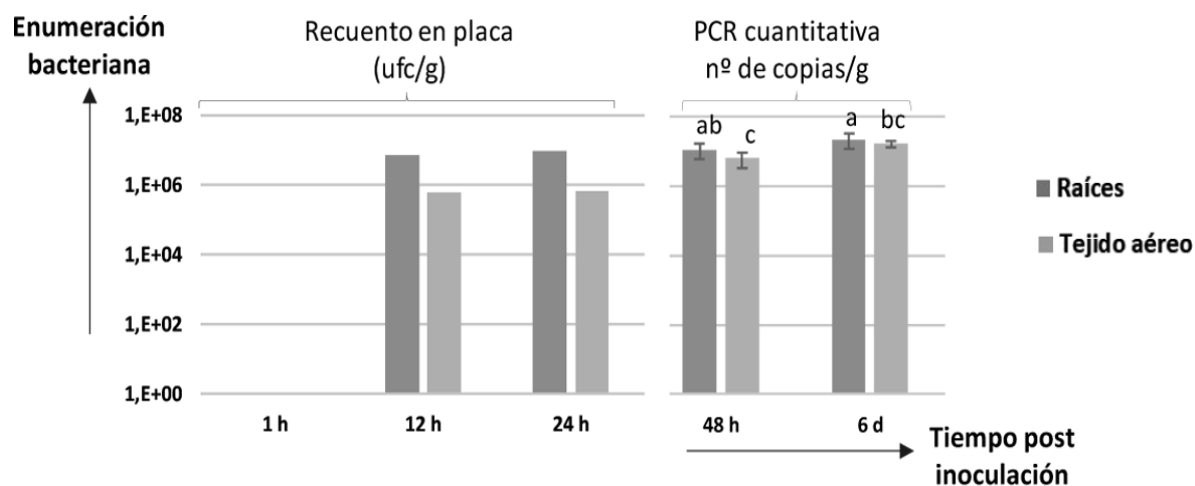


**Figura 25.** Cuantificación de la población endofítica de la cepa UYSO24 en raíces y tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas.

de  $10^7$  ufc/g de tejido fresco a las 24 h pi y disminuyó a los 6 d pi hasta una población de  $10^6$  ufc/g de tejido fresco (Figura 25). Por otro lado, la población endofítica en el tejido aéreo fue detectada también a partir de las 12 h pi, observándose a continuación un incremento de la población alcanzando un máximo de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g a las 24 h pi. A los 6 días pi, la población aérea se mantuvo (Figura 25). Posteriormente, se verificaron los resultados inicialmente obtenidos utilizando el tamaño del genoma de una cepa filogenéticamente cercana, con el tamaño del genoma de la cepa UYSO24 (Beracochea en preparación).

#### 2.4.7 Cuantificación de la colonización de plantas de cañas de azúcar var. LCP por la cepa UYSO10

Asimismo, se realizó también la cuantificación de la cepa UYSO10 en los tejidos internos de la planta de manera secuencial, mediante recuento en placa (1, 12 y 24 h pi) y mediante PCR cuantitativa (48 h y 6 días pi). En este caso, la población en las raíces fue del orden de  $10^6$  ufc/g de tejido fresco a las 12 h y se mantuvo a partir de las 24 h en  $10^7$  ufc/g o nº de copias/g de tejido fresco (Figura 26). En el tejido aéreo se detectaron a las 12 h pi poblaciones de  $10^5$  ufc/g de tejido fresco, alcanzando a partir de las 48 h pi poblacio-



**Figura 26.** Cuantificación de la población endofítica de la cepa UYSO10 en raíces y tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas.

nes de  $10^6$ - $10^7$  n° de copias/g de tejido fresco (Figura 24). Posteriormente, utilizando el tamaño del genoma de la cepa UYSO10 (Beracochea en preparación), se verificaron los resultados obtenidos.

#### 2.4.6 Tratamientos control y referencia

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

Por otro lado, solamente en los estudios de colonización de la superficie de cañas de azúcar, se emplearon como referencia dos tratamientos: 1- cañas de azúcar inoculadas con la cepa modelo endófito y PCV de caña de azúcar: *G. diazotrophicus* Pal5 y 2: cañas de azúcar inoculadas con la cepa no PCV, aislada de caña de azúcar: *Pseudomonas* sp. UYSO14. En ambos casos se evaluó solamente la colonización a las 24 h pi. En el caso de la cepa *G. diazotrophicus* Pal5, se observó la colonización de la cofia por células individuales y pequeños agregados (Figura 27a). Por otro lado, para el caso de la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO14, se observó la presencia de células individuales en la superficie de

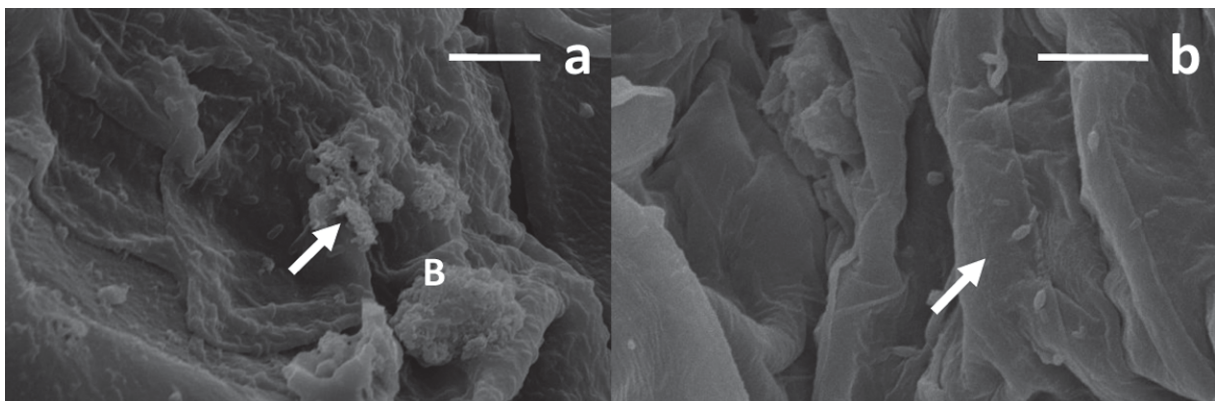
la zona de los pelos radiculares de la raíz y en el tejido aéreo (Figura 27b).

## 2.5 DISCUSIÓN

Las cepas UYSO10 y UYSO24 presentan características que probablemente inciden en la colonización e infección radicular

Las bacterias endófitas, son bacterias del suelo que colonizan el rizoplano (epifíticas) y posteriormente los tejidos de la planta, o eventualmente son aquellas que se encuentran presentes en el material de propagación de la planta. La interacción con la planta constituye un proceso dinámico, que comienza con un reconocimiento inicial de señales moleculares, seguido del movimiento de la bacteria en dirección a la planta hospedera, su adhesión a la superficie vegetal y posterior penetración y multiplicación dentro del huésped (66). Por lo tanto, una colonización endofítica exitosa involucra a su vez, un huésped compatible.

Las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 fueron aisladas de variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay y descritas como promotoras del crecimiento vegetal las mismas (72, 107). Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la interacción entre las cepas endófitas UYSO10 y UYSO24 con plantas de caña de azúcar, ambas cepas fueron



**Figura 27.** Micrografía mediante MEB mostrando la colonización de la superficie de raíces de cañas de azúcar micropropagadas por las cepas utilizadas como referencia a las 24 h pi. **(a)** *G. diazotrophicus* Pal5 colonizando la punta de la raíz (barra = 5 µm). **(b)** *Pseudomonas* sp. UYSO14 colonizando con células individuales el tejido aéreo de plantas de caña de azúcar (barra = 10 µm). Las **flechas** blancas indican las bacterias. **B**-biopelículas.

caracterizadas *in vitro* buscando características asociadas a la interacción con la planta e *in vivo*, en interacción con la misma. A continuación, la discusión se organizó considerando secuencialmente los pasos de la colonización, desde la colonización de la superficie a la interna.

### 2.5.1 Atracción y movimiento hacia la rizósfera

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

Con posterioridad a la realización de estos análisis, se contó como insumo en el laboratorio con los genomas de ambas cepas en estudio. Análisis bioinformáticos preliminares de dichos genomas permitieron determinar la presencia de los genes estructurales del flagelo, así como los genes asociados al motor y al movimiento por quimiotaxis (Beracochea en preparación).

Particularmente la cepa UYSO10 mostró también la capacidad de realizar *twitching*. Este tipo de movimiento es descrito como un movimiento intermitente de sacudidas cortas, dependiente de la retracción del pili, e independiente de flagelo (130). En este sentido se identificaron en el genoma de la cepa UYSO10 los genes de biosíntesis del pili tipo IV, así como el gen *pilT* asociado a la retracción del pili y al movimiento tipo *twitching* (Beracochea en preparación). Este tipo de estructura es importante en la interacción planta-endófito, en ese sentido, análisis en cepas de *Azoarcus* sp. BH72 mutantes en el pili tipo IV, mostraron que dicho pili es necesario para la formación de colonias en la superficie de la raíz, así como en la invasión de los tejidos internos de las raíces (51, 132).

Como se mencionó, uno de los mecanismos asociado a la capacidad de las bacterias de moverse, es el de quimiotaxis. En ese sentido, ambas bacterias mostraron ser capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de C y N, característica importante en el proceso de colonización rizosférico el cual es un ambiente rico en exudados radiculares. En este estudio no se realizaron ensayos de quimiotaxis con compuestos particulares presentes en los exudados de raíces de caña, ya que se desconoce la composición de los mismos. Sin embargo, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en medio de cultivo de planta MS, suplementados con exudados de caña de azúcar, como fuente de N y posiblemente C, mediante curvas de crecimiento. Los resultados mostraron la presencia de una larga fase de adaptación en todas las condiciones evaluadas; así como un leve incremento de la población bacteriana al final del experimento, en el tratamiento en el cual las cepas se crecieron en presencia de exudados. Estos resultados sugieren que: 1) las poblaciones de ambas cepas se encuentran estresadas en el medio de cultivo evaluado (MS 1/10 sin N), y 2) la presencia de exudados no logra superar del todo la condición de estrés observada. Sin embargo, en esta observación pueden estar influyendo otros factores como (i) la relación inóculo bacteriano/exudados radiculares y (ii) los niveles de estrés de la planta asociados a estar creciendo en un medio de cultivo diluido, pudiendo de esta forma afectar la composición y abundancia de los exudados. Es importante destacar que el medio MS sin fuente de N y diluido se encuentra ampliamente reportado (124, 133) y es el usado en esta tesis en los experimentos de interacción planta-bacteria *in vitro*. Dicha modificación del medio de cultivo original busca promover la interacción planta-bacteria (124).

### 2.5.2 Colonización de la rizósfera

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

sensing (47, 66). En nuestro caso, los resultados mostraron que la cepa UYSO24 forma biopelículas en ensayos *in vitro* y también en ensayos de interacción con plantas de caña de azúcar (*in vivo*). Mediante análisis bioinformáticos fue posible identificar en el genoma de la cepa UYSO24 los genes: «*Biofilm regulator*» BssR, BssS y «*Protein YjgK, linked to biofilm formation*», así como el operón *exo* responsable de la síntesis de exopolisacáridos, los cuales son componentes importantes de las biopelículas (Beracochea en preparación).

Por otro lado, si bien se observó que la cepa UYSO10 coloniza la superficie de raíces de caña de azúcar en forma de biopelículas (113), no se observó la formación de biopelículas en los ensayos realizados *in vitro* en placa de ELISA, bajo las condiciones ensayadas.

### 2.5.3. Ingreso y colonización de los tejidos de las plantas

Colonizada la superficie de las raíces, las bacterias endófitas pueden ingresar y colonizar los tejidos internos de la planta. Diversas características bacterianas han sido reportadas como involucradas en este proceso incluyendo: el movimiento tipo *twitching*, la presencia de enzimas degradadoras de la pared celular (extracelulares), así como enzimas asociadas a mecanismos de detoxificación (42, 66). Las enzimas degradadoras de la pared celular juegan un rol clave en las interacciones planta-patógeno y leguminosarizobio, así como en el biocontrol de patógenos (60, 134). En las cepas en estudio, se detectó actividad endoglucanasas y particularmente en el caso de la cepa UYSO24 también lacasas. Esto fue confirmado mediante búsquedas bioinformáticas en donde se detectaron en ambas cepas genes que codifican para este tipo de celulasas. Sería muy interesante profundizar en el estudio de su rol en la interacción planta-bacteria ya que podrían estar involucradas en una colonización activa de las plantas como en la apertura de los espacios entre las células de los tejidos internos. Por ejemplo, en la cepa *Azoarcus* sp. BH72, se ha reportado que la endoglucanasa EglA es clave para infectar las raíces de planta de arroz (135). Este tipo de enzimas ha sido reportada en diversas bacterias endófitas o asociadas a plantas,

incluyendo *Herbaspirillum* spp. donde se desconoce su rol en la interacción (136).

Como respuesta de defensa general frente a la colonización bacteriana, las plantas producen especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*). Esto ha sido reportado en diferentes tipos de interacciones planta-bacteria incluyendo endófitos (137). Para detoxificar estas moléculas, las bacterias producen enzimas antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa. En ambas cepas en estudio se detectaron *in vitro* la presencia de ambas actividades enzimáticas, así como las secuencias codificantes para este tipo de enzimas en sus genomas.

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

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

### 2.5.4 La cepa UYSO24 es un endófito verdadero

La colonización de la superficie radicular por la cepa UYSO24 fue similar a lo descrito para otras bacterias endófitas (10, 12, 136). En particular, la cepa UYSO24 mostró como principales sitios de colonización radicular los tejidos meristemáticos ubicados en los sitios de emergencia de las raíces laterales y en la cofia, así como la zona de los pelos radiculares de las raíces. Una característica muy relevante es que esta cepa, a diferencia de la cepa UYSO10, colonizó las raíces formando grandes extensiones de biopelículas laminares.

Por otro lado, mediante microscopía y empleando anticuerpos específicos, se pudo determinar que la cepa UYSO24 coloniza los tejidos internos de las plantas, por lo tanto, se la definió como un «endófito verdadero».

Por otra parte, a diferencia de la cepa UYSO10, la colonización de los tejidos internos por la cepa UYSO24 fue baja y discreta, observándose que la ruta de infección involucra la colonización de los espacios intercelulares y posteriormente el tejido vascular por células individuales o por pequeños agregados. Sin embargo, en contraposición con estas observaciones, la cuantificación de la población endófitica sugiere una gran colonización de los tejidos internos por parte de esta cepa. Una posible explicación para estas observaciones contradictorias proviene de la naturaleza de la interacción endófitica. En este sentido, dado que las bacterias no se encuentran uniformemente distribuidas en los tejidos, por más que se haga un gran esfuerzo de muestreo en observar numerosos cortes por microscopía, es difícil encontrar

bacterias aún con altas densidades poblacionales. De la misma forma, si consideramos a la cepa UYSO24 como un colonizador de la superficie de la raíz, la mayoría de las micrografías muestran poblaciones variables en tamaño, desde micrografías donde no se detectaron bacterias a micrografías con presencia de grandes agregados. Estas características peculiares podrían explicar esta paradoja.

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

Finalmente, con relación a la colonización de plantas de caña de azúcar var. LCP por las cepas usadas como referencia, se observó que *G. diazotrophicus* Pal5 colonizó la superficie radicular de forma similar a la reportada en otros cultivos (83, 100, 124, 144), pero en menor cantidad. Probablemente este fenómeno se deba a que la var. LCP no se asocia específicamente a esta cepa. Por otro lado, a diferencia de las cepas Pal5, UYSO10 y UYSO24, la cepa *Pseudomonas* sp. UYSO14 colonizó la superficie de las raíces de plantas de caña de azúcar como células simples, sin formar agregados ni biopelículas. Esta baja colonización de la superficie puede estar asociada a la disminución en su capacidad de formar biopelículas en presencia de exudados (datos no mostrados), así como a la incapacidad de promover el crecimiento de las plantas de caña de azúcar (72).

# PARTE 3:

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

### 3.1 HIPÓTESIS

Las cepas UYSO10 y UYSO24 modulan su proteoma frente a la presencia de exudados radiculares con la finalidad de transportar y metabolizar componentes del mismo e iniciar el proceso de interacción con la planta huésped.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir la respuesta de las cepas UYSO10 y UYSO24 a la presencia de exudados radiculares de plantas de caña de azúcar, mediante una aproximación proteómica.

### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

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

#### 3.3.1 Cepas bacterianas y plantas

En este estudio se utilizaron las cepas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24; así como plantas micropropagadas de caña de azúcar de la var. LCP (Tabla 8 Parte II).

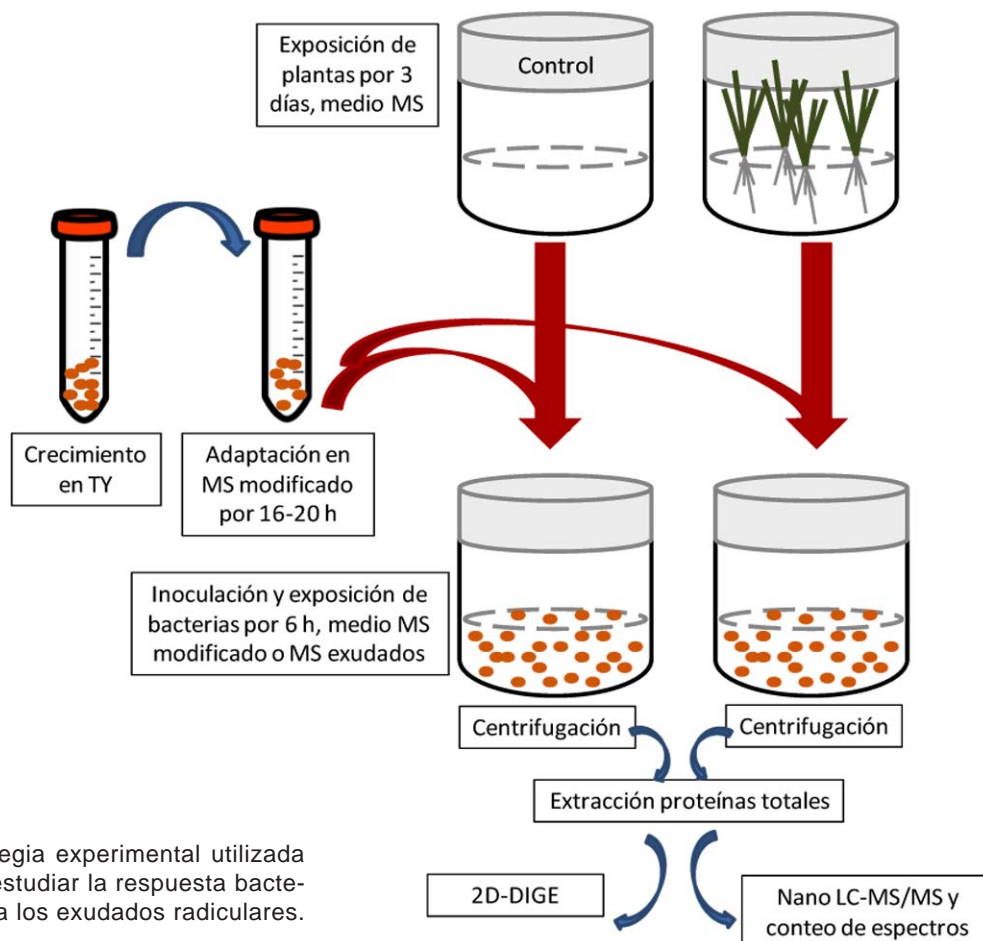
#### 3.3.2 Ensayo biológico

En la Parte II de este trabajo se demostró que ambas cepas bacterianas en estudio fueron incapaces de crecer en medio de cultivo MS 1/10 sin N, pero si en el medio con exudados radiculares. Por dicho motivo, para evaluar el efecto de los exudados radiculares sobre las cepas, se decidió realizar un ensayo de exposición a los mismos (Figura 28).

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

Por otro lado, y en paralelo, se cultivaron plantas de caña de azúcar micropropagadas en frascos conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS 1/10 sin N durante 3-4 días momento en el cual fueron retiradas (107, 124). De esta manera se obtuvo medio MS 1/10 sin N conteniendo los exudados radiculares.





**Figura 28.** Estrategia experimental utilizada para estudiar la respuesta bacteriana a los exudados radiculares.

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

### 3.3.3 Extracción de proteínas totales bacterianas

Las proteínas totales se extrajeron por suspensión del pellet obtenido en el punto 1. 2 en buffer de extracción (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % (p/v) y *dithiothreitol* (DTT) 10 mM), con agitación durante 30 min a 4 °C. A continua-

ción, las células fueron sonicadas 3 veces durante 15 s y agitadas nuevamente durante 30 min a 4 °C. Finalmente, con el fin de remover cualquier impureza, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 g durante 20 min a 4 °C, guardándose el sobrenadante.

### 3.3.4 Cuantificación y visualización de los extractos proteicos

La concentración proteica se cuantificó utilizando el método de Bradford (145). Para esto a 1-2  $\mu$ l de cada muestra se le adicionó 200  $\mu$ l de reactivo Bradford (Anexo A), midiéndose la absorbancia a 595 nm ( $Abs_{595nm}$ ). La cuantificación de proteínas se calculó en base a una curva de calibración preparada con diluciones seriadas de una solución patrón de seroalbúmina bovina (BSA) (0-10  $\mu$ g/ $\mu$ l).

La calidad de las muestras obtenidas se evaluó por SDS-PAGE en un gel de acrilamida 12 %. Previo a sembrar las muestras en el gel, a 20 µg de cada muestra, se le agregó *buffer* de la muestra 1 X (Tris 0,25 M, SDS 8 % (p/v), glicerol 40 % (v/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v), β-mercaptoetanol 1 % (v/v)) y se calentaron durante 10 min a 95-100 °C. La corrida electroforética se realizó a 85 V. Al finalizar la electroforesis, los geles se fijaron con etanol:ácido acético:agua en una relación (5:1:4), durante 30 min y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie G-250 en etanol (sulfato de amonio 8 %, ácido fosfórico 0,8 %, Azul de Coomassie G-250 0,08 %, etanol 20 %), durante toda la noche. El exceso de colorante se eliminó con sucesivos lavados con agua destilada.

### 3.3.5 Análisis proteómico por DIGE

La técnica de DIGE permite comparar al menos 2 condiciones biológicas de forma cuantitativa (Figura 29) (146, 147). Brevemente, la misma implica el marcado de las proteínas de las condiciones a comparar con dos fluoróforos distintos. Las muestras marcadas se analizan juntamente con un estándar interno, *pool* formado por la misma cantidad de cada una de las muestras a

analizar, marcado con un tercer fluoróforo. Posteriormente, todas las muestras se corren juntas en un mismo gel 2D SDS-PAGE y finalizada la corrida, se adquieren las imágenes a analizar, con un scanner de fluorescencia. Utilizando un software específico se comparan las imágenes adquiridas, identificándose aquellas proteínas con diferencias estadísticas en su abundancia entre los tratamientos. Finalmente, las proteínas de interés son escindidas del gel e identificadas por espectrometría de masas.

### 3.3.6 Preparación de la muestra para DIGE

A las muestras proteicas obtenidas en el punto 1.3 se les realizó un procedimiento de limpieza. Para esto, a 200 µg de proteínas de cada muestra se le adicionaron 300 µl de ácido tricloroacético 10 % (v/v), incubándose con agitación durante 15 min en hielo. Posteriormente se les adicionaron 300 µl de deoxicolato 0,2 % (p/v), centrifugándose a 15.000g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue descartado con cuidado, mientras que el pellet fue suspendido en 40 µl de deoxicolato 0,2 % (p/v) e incubado nuevamente durante 5 min en hielo. A continuación, las muestras fueron centrifuga-

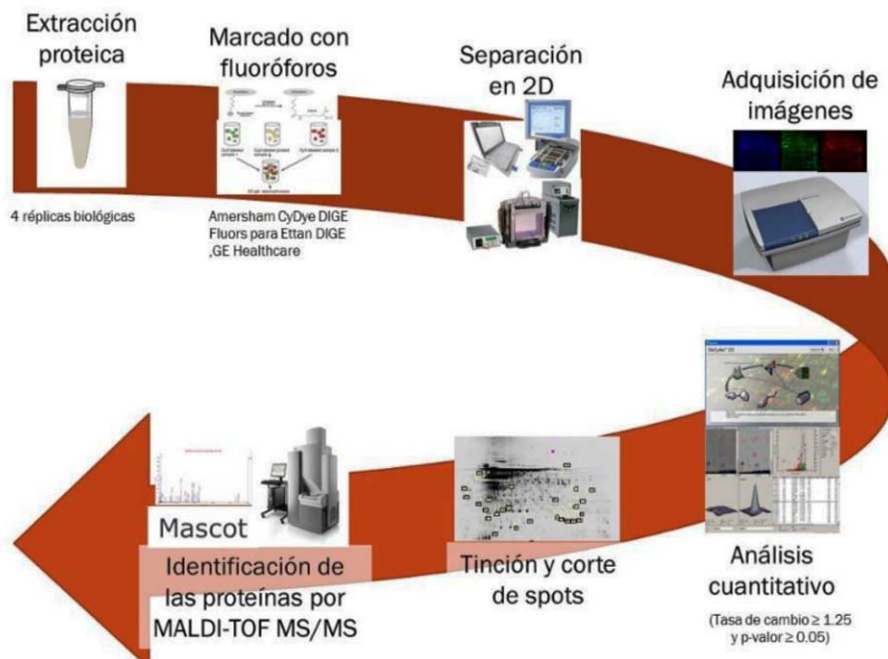


Figura 29. Estrategia general de la técnica de DIGE seguida en este estudio.

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

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

### 3.3.7 Evaluación de la compatibilidad muestra-fluoróforos

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

### 3.3.8 Marcado de las muestras

A partir de cada una de las réplicas biológicas, se marcaron 50 µg de proteínas con 400 pmoles de los fluoróforos Cy3 y Cy5, de forma que cada tratamiento tuviera 2 réplicas biológicas marcadas con cada fluoróforo (Tablas 12 y 13). En paralelo se preparó el estándar interno que incluyó 25 µg de cada muestra (de cada réplica y de cada tratamiento), la cual fue marcada con el fluoróforo Cy2. La reacción de marcado se realizó en la oscuridad durante 30 min en hielo, deteniéndose mediante la incubación con lisina 10 mM. Una vez marcadas todas las réplicas y el estándar interno, las mismas se agruparon según el diseño mostrado (Tablas 12 y 13).

**Tabla 12.** Diseño experimental del marcado de las muestras para DIGE, cepa UYSO10.

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

**Tabla 13.** Diseño experimental del marcado de las muestras para DIGE, cepa UYSO24.

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

### 3.3.9 Análisis de las muestras por 2D SDS-PAGE

Geles de una dimensión (tiras) de 24 cm de largo con un rango de pH 3-10NL (Immobiline Drystrip GE Healthcare), fueron hidratados en un IPGbox (GE Healthcare), utilizando buffer de hidratación [urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 2% (p/v), DTT 10mM e IPG-buffer (GE Healthcare) 1,2% (v/v)], según recomendación del fabricante. En el buffer de hidratación se incluyeron las muestras marcadas y agrupadas, las cuales se incorporaron pasivamente a las tiras (Tabla 12 y 13). Al día siguiente se realizó la corrida de la primera dimensión en el equipo IPGphor III (GE Healthcare). El perfil de voltaje empleado fue: 1) una fase constante de 500 V durante 1 h, 2) un incremento lineal hasta 1.000 V a una velocidad de 800 V/h, 3) un incremento hasta 10.000 V a una velocidad de 16.500 V/h, y 4) una fase final constante de 10.000 V hasta alcanzar un total en la corrida de 52.500 V transferidos a cada tira. Una vez finalizada la corrida, los puentes disulfuros se redujeron por incubación de las tiras en 15 ml de buffer de equilibrio (urea 6 M, SDS 2% (p/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,6), suplementado con DTT 1% (p/v), durante 15 min. Posteriormente se alquilaron las cisteínas incubándose las tiras en 15 ml buffer de equilibrio, suplementado con iodoacetamida 4,7 % (p/v), durante 15 min. La reacción se inactivó por inmersión de la tira en buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %).

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

#### 3.3.10 Obtención y análisis de las imágenes

Luego de la electroforesis, los geles fueron escaneados utilizando un escáner Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare), con el software ImageQuant TL v8.1 (GE Healthcare). Posteriormente las imágenes obtenidas se exportaron al progra-

ma DeCyder 2D Differential Analysis Software 7.2 (GE Healthcare) para su análisis. A continuación, todos los *spots* de cada gel por separado fueron detectados y cuantificados, normalizándose con el estándar interno (módulo *Difference In gel Analysis*). Luego se realizó el pareamiento de los geles comparándose la expresión de cada *spot* entre los geles (módulo *Biological Variation Analysis*). Finalmente, se seleccionaron para su identificación aquellos *spots* que presentaron una tasa de cambio mayor a 1,5 y que fueran significativos al aplicar la prueba de *Student* con un *p*-valor de 0,05.

#### 3.3.11 Análisis de los spots de interés por espectrometría de masas

Luego de escanear los geles, los mismos fueron fijados y teñidos con azul de Coomassie G-250 como se describió en el punto 3.3.4. Debido a que no se obtuvo una imagen definida de todos los *spots*, y a la imposibilidad de relacionarlos con la imagen obtenida con la técnica de DIGE, se decidió realizar geles preparativos para escindir los *spots* de interés. Para ello, se realizaron nuevas corridas en geles de 2D SDS-PAGE utilizando en este caso 500 µg de proteína por gel. A continuación, los *spots* reconocidos como diferenciales fueron ubicados en el gel y escindidos utilizando un bisturí estéril en cámara de flujo laminar.

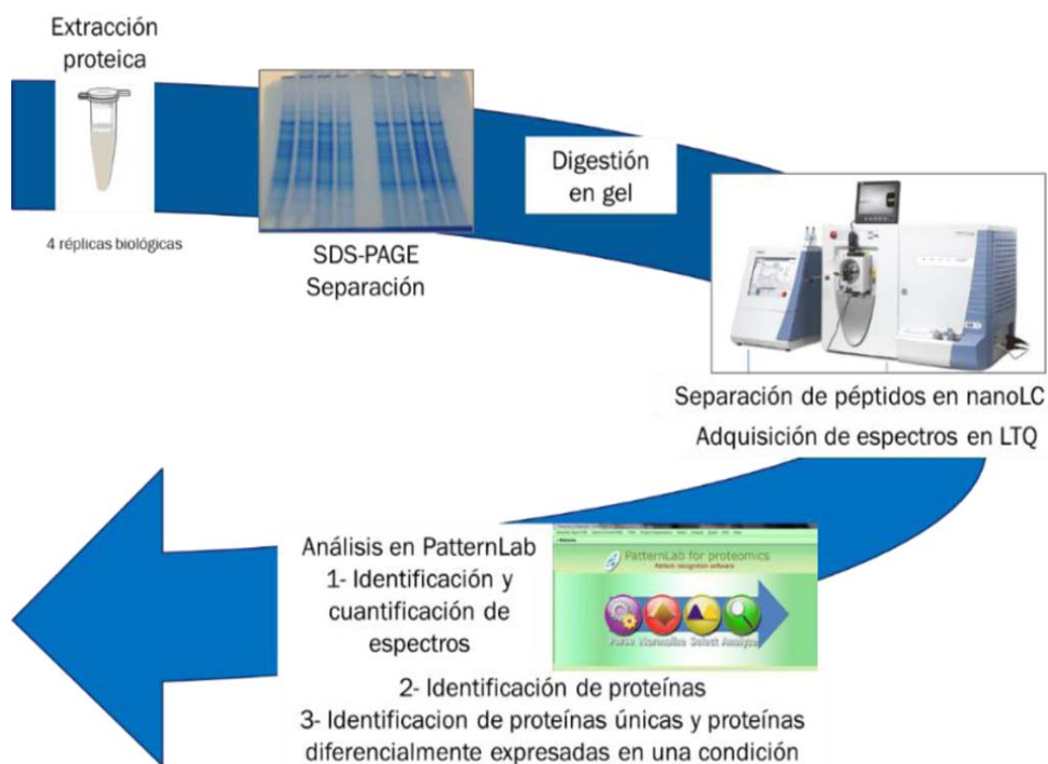
Los *spots* fueron procesados y analizados por espectrometría de masas en un equipo MALDI-TOF/TOF, en la Unidad Mixta de Bioquímica y Proteómica Analíticas, del IPMont-IIBCE. Los espectros obtenidos fueron comparados, utilizando el servidor de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), con la base de datos de los genomas de las cepas ensayadas (Beracocha 2018, en preparación). Para ello, los proteomas de la cepa UYSO10 y de UYSO24 se descargaron del programa *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/>). Los parámetros de búsqueda en el Mascot fueron: i) con los proteomas de las cepas UYSO10 y UYSO24; ii) saltos de cortes de tripsina permitidos:1; iii) modificaciones variable: oxidación de metionina y modificación fija: carbamidometilación de cisteínas; iv) tolerancia de masa de péptidos: 0,08 Da y tolerancia MS/MS:

0,3-0,5 Da. Los valores de  $m/z$  utilizados corresponden a los valores monoisotópicos. Se consideró positiva la identificación de una proteína cuando el *Mascot protein score* fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y al menos una fragmentación fue asignada con un *Mascot peptide ion score* significativo ( $p < 0,05$ ).

Las proteínas identificadas fueron clasificadas según los grupos funcionales de la *Clusters of Orthologous Groups (COGs)*, utilizando la base de datos de EggNOG 4.5.1 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>) (148); y según su ubicación subcelular, utilizando los servidores PSORTb 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>) (149) y Cello v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (150). Con la finalidad de descifrar el rol biológico de las proteínas identificadas como hipotéticas, se evaluó la homología de las secuencias, así como la presencia de dominios y sus funciones, empleando las herramientas y páginas: RAST, Psi-Blast del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (151), InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (152) y UniProt (<http://www.uniprot.org/>) (153).

### 3.3.12 Análisis proteómico por nano LC-MS/MS y conteo de espectros

En la estrategia proteómica de *shotgun* las muestras se corren primero en un gel SDS-PAGE a partir del cual, y con el único fin de disminuir la complejidad de las muestras, se fraccionan los carriles (Figura 30). A partir de los mismos, las proteínas son digeridas con tripsina y los péptidos extraídos. Posteriormente y nuevamente con el fin de disminuir la complejidad de cada muestra, los péptidos provenientes de cada sección del gel son fraccionados en un nano LC acoplado a un espectrómetro de masas. A continuación, los espectros de fragmentación obtenidos son asignados a una cierta proteína mediante un software, empleando como referencia la base de datos del genoma del organismo analizado. La comparación del número de espectros asignados a una proteína en las distintas condiciones permite realizar cuantificaciones relativas de los niveles de la proteína (154).



**Figura 30.** Estrategia general de la aproximación del tipo *shotgun* empleada en este estudio.

### 3.3.13 Preparación de las muestras para shotgun

A partir de cada extracto proteico obtenido en el punto 3.3.3, se cargaron 14,7 µg de proteína en un gel de poliacrilamida NUPAGE pre-hecho con un gradiente no lineal 4- 12 % (LifeTechnology). El mismo se corrió bajo una corriente constante de 160 V, durante 1 h 15 min. Posteriormente, el gel se fijó y tiñó con Azul de CoomassieG-250 como se describió en el punto 3.3.4, cortándose cada carril en 6 fragmentos. Dichos fragmentos fueron en primera instancia desteñidos con una solución de acetonitrilo (ACN) 100 % : bicarbonato de amonio 0,2 M (1:1) con agitación, durante 1 h a 30 °C. A continuación, las muestras se incubaron para su reducción en DTT 10 mM con agitación, durante 1 h a 56 °C. Luego de equilibrar la temperatura de las muestras con la ambiental, las mismas fueron incubadas para su aquilación en una solución de iodoacetamida 55 mM con agitación, durante 45 min. Posteriormente se lavaron con bicarbonato de amonio 0,2 M pH 8, durante 15 min; para luego ser deshidratadas mediante dos incubaciones con ACN 100 % en agitación, durante 10 min. Finalmente, el ACN fue retirado y los fragmentos de gel secados completamente con el tubo abierto, a temperatura ambiente.

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

### 3.3.14 Análisis mediante espectrometría de masa

Las muestras obtenidas en el punto anterior se inyectaron en un easy-nLC 1000 (Proxeon-Thermo Fisher Scientific), acoplado a un espectrómetro de masa *Linear Trap Quadrupole* (LTQ) Velos (Thermo Fisher Scientific), equipado con una trampa iónica lineal. Para la separación por nano LC se utilizó una pre-columna Acclaim PepMap™ 100, Nanoviper C18 de 75 µm x 20 mm (tamaño de la partícula 3 µm) (Thermo Fisher Scientific), y una columna PepMap™ RSLC C18 50 µm x 15 cm (tamaño de la partícula 2 µm) (Thermo Fisher Scientific). La elución de los péptidos se realizó con un flujo constante de 250 nl/min, utilizando el siguiente gradiente: fase B de 0 a 50 % durante 100 min, fase B de 50 a 100 % durante 10 min y fase B 100 % durante 10 minutos. La adquisición de los espectros se realizó en el modo dependiente de los datos, el cual consiste en la realización de un escaneo completo de los espectros seguido de una fragmentación MS/MS para los 10 espectros con la relación masa/carga(m/z) más intensos. A su vez se utilizó una lista de exclusión dinámica, donde si el valor de m/z de un espectro se repetía por 30 s, se le aplicaba una exclusión de 30 s de duración.

### 3.3.15 Análisis informático de los espectros obtenidos

Para los análisis informáticos se utilizó el programa *Pattern Lab for Proteomics* v4.0 (<http://www.patternlabforproteomics.org/>) (155). Para esto, en primera instancia y a partir del proteoma de la cepa UYSO10 obtenido con la herramienta RAST, se generó una nueva base de datos del tipo *target reverse*, la cual incluyó los 127 contaminantes más comunes (ej. queratina, BSA, etc.). A continuación, la identificación de los péptidos en la muestra se realizó por comparación de los datos obtenidos en el espectrómetro de masas, con la base de datos generada. En este procedimiento se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: i) tolerancia de masa del precursor: 800 ppm, ii) enzima: tripsina con especificidad completa, aceptando como máximo 2 cortes salteados por la enzima, iii) modificación fija: carbamidometilación de las cisteínas y variable: oxida-

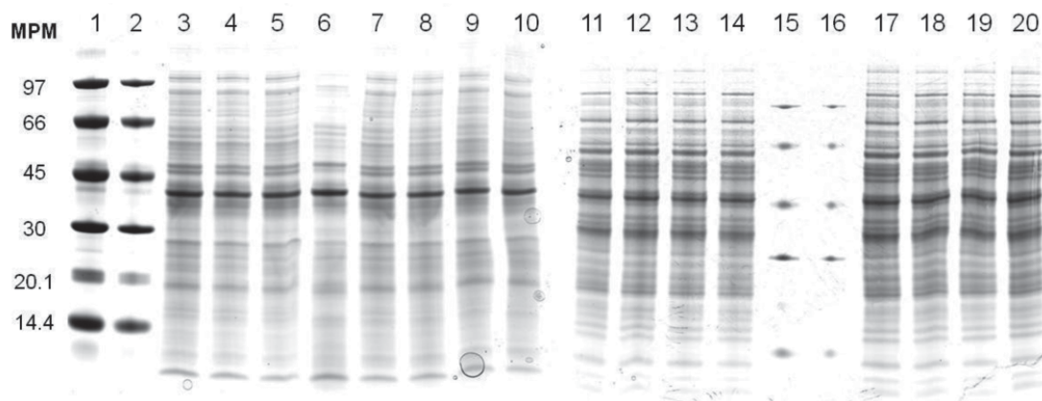
ción de metioninas y iv) dos modificaciones variables como máximo por péptido. Posteriormente, la identificación de proteínas se realizó utilizando los siguientes criterios: i) una tasa de 3 % falsos positivos a nivel de espectros y 2 % a nivel de péptidos, ii) 1 % a nivel de proteínas y iii) un mínimo de dos secuencias peptídicas asignadas por proteína identificada.

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

## 3.4 RESULTADOS

### 3.4.1 Preparación de los extractos proteicos

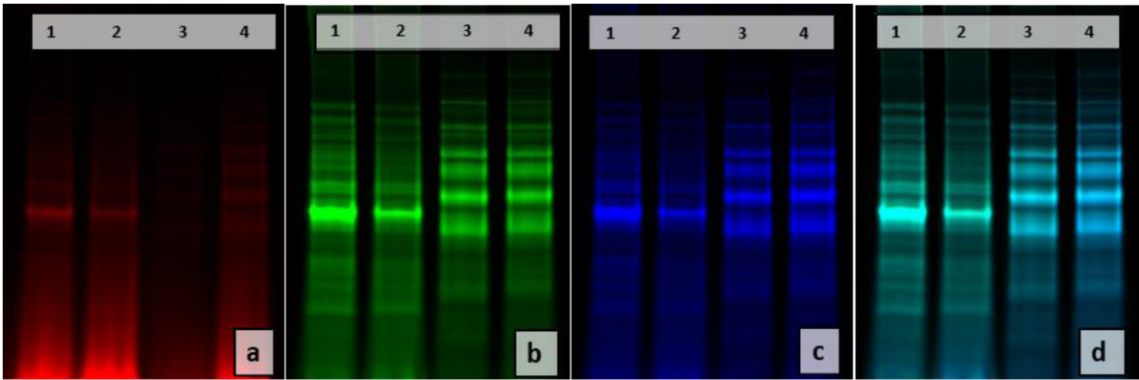
La extracción proteica se realizó a partir de las células cosechadas de los diferentes tratamientos a ser analizados. En primera instancia y con la finalidad de determinar si las muestras presentaban variaciones entre los tratamientos, las mismas se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 31). A partir de la visualización del gel, no se observaron diferencias en los perfiles obtenidos para cada cepa entre ambos tratamientos. Posteriormente, se calculó a partir del gel, la concentración de cada una de las muestras por densitometría (Tabla 14).



**Figura 31:** Visualización por SDS-PAGE de los perfiles de los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24, teñidos con Azul de Coomassie. **Carriles:** 1- MPM: LMW General Electric, 5  $\mu$ l de la solución stock; 2- MPM 2,5  $\mu$ l; 3 al 6- Réplicas biológicas de los extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecidas en ausencia de exudados radiculares; 7 al 10- Extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecidas en presencia de exudados radiculares; 11 al 14- Réplicas biológicas de los extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecidas en ausencia de exudados radiculares; 15- MPM 0,5  $\mu$ l; 16- MPM 0,25  $\mu$ l; 17-20- Extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecidas en presencia de exudados radiculares.

**Tabla 14.** Concentración de proteínas totales en los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24 determinada por densitometría.

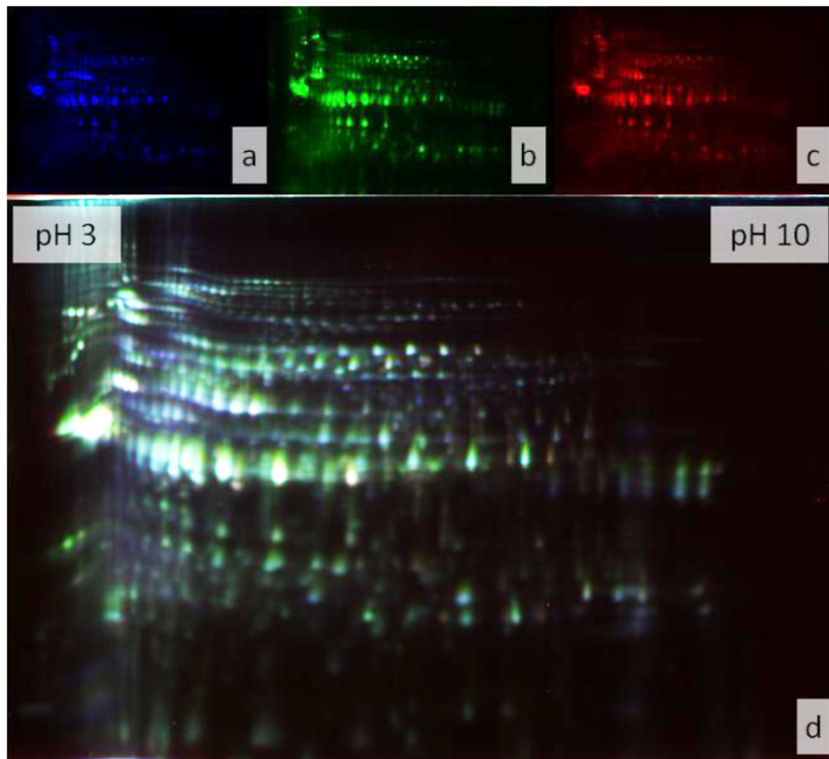
Cepa	Tratamiento	Concentración proteica ( $\mu$ g/ $\mu$ l) Réplicas biológicas			
		1	2	3	4
UYSO10	- exudados	8,0	5,6	6,7	4,9
	+ exudados	6,5	6,4	6,7	5,9
UYSO24	- exudados	6,2	7,8	7,5	7,0
	+ exudados	10,5	8,6	8,1	9,1



**Figura 32.** Visualización mediante SDS-PAGE de los perfiles de los extractos proteicos de las cepas UYSO10 y UYSO24 marcados con los fluoróforos Cy2 (a), Cy3 (b) y Cy5 (c). En (d) se observan los tres canales superpuestos. **Carriles:** 1- Extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en ausencia de exudados radiculares, réplica biológica 1 (rep-1); 2- Extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en presencia de exudados radiculares, rep-3; 3- Extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en ausencia de exudados radiculares, rep-2 y 4- Extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en presencia de exudados radiculares, rep-1. **Observaciones:** en la muestra 3 marcada con Cy2 hubo un error de pipeteado.

Asimismo, se evaluó la ausencia de interferencias entre las muestras marcadas y los fluoróforos a utilizar en la técnica de DIGE. Para ello se seleccionó de cada tratamiento una de las réplicas biológicas,

marcándose una submuestra de 10 µg de proteínas con 80 ng de cada uno de los fluoróforos por separado, la cual se analizó por SDS-PAGE (Figura 32). Los resultados obtenidos



**Figura 33.** Análisis por DIGE de los extractos proteicos de la cepa UYSO10 crecida en presencia y ausencia de exudados radiculares. Se muestran imágenes obtenidas para los fluoróforos Cy2 (a), Cy5 (b) y Cy3 (c), así como la superposición de los canales (d).



**Tabla 15.** Identidad y características generales de los spots con expresión diferencial por DIGE, en el proteoma de la cepa UYSO10 crecida en presencia de exudados radiculares.

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

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

mostraron que no existe interacción entre el fluoróforo y las muestras ya que se observó el mismo perfil proteico para cada replica ensayada con bandas de similar intensidad.

### 3.4.2 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO10 a los exudados radiculares, mediante DIGE

En las imágenes de los geles, del ensayo realizado, se puede observar la presencia de «trenes» horizontales de proteínas que representan las proteoformas o isoformas truncas, fosforiladas y/o acetiladas de cada proteína, efecto observado al aplicar este tipo de técnica (Figura 33). A partir de las imágenes obtenidas se detectaron 1950 *spots* aproximadamente, de los cuales 59 *spots* (3%) mostraron expresión diferencial. De éstos, 34 (1,74%) *spots* fueron sobreexpresados y 25 (1,28%) subexpresados diferencialmente en presencia de exudados. De los 59 *spots*, 34 fueron localizados en el gel teñido con Azul de Coomassie y escindidos para su posterior identificación por MALDI-TOF/TOF. De ese subconjunto, 16 fueron identificados (Tabla 15). La confiabilidad de la identificación de las proteínas fue validada al compararse la masa y el punto isoeléctrico predicho teóricamente de las proteínas identificadas, con el observado experimentalmente. A su vez, es importante resaltar que el haber identificado proteínas con diferentes localizaciones subcelulares corrobora que la extracción de proteínas totales fue correcta.

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

Dentro de las proteínas subexpresadas en presencia de exudados, se identificaron dos proteínas hipotéticas, correspondientes a la expresión de los genes *UYSO10\_2343* y *UYSO10\_447*. Utilizando las herramientas Psi-BLAST e Inter-Pro, se comprobó que ambas proteínas se encuentran muy conservadas entre varias especies; particularmente, la proteína *UYSO10\_447* pre-

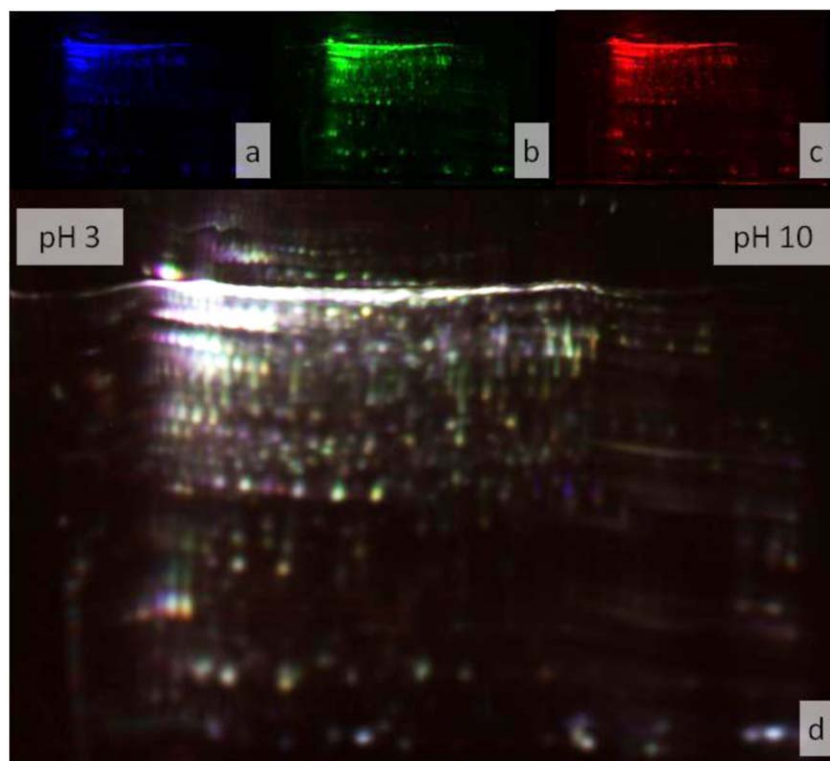
senta el dominio conservado DUF2589, cuya función se desconoce. Ambos casos presentaron como proteína homóloga más cercana, a proteínas hipotéticas del género *Kosakonia* (número de acceso WP\_090120805, WP\_043955345 respectivamente).

### 3.4.3 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO24 a los exudados radiculares, mediante DIGE

A partir del análisis de las imágenes obtenidas (Figura 34), se detectaron 2000 *spots* aproximadamente, de los cuales 36 (1,8 %) mostró expresión diferencial. De los 36 *spots*, 17 (0,85 %) fueron sobreexpresados y 19 (0,95 %) subexpresados diferencialmente en presencia de exudados. De los *spots* con expresión diferencial, 22 fueron detectados en el gel, escindidos y analizados por MALDI-TOF/TOF, de los cuales 16 fueron identificados (Tabla 16).

Globalmente, las proteínas sobreexpresadas en presencia de los exudados radiculares están asociadas a cambios en el metabolismo de carbohidratos, así como a la producción y conversión de energía (Tabla 16). Por otro lado, las proteínas subexpresadas están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, nucleótidos e iones inorgánicos y la adaptación al estrés.

En este caso, en el conjunto de *spots* expresados diferencialmente se identificaron 5 proteínas hipotéticas, de las cuales 3 fueron sobreexpresadas y 2 subexpresadas en presencia de exudados. Dentro de las proteínas hipotéticas sobreexpresadas se encuentra la proteína *UYSO24\_332* que presenta el dominio conservado de función desconocida DUF2076. Esta presenta como proteína homóloga más cercana una proteína hipotética de *Agrobacterium vitis* (cobertura del 92 % y una identidad del 70 %) (WP\_070164144). Por su parte, la proteína hipotética *UYSO24\_1785* presenta como proteína homóloga más cercana una peptidasa de la familia S9 de *Rhizobium oryzae* (57 % cobertura y 65 % identidad) (WP\_085422657). En la misma, se detectó en los primeros aminoácidos (1-31), una secuencia de exportación del tipo *twin-arginine translocation* (TAT). La vía TAT permite exportar proteínas con su conformación 3D a través de la membrana citoplasmática. Por último, la proteína



**Figura 34.** Análisis por DIGE de los extractos proteicos de la cepa UYSO24 crecida en presencia y ausencia de exudados radiculares. Se muestran imágenes obtenidas para los fluoróforos Cy2 (a), Cy5 (b) y Cy3 (c), así como la superposición de los canales (d).

hipotética UYSO24\_6560, se encuentra conservada en varias especies y presenta el dominio conservado de función desconocida DUF1508. En este caso, la proteína homóloga más cercana pertenece al género *Rhizobium etli* (WP\_074062417) (100 % de cobertura y 89 % de identidad).

Por otro lado, dentro de las proteínas subexpresadas en presencia de exudados se encuentran las proteínas hipotéticas UYSO24\_6405 y UYSO24\_2803. La proteína hipotética UYSO24\_6405 presenta como homólogo más cercano a la proteína hipotética de *Rhizobium* sp. CF080 (cobertura del 100 % y un 88 % de identidad) (WP\_007764049). Esta proteína posee un dominio conservado perteneciente a la superfamilia SspB2 y por tanto se clasifica como una *Stringent starvation protein b*. Por su parte, la proteína UYSO24\_2803 es una proteína conservada cuyo homólogo más cercano es «*NYN domain-containing protein* de *Rhizobium*» (100 % de cobertura y 96 % de identidad) (WP\_085422834).

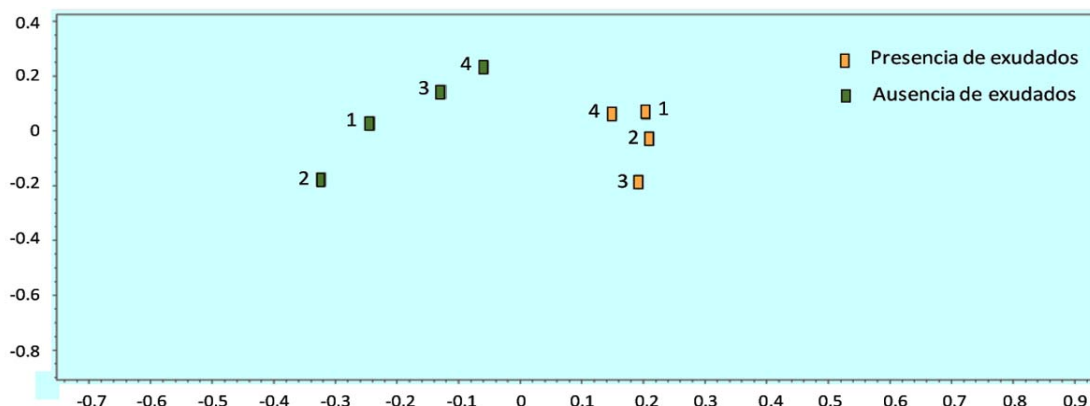
#### 3.4.4 Análisis de la respuesta de la cepa UYSO10 a los exudados radiculares, por nano LC-MS/MS

Posteriormente al análisis realizado mediante la técnica de DIGE, se aplicó una estrategia del tipo *shotgun* con el fin de complementar y ampliar los resultados obtenidos. A partir de las repeticiones biológicas procesadas de la cepa UYSO10, se identificaron por un lado 623, 830, 820 y 681 proteínas en las muestras provenientes de bacterias expuestas al medio MS 1/10 sin N con exudados. Por el otro, se identificaron 992, 1020, 927 y 890 proteínas a partir de bacterias que fueron expuestas al medio MS en ausencia de exudados. Utilizando el programa *Pattern Lab* y aplicando la herramienta Buzios para el análisis de componentes principales, se puede observar que las réplicas biológicas se separan en el eje x, agrupándose según el tratamiento (presencia/ausencia de exudados) (Figura 35). Finalmente se consideraron en el análisis 897 proteínas, las

**Tabla 16.** Identidad y características generales de los spots con expresión diferencial por DIGE en el proteoma de la cepa UYSO24, crecida en presencia de exudados radiculares.

Tasa de cambio	Prueba de Student (p-valor)	Gen en UYSO10	Mascot score <sup>a</sup>	Cobertura de la secuencia	Nº de péptidos asignados	Masa (kDa)	Punto isoelectrico	Proteína identificada <sup>b</sup>	Categoría COG <sup>d</sup>	Ubicación celular <sup>e</sup>	Nombre spot
<b>Sobreexpresadas en presencia de exudados radiculares</b>											
4,1	0,024	946	204	31%	4	20.5	6,77	Ribosome recycling factor	J	C	24_S1
3,47	0,006	6423	411	35%	10	38.9	9,14	Acetolactate synthase small subunit (EC2.2.1.6)	E	C	24_S2
2,82	0,026	5730	160	55%	9	21.6	5,52	4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase (EC4.1.3.16)/2-dehydro-3-deoxyphosphoglucuronate aldolase (EC4.1.2.14)	G	C <sup>f</sup>	24_S3
2,37	0,05	959	115	27%	10	47.8	6,27	Citrate synthase (EC2.3.3.1)	C	C	24_S4
1,96	0,033	332	265	66%	7	10.5	5,48	FIG00985696: Hypothetical protein	S	C <sup>*</sup>	24_S5
1,9	0,0091	3112	117	10%	3	23.5	10,15	MI10513 protein (Invasion proteinB)	S	P <sup>*</sup>	24_S6
1,76	0,04	1785	61	11%	2	28.9	10,55	FIG00365005: Hypothetical protein	E	P <sup>*</sup>	24_S7
1,58	0,022	6560	155	40%	3	6.8	9	FIG00985042: Hypothetical protein	S	I	24_S8
<b>Subexpresadas en presencia de exudados radiculares</b>											
3,11	0,047	7706	68	18%	4	25.1	5,11	Inositol transport system sugar-binding protein	G	I	24_S9
2,42	0,038	7313	213	37%	9	23.3	5,45	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunitPhnG (EC2.7.8.37)	P	I	24_S10
2,27	0,044	619	158	24%	4	20.8	5,25	Translation elongation factorP	J	C <sup>*</sup>	24_S11
2,18	0,041	2683	154	25%	3	15.4	5,27	Nucleoside diphosphate kinase (EC2.7.4.6)	F	EC <sup>*</sup>	24_S11
2,05	0,049	7706	105	40%	7	25.1	5,11	Inositol transport system sugar-binding protein	G	I	24_S12
1,97	0,012	6405	156	22%	3	18.9	4,94	FIG1011804: Hypothetical protein	S	C	24_S13
1,84	0,022	5634	302	38%	5	17.9	5,54	16 kDa heat shock protein A	O	C	24_S14
1,8	0,029	2803	230	45%	8	21.7	5,35	FIG00344505: Hypothetical protein	S	C	24_S15
		5737	61	8%	3	44.1	7,83	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	P	MC	24_S16

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



**Figura 35.** Análisis de principales componentes de las réplicas biológicas del proteoma de la cepa UYSO10 creciendo en presencia y ausencia de exudados.

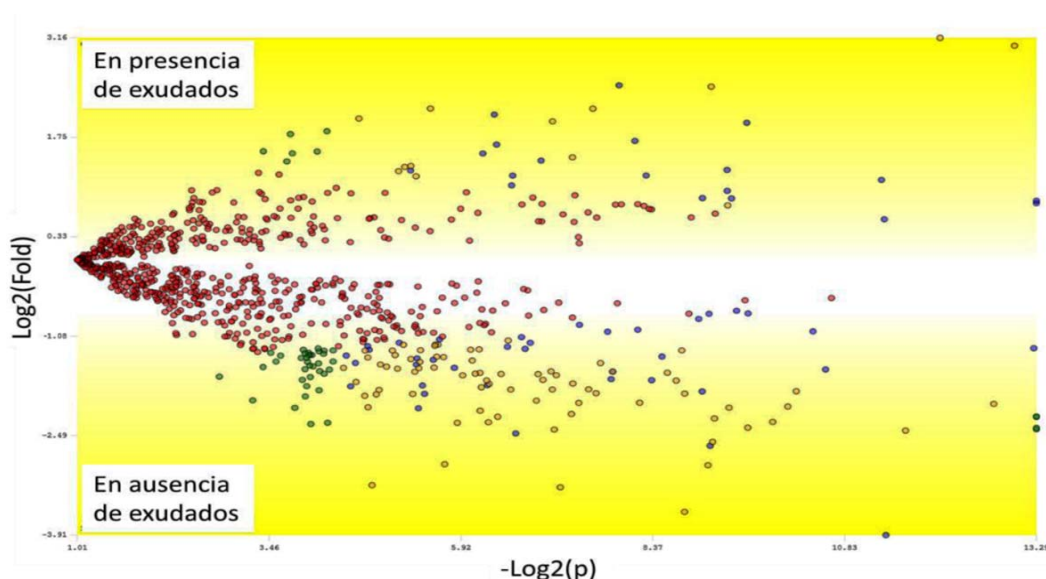
cuales constituyen un 15 % de las secuencias codificantes identificadas por el programa RAST.

Para el análisis de los resultados, se consideraron como proteínas expresadas **exclusivamente** en una condición, a aquellas proteínas presentes en al menos 3 de 4 réplicas biológicas y que estuviesen como máximo en 1 réplica de la otra condición. Con este criterio se identificaron 4 proteínas exclusivas en presencia de exudados y 59 en ausencia de exudados (Tablas 17 y 18).

**Tabla 17.** Número de proteínas **únicas** y **sobreexpresadas**, en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas o no a exudados radiculares.

	Expresión única	Sobre-expresadas	Número total
<b>+ exudados</b>	4	14	18 (0,3 %*)
<b>- exudados</b>	59	36	95 (1,6 %)

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



**Figura 36.** Diagrama de volcán mostrando las proteínas **expresadas diferencialmente** en presencia y ausencia de exudados. En el diagrama se grafica la tasa de cambio versus la significancia estadística para cada proteína. **Puntos azules y naranjas:** corresponden a proteínas que satisfacen los dos criterios, el estadístico y la tasa de cambio. En particular, las proteínas marcadas en naranja se encuentran en muy baja abundancia (bajo número de espectros), por lo cual se requiere verificación experimental. **Puntos rojos:** proteínas que no satisfacen el criterio de tasa de cambio y se detectan con el mismo nivel en ambas condiciones. **Puntos verdes:** proteínas que satisfacen el criterio de tasa de cambio, pero probablemente por azar (no satisfacen el criterio estadístico).

**Tabla 18.** Proteínas identificadas **exclusivamente** en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas o no a exudados radiculares, detectadas mediante la aproximación *shotgun*.

Gen en UYSO10	Proteína identificada <sup>a</sup>	Categoría COG <sup>b</sup>	Nº de réplicas	Señal total <sup>c</sup>	Ubicación celular <sup>d</sup>
<b>Únicas en presencia de exudados</b>					
2442	<i>Fumarate reductase iron-sulfur protein</i> (EC 1.3.5.4)	C	3	24	MCP*
56	<i>RNA polymerase-binding transcription factor</i> DksA	E	3	25	C
2100	<i>Maltose operon periplasmic protein</i> MalM	G	4	22	P
1163	<i>Uncharacterized protein conserved in bacteria</i>	S	4	23	E
<b>Únicas en ausencia de exudados</b>					
5340	<i>Succinate-semialdehyde dehydrogenase</i> [NAD(P)+] (EC 1.2.1.16)	C	3	48	MCC*
5747	<i>Fumarate hydratase class II</i> (EC 4.2.1.2)	C	4	35	C
4596	<i>D-lactate dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.28)	C	3	27	MCC*
4580	<i>Bifunctional protein: zinc-containing alcohol dehydrogenase; quinone oxidoreductase (NADPH:quinone reductase)</i> (EC 1.1.1.-); <i>Similar to arginate lyase</i>	C	3	20	C
3904	<i>Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II</i> (EC 1.10.3.-)	C	4	18	MC
5423	<i>Methionine synthase II (cobalamin-independent)</i>	E	3	41	C
3618	<i>Dipeptide transport ATP-binding protein</i> DppD (TC 3.A.1.5.2)	E	4	24	MCC*
161	<i>4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase</i> (EC 1.17.1.8)	E	4	21	C
2303	<i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i> (EC 1.5.1.20)	E	3	19	C
2115	<i>Aspartokinase</i> (EC 2.7.2.4)	E	3	19	C
3620	<i>Dipeptide transport system permease protein</i> DppB (TC 3.A.1.5.2)	E	3	17	MC
355	<i>Putrescine transport ATP-binding protein</i> PotG (TC 3.A.1.11.2)	E	3	16	MC
3298	<i>Glutamate Aspartate transport system permease protein</i> GltJ (TC 3.A.1.3.4)	E	3	16	MC
2522	<i>IMP cyclohydrolase</i> (EC 3.5.4.10) / <i>Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase</i> (EC 2.1.2.3)	F	3	31	C
2685	<i>Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> (EC 2.4.2.22)	F	3	25	C
4631	<i>1-phosphofructokinase</i> (EC 2.7.1.56)	G	4	82	C
3469	<i>Limit dextrin alpha-1,6-maltotetraose-hydrolase</i> (EC 3.2.1.196)	G	4	60	C
449	<i>Dihydroxyacetone kinase, ATP-dependent</i> (EC 2.7.1.29)	G	4	45	C*
2008	<i>Ribose ABC transport system, ATP-binding protein</i> RbsA (TC 3.A.1.2.1)	G	3	20	MC
1532	<i>Fructokinase</i> (EC 2.7.1.4)	G	3	17	MCC*
2678	<i>Acyl-CoA dehydrogenase</i>	I	4	45	MC
5347	<i>Ribonuclease G</i>	J	3	29	C
1868	<i>Peptide chain release factor 2</i>	J	3	19	C
2173	<i>TsaC/YrdC paralog</i>	J	3	16	C
2843	<i>Fructokinase</i>	K	3	31	C
5260	<i>Penicillin-binding protein activator</i> LpoA	L	3	22	I
2086	<i>Replicative DNA helicase</i> (DnaB) (EC 3.6.4.12)	L	3	16	C
2529	<i>NADH pyrophosphatase</i> (EC 3.6.1.22)	L	3	9	C
635	<i>Transcription-repair coupling factor</i>	L	3	29	C
4980	<i>2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase</i> (EC 2.5.1.55)	M	3	31	C
1280	<i>Translation elongation factor</i> LepA	M	4	21	MCC*
4484	<i>Protein YeeZ</i>	M	3	21	C
3868	<i>Outer membrane porin for chitooligosaccharides</i> ChiP	M	3	20	ME*
1588	<i>Membrane-bound lytic murein transglycosylase B</i>	M	3	20	MCP*
3300	<i>Apolipoprotein N-acyltransferase</i> (EC 2.3.1.-)	M	3	17	MC
522	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	N	3	72	MC
4774	<i>TsaB protein, required for threonylcarbamoyladenosine (t(6)A) formation in tRNA</i>	O	3	13	C*
2560	<i>Trk potassium uptake system protein</i> TrkA	P	3	31	MCC*
1646	<i>Nitrate ABC transporter, permease protein</i>	P	3	30	MC
2793	<i>Periplasmic hemin-binding protein</i>	P	3	13	MC

Gen en UYSO10	Proteína identificada <sup>a</sup>	Categoría COG <sup>b</sup>	Nº de réplicas	Señal total <sup>c</sup>	Ubicación celular <sup>d</sup>
2127	<i>Isocitrate dehydrogenase phosphatase</i> (EC 2.7.11.5)/ <i>kinase</i> (EC 3.1.3.-)	T	4	22	C
2547	<i>Protein translocase subunit SecE</i>	U	4	25	MC
5504	<i>Beta-lactamase</i> (EC 3.5.2.6)	V	4	21	PME*
5921	<i>hypothetical protein</i>	V	3	19	C
295	<i>Lipid A export permease/ATP-binding protein MsbA</i>	V	3	15	MC
263	<i>Bis-ABC ATPase Uup</i>	R	4	36	C
3801	<i>Chromate reductase</i> (EC 1.6.5.2)	R	3	36	C
3213	<i>5-methylthioribose kinase</i> (EC 2.7.1.100)	R	3	25	C
2026	<i>Acetate permease ActP (cation/acetate symporter)</i>	R	4	24	MC
4881	<i>Hydrolase, alpha/beta fold family</i>	R	4	22	P*
3832	<i>ATPase RavA</i>	R	3	16	C
1048	<i>Multimeric flavodoxin WrbA</i>	R	3	14	E
1727	<i>Hypothetical protein</i>	S	3	50	E
3716	<i>Uncharacterized protein YicH</i>	S	3	31	P
5515	<i>hypothetical protein</i>	S	3	18	MCME*
3571	<i>hypothetical protein</i>	S	3	17	P
4059	FIG00626109: <i>hypothetical protein</i>	S	3	16	P
222	<i>2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazole</i> (OHCU) <i>decarboxylase</i> (EC 4.1.1.97)	S	3	14	I
5346	<i>Uncharacterized protein YhdP</i>	S	3	13	I

<sup>a</sup>La anotación de la proteína se obtiene de la búsqueda utilizando la base de datos del genoma de la cepa UYSO10.

<sup>b</sup>Categorías COG: J- traducción; L- replicación, recombinación y reparación; K- transcripción; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; M- estructura y biogénesis de la pared celular y de la membrana externa; N- secreción, movilidad y quimiotaxis; T-transducción de señales; P-transporte y metabolismo de iones inorgánicos; C-producción y conversión de energía; G-transporte y metabolismo de carbohidratos; E-transporte y metabolismo de aminoácidos; F-transporte y metabolismo de nucleótidos; U- tráfico intracelular y secreción; V- mecanismo de defensa; I-metabolismo lipídico; R-predicción funcional general; S-sin predicción funcional. <sup>c</sup>La señal total corresponde a la sumatoria del número de espectros asignados a cada proteína en cada réplica. Se considera una medida de su abundancia relativa. <sup>d</sup>Los resultados mostrados corresponden a PSORTb, y cuando no hubo predicción o la misma no se correspondió, se reporta el resultado obtenido por Cello indicado con un «\*». ME- Membrana externa, MC- Membrana citoplásmica, C- citoplásmica, P- Periplásmica, E- Extracelular, I- Indeterminada.

Por otro lado, se compararon las abundancias relativas para aquellas proteínas presentes en ambos tratamientos mediante el módulo *TC Fold*. Este módulo clasifica las proteínas considerando la tasa de cambio y la significancia estadística de cada una (Figura 36). Del total de proteínas consideradas en el análisis, 835 fueron identificadas en ambas condiciones. De estas, 125 (2,1 % del proteoma total) satisfacen los criterios considerados para las proteínas de expresión diferencial. Sin embargo, de las 125 proteínas, 75 poseen baja abundancia por lo que es necesaria su verificación experimental. En la Tabla 8 se listan las proteínas con expresión diferencial que no requieren verificación experimental (50 proteínas, 0,8 %). En total en presencia de exudados se sobreexpresaron 14 proteínas (0,2 %) y se reprimieron 36 proteínas (0,6 %) (Tabla 17).

Por lo tanto, si se consideran tanto las proteínas de expresión única como las que poseen

expresión diferencial, observamos que en presencia de exudados se estimula la expresión 0,3 % del proteoma total y se reprime la expresión de un 1,6 % del mismo (Tabla 17), correspondiente al 2,0 y 10,6 % del proteoma expresado, respectivamente.

Mediante el uso de las herramientas PSORTB y Cello, las proteínas que mostraron un cambio de expresión (únicas o diferenciales), se clasificaron en 55 citoplasmáticas, 14 periplasmáticas, 7 de membrana externa, 19 de membrana citoplásmica, 3 como extracelulares, 3 no mostraron predicción y 11 con distinta ubicación celular (Tablas 18 y 19). Los resultados mostraron también que las principales categorías funcionales COG que cambiaron su expresión fueron transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, biogénesis y estructura de la membrana, así como la producción y conversión de energía.

**Tabla 19.** Proteínas con **expresión diferencial** en las muestras de la cepa UYSO10 expuestas a exudados radiculares, identificadas mediante la aproximación *shotgun*.

Tasa de cambio	p-valor	Gen en UYSO10	Proteína identificada <sup>a</sup>	Categoría COG <sup>b</sup>	Localización <sup>c</sup>
<b>Sobreexpresadas en presencia de exudados</b>					
1,50	0,0004	2911	<i>Cell division trigger factor</i> (EC 5.2.1.8)	O	C
1,75	0,00001	16	<i>Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase alpha chain</i> (EC 6.4.1.2)	I	C
1,79	0,00008	3822	<i>ATP synthase F0 sector subunit b</i> (EC 3.6.3.14)	C	MC
2,09	0,0106	4687	<i>Chemotaxis response - phosphatase</i> CheZ	N	C
2,20	0,0004	3899	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] alpha chain</i> (EC 6.2.1.5)	C	C
2,30	0,0105	278	<i>Outer membrane porin</i> OmpF	M	ME
2,30	0,0032	3260	<i>Alkyl hydroperoxide reductase protein C</i> (EC 1.11.1.15)	O	C
2,42	0,0259	2428	<i>Heat shock protein 60 family co-chaperone</i> GroES	O	C
2,67	0,0081	2424	<i>Aspartate ammonia-lyase</i> (EC 4.3.1.1)	E	C
2,86	0,0136	3262	<i>Universal stress protein G</i>	T	C
3,12	0,0121	24	<i>Outer membrane chaperone</i> Skp (OmpH) precursor/ <i>Outer membrane protein H precursor</i>	M	P
3,24	0,0035	2584	<i>LSU ribosomal protein L16p</i> (L10e)	J	C
3,87	0,0013	500	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase, type I</i> (EC 3.1.3.11)	G	C
4,20	0,0123	5208	<i>Aerotaxis sensor receptor protein</i>	N	MC
<b>Subexpresadas en presencia de exudados</b>					
6,22	0,0018	5332	<i>Outer membrane stress sensor protease</i> DegQ, <i>serine protease</i>	O	P
5,51	0,0102	1372	<i>Enoyl-CoA hydratase</i> (EC 4.2.1.17) / <i>Delta (3)-cis-delta (2)-trans-enoyl-CoA isomerase</i> (EC 5.3.3.8) / <i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i> (EC 1.1.1.35) / <i>3-hydroxybutyryl-CoA epimerase</i> (EC 5.1.2.3)	I	C
5,29	0,00001	3952	<i>Excinuclease ABC subunit B</i>	L	C
4,30	0,0241	2289	<i>Outer membrane vitamin B12 receptor</i> BtuB	H	ME
3,73	0,0229	4914	<i>Allophanate hydrolase</i> (EC 3.5.1.54)	E	C
3,64	0,0019	4290	<i>Flagellar M-ring protein</i> FlfF	N	MCME*
3,46	0,0441	4915	<i>Urea carboxylase</i> (EC 6.3.4.6)	E	C
3,43	0,0233	1167	<i>Uncharacterized protein</i> YdcJ	S	C
3,43	0,0131	718	<i>Ferrous iron transport periplasmic protein</i> EfeO, <i>contains peptidase-M75 domain and (frequently) cupredoxin-like domain</i>	P	P
3,26	0,0030	4985	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>	N	MC
3,23	0,0044	3467	<i>Glucose-1-phosphate adenyltransferase</i> (EC 2.7.7.27)	G	C
3,00	0,0043	2217	<i>Periplasmic Murein Peptide-Binding Protein</i> MppA	E	P
2,93	0,0006	5673	<i>ABC transporter periplasmic-binding protein</i> YdcS	E	P
2,89	0,0175	4794	<i>Trehalase</i> (EC 3.2.1.28) @ <i>Periplasmic trehalase</i> (EC 3.2.1.28)	G	P
2,80	0,0246	5787	<i>N-ethylmaleimide reductase</i> (EC 1. -. -. -)	C	C
2,75	0,0422	4917	<i>Urea ABC transporter, substrate binding protein</i> UrtA	E	P*
2,67	0,0211	447	FIG00975563: <i>hypothetical protein</i>	S	P*
2,63	0,0244	5325	<i>Glutamate synthase [NADPH] small chain</i> (EC 1.4.1.13)	E	C
2,58	0,0028	4750	<i>Tail-specific protease precursor</i> (EC 3.4.21.102)	M	MC
2,42	0,0374	2114	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i> (EC 5.3.1.9)	G	C
2,39	0,0094	4632	<i>Bifunctional PTS system fructose-specific transporter subunit IIA/HPr protein</i>	G	C
2,38	0,0001	3087	<i>domain of unknown function</i> DUF1745	S	C
2,35	0,0109	3911	<i>Tol-Pal system beta propeller repeat protein</i> TolB	U	P
2,33	0,0378	4683	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein IV (dipeptide chemoreceptor protein)</i>	N	MC
2,26	0,0278	2916	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i> PpiD (EC 5.2.1.8)	O	P
2,26	0,0089	5756	<i>Adenosine deaminase</i> (EC 3.5.4.4)	F	C

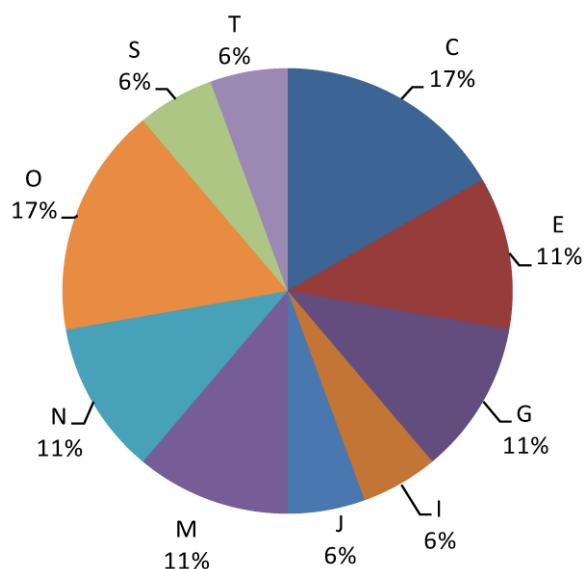


Tasa de cambio	p-valor	Gen en UYSO10	Proteína identificada <sup>a</sup>	Categoría COG <sup>b</sup>	Localización <sup>c</sup>
2,18	0,0200	624	<i>Succinate-semialdehyde dehydrogenase</i> [NAD] (EC 1.2.1.24); <i>Succinate-semialdehyde dehydrogenase</i> [NADP+] (EC 1.2.1.79)	C	C
2,14	0,0097	5417	<i>Dipeptidyl carboxypeptidase</i> Dcp (EC 3.4.15.5)	E	C
2,02	0,0045	140	<i>LPS-assembly protein</i> LptD	M	ME
2,02	0,0007	3088	<i>Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein</i>	N	MC
1,98	0,0034	4230	<i>Outer membrane porin</i> OmpC	M	ME
1,89	0,0058	4850	<i>Aldehyde dehydrogenase</i> (EC 1.2.1.3)	C	C
1,78	0,0020	25	<i>Outer membrane protein assembly factor</i> YaeT	M	ME
1,70	0,0018	3084	<i>response regulator receiver modulated metal dependent phosphohydrolase</i>	T	C
1,69	0,0013	3577	<i>Oligopeptidase</i> A (EC 3.4.24.70)	E	C
1,65	0,0014	4133	<i>Long-chain fatty acid transport protein</i>	I	ME

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

En particular las proteínas que aumentaron su expresión en presencia de los exudados radiculares están asociadas a cambios en el transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, a la movilidad y quimiotaxis, a la estructura y biogénesis de la envoltura celular, al plegamiento de proteínas y funciones relacionadas; así como a la producción y conversión de energía (Figura 37).

En relación con las proteínas detectadas de función hipotética, en presencia de exudados se encuentra sobreexpresada la proteína UYSO10\_1163. Esta proteína clasificada como extracelular presenta el dominio 2076 de función desconocida, pero que posiblemente posea un sensor de unión a ligando. Por otro lado, dentro de las proteínas reprimidas en presencia de exudados encontramos, una proteína citoplásmica con homología con una *histidine kinase*, la cual presenta un dominio FIST que se cree une ligandos pequeños (UYSO10\_3087) y dos proteínas con el dominio AsmA (UYSO10\_3716 y UYSO10\_5346), el cual ha sido sugerido como involucrado en el ensamblaje de OMPs en *E. coli*, pudiendo tener un rol en la biogénesis de LPS. A su vez se observaron reprimidas las siguientes proteínas con función desconocida: una proteína periplasmática perteneciente a la superfamilia



**Figura 37.** Clasificación en categorías funcionales COG de las proteínas presentes únicamente o sobreexpresadas en presencia de exudados (n=18). J- traducción; O- moléculas chaperonas y funciones relacionadas; M- biogénesis y estructura de la membrana externa; N- secreción, movilidad y quimiotaxis; T- transducción de señales; C- producción y conversión de energía; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; I- metabolismo lipídico; S- sin predicción funcional.

YncE (UYSO10\_4059); una proteína extracelular (UYSO10\_1727), la proteína YdcJ (UYSO10\_1167) que presenta un dominio de función desconocida DUF1338 y una proteína con el dominio de función desconocida DUF2589 (UYSO10\_447). Cabe mencionar que las proteínas UYSO10\_3571 y UYSO10\_5515, son muy interesantes porque no tienen ortólogos ni homólogos.

### 3.5 DISCUSIÓN

#### 3.5.1 Los exudados radiculares son la primera señal en la interacción planta-bacteria

Las plantas son capaces de liberar (exudar), a través de sus raíces hasta un 20 % de sus productos fotosintéticos al suelo (39, 156). Los exudados radiculares consisten principalmente en azúcares complejos, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas extracelulares, fenoles, vitaminas y macromoléculas nitrogenadas (purinas y nucleósidos) (157). Se asume que los compuestos presentes en los exudados radiculares sirven como fuente de C y N para las bacterias del suelo (156). Estas fuentes de C externas al suelo influyen en la estructura, diversidad y funcionalidad de la comunidad rizosférica (39).

A su vez, algunos de los compuestos exudados incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos (succinato, fumarato y malato) y compuestos aromáticos (luteonina, catecoles, acetosiringona, entre otros), inducen una quimiotaxis dependiente de flagelo en las bacterias del suelo hacia las raíces (39, 157). Particularmente, se ha reportado la liberación de exudados en la zona de los pelos radiculares, en la zona apical, así como en los sitios de emergencia de raíces secundarias (ramificaciones) (39), siendo éstos mismos sitios los preferidos para la colonización por las bacterias rizosféricas e ingreso por las bacterias endófitas (66).

Una gran variedad de factores ambientales como la presencia de estrés biótico y abiótico (ej. la falta de algún nutriente), así como la estructura del suelo, puede modular el proceso de exudación tanto cuantitativa como cualitativamente (39, 158). Asimismo, no se descarta que la exudación de ciertas moléculas específicas dependa en parte,

del reconocimiento de señales moleculares secretadas por las bacterias en respuesta a las señales secretadas previamente por las plantas (159, 160). En este sentido, se considera que la señalización molecular entre las bacterias y las plantas (potenciales huéspedes), juega un rol fundamental en el establecimiento de interacciones benéficas y patogénicas. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes en las interacciones planta-bacteria endófitas, se encuentran poco comprendidas (39, 43).

En la Parte II, se determinó que las cepas UYSO10 y UYSO24 utilizan una amplia variedad de fuentes de N y C, incluso las presentes en los exudados. También se describió en ambas cepas la presencia de flagelos y del movimiento tipo *swimming* que les permite a las bacterias desplazarse en función de una señal quimiotáctica. Asimismo, en ensayos de co-cultivo, se observó que las cepas en estudio colonizan las plantas de caña de azúcar micropropagadas en las zonas de mayor liberación de exudados, sugiriendo la existencia de alguna señalización entre las partes (161) (Parte II). Por lo tanto, como una primera caracterización, en este capítulo se evaluó la respuesta bacteriana a la presencia de exudados radiculares en el mismo medio de cultivo donde se han realizado previamente los ensayos de interacción planta-bacteria: MS 1/10 sin N. Dicho medio de cultivo posee una baja concentración de fuente de C (sacarosa 2 g/l) y no posee fuente de N, de forma de favorecer la interacción planta-bacteria (124). Teniendo estas características del medio en cuenta, así como los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento, podemos a priori asumir que el crecimiento en el medio MS 1/10 sin N constituye una situación de estrés para las bacterias.

#### 3.5.2 Aplicación de una aproximación proteómica global al estudio de la interacción planta-bacteria

Con el desarrollo de las herramientas ómicas, se comenzaron a aplicar aproximaciones globales al estudio de la interacción planta-bacteria buscando analizar la expresión génica diferencial con el fin de caracterizar nuevos genes vinculados a la interacción planta-bacteria (133, 160, 162). En el presente trabajo se utilizaron 2 estrategias

proteómicas para abordar una de las primeras etapas de la interacción: la respuesta bacteriana a los exudados radiculares.

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

La mayoría de los estudios ómicos y en particular proteómicos han sido realizados en modelos de interacción planta-patógeno o planta-simbionte, principalmente en la interacción leguminosa-rizobio (5). En contraposición, pocos trabajos han aplicado estas técnicas a la interacción planta-bacteria endófitas (5, 133, 163). En su mayoría las aproximaciones realizadas han utilizado técnicas dependientes de gel (2D SDS-PAGE y DIGE), para abordar el estudio de la respuesta bacteriana a la asociación con la planta. Sin embargo, se han identificado muy pocas proteínas de la planta específicamente expresadas en la interacción con la bacteria. Probablemente este hecho se deba a la mayor complejidad del proteoma vegetal. Finalmente, otra característica de este tipo de aproximaciones es que difícilmente pueden aplicarse en sistemas reales, por lo tanto, se utilizan modelos de laboratorio.

Particularmente en este trabajo, el material de partida fueron extractos proteicos bacterianos obtenidos a partir de un sistema *gnotobiótico*. Nuestra aproximación presentó fortalezas y limitantes, las cuales fueron consideradas en el posterior análisis de cada experimento. Como fortalezas podemos considerar: (i) el uso de un modelo planta-bacteria caracterizado previamente en el laboratorio, (ii) el uso del mismo medio de cultivo utilizado en otros estudios de interacción planta-bacteria. En contraposición, en la mayoría de los trabajos similares se realizó una dilución de los exudados radiculares en un medio de cultivo de crecimiento bacteriano (160, 163–165). (iii) el uso de una cepa perteneciente al género *Rhizobium*, el cual ha sido poco estudiado como endófito a la fecha y (iv) de una cepa del género

*Kosakonia*, el cual ha sido descrito recientemente y presenta varias cepas con características PCV. Si bien se han aplicado aproximaciones transcriptómicas y proteómicas utilizando la cepa *K. radicincitans* DSM16656<sup>T</sup>, en su totalidad estos estudios han sido analizados desde el punto de vista de la planta y particularmente en interacción con la planta modelo *A. thaliana* (20, 166, 167).

Por otro lado, nuestra aproximación experimental posee principalmente las siguientes limitantes: (i) la exposición bacteriana a la presencia o no de exudados en condiciones de agitación. Esto se debe a que en la naturaleza la interacción planta-bacteria no se da en movimiento, el cual puede inhibir la formación de biopelículas, así como alterar los niveles de oxígeno afectando por ejemplo la FBN. En nuestro caso se decidió realizar el experimento en estas condiciones con el fin de que la exposición a los exudados se realice homogéneamente. (ii) el número de bacterias expuestas a la presencia de exudados radiculares es mayor a los ensayos previos descritos en los experimentos de colonización realizados en nuestro laboratorio (168), debido a que en estas condiciones las cepas se reproducen poco. Éste hecho puede eventualmente «diluir» la relación bacteria-exudado y por tanto influenciaren la capacidad de respuesta bacteriana. Sin embargo, en la casi totalidad de las aproximaciones realizadas por otros autores, el efecto de «dilución» está presente (160, 163, 165).

### 3.5.3 Respuesta de la cepa UYSO10 a la presencia de exudados radiculares de caña de azúcar

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

#### 3.5.3.1 Transporte y metabolismo de nutrientes

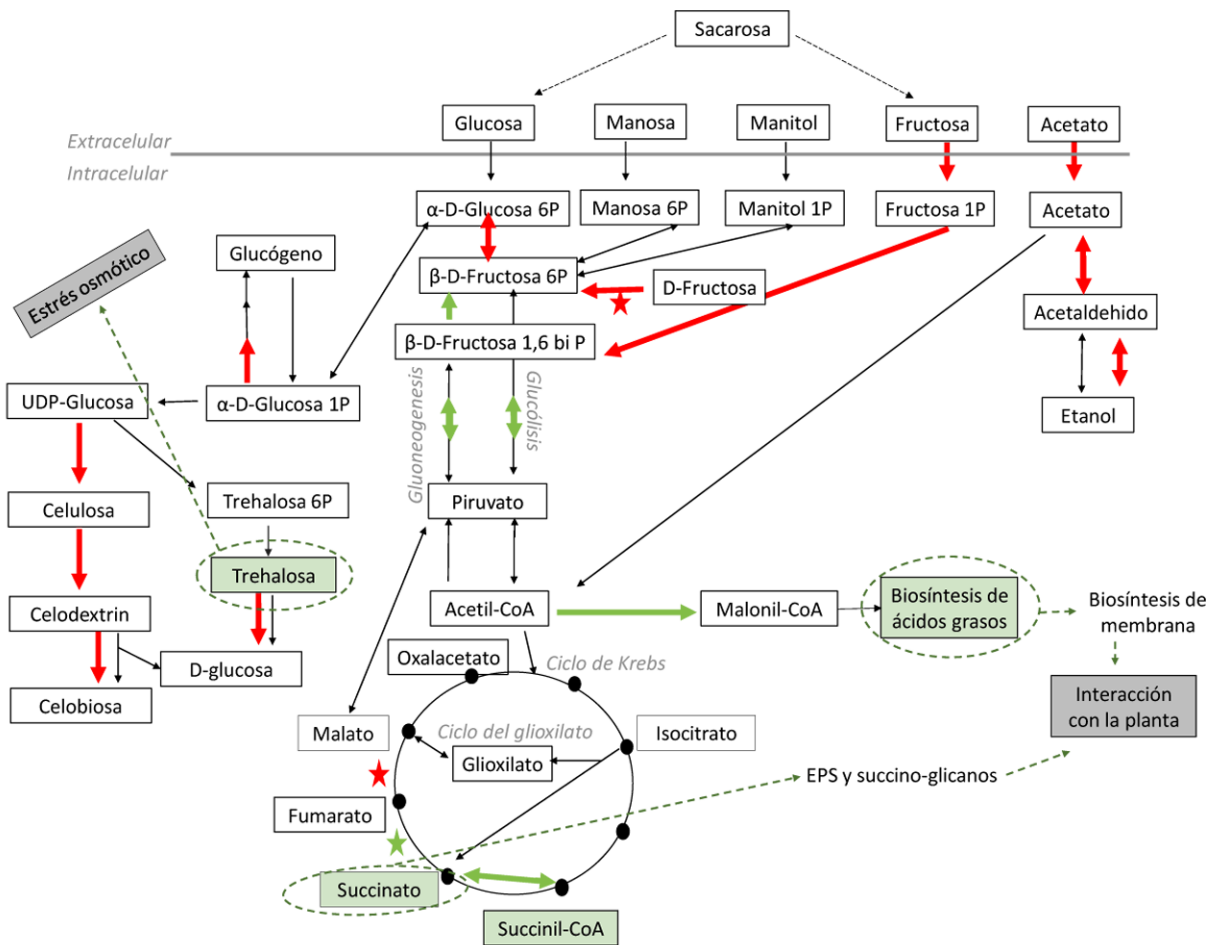
Teniendo en cuenta que la cepa en estudio es una bacteria endófitas, capaz de colonizar los tejidos internos de las plantas de caña de azúcar

rápidamente (168) (Parte II), se espera que en los primeros pasos de la interacción sea capaz de captar y metabolizar los compuestos exudados por la planta ya sea como fuente nutricional o como señales.

*i- Metabolismo del C*

El análisis proteómico determinó que en ambas condiciones la cepa UYSO10 expresa de forma constitutiva proteínas asociadas al transporte y metabolización de glucosa, probablemente proveniente de la degradación de la sacarosa del medio de cultivo, así como manosa, manitol, xilosa, arabinosa, galactosa, otros azúcares sin

identificar, maltosa/maltodextrin, pirimidina y alosa (Figura 38). El origen de estos transportadores no es claro, al menos en la condición sin exudados, debido a que la única fuente de C presente en el medio de cultivo es la sacarosa. Se podría especular que la expresión de dichas proteínas puede deberse a que: i) la bacteria en condiciones de estrés exprese otros transportadores en búsqueda de nuevas fuentes de C, o ii) la existencia de fuentes de C a partir de la degradación de células muertas. Esta opción es posible si se interpreta que la falta de crecimiento en estas condiciones no implica el estado estacionario de



**Figura 38.** Representación esquemática de las principales vías del metabolismo del C identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares. Las vías marcadas con negro se encuentran expresadas de forma constitutiva, las verdes sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas. Las flechas negras con trazo cortado señalan posibles vías para las que no se encontró la enzima expresada en ninguna de las condiciones. Los asteriscos marcan que la enzima se expresó únicamente en presencia (verde) o ausencia (rojo) de exudados. Cuando una misma vía se encuentra señalada con más de una indicación, se refiere a que se observaron proteínas o subunidades con diferente tendencia. Finalmente, en recuadros grises se indica una posible función de los cambios proteicos evidenciados.

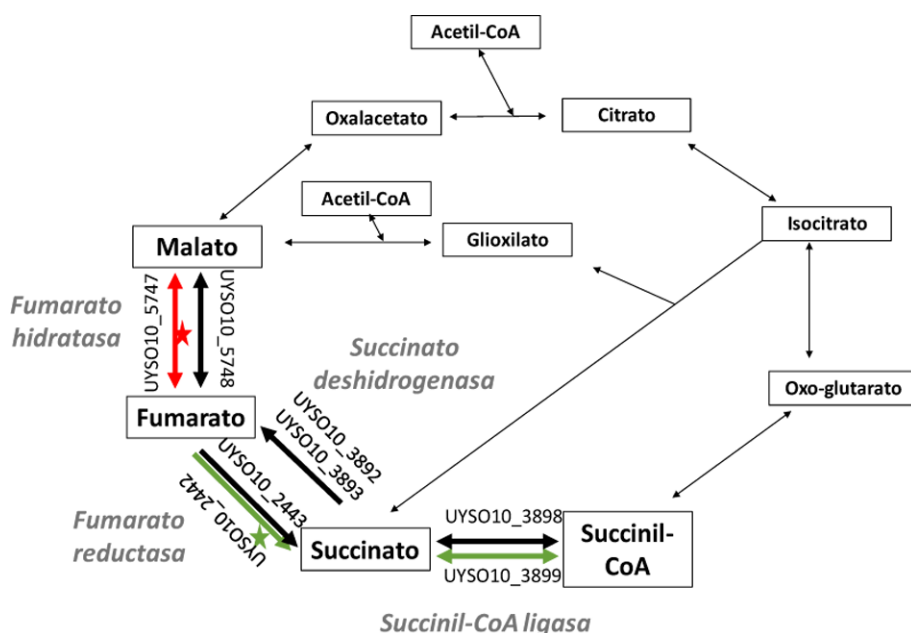
cada célula, sino que existe un recambio (crecimiento y muerte celular).

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

Por otro lado, en ausencia de exudados, se sobreexpresan proteínas asociadas al transporte y metabolización de la fructosa, así como proteínas asociadas al transporte de acetato, ribosa y oligosacáridos (Figura 38). Una posible explicación es que en esta situación la bacteria se encuentra en una situación de estrés nutricional e intenta metabolizar cualquier fuente de C disponible en el medio de cultivo. Esto se observa por ejemplo para la sacarosa, componente en baja concentración del medio MS (1/10 y sin N), donde

la bacteria en ausencia de exudados transporta glucosa y fructosa, mientras que, en presencia de estos solo transporta glucosa. Cabe resaltar que la cepa UYSO10 es capaz de crecer en sacarosa, glucosa y fructosa (Parte II). El mismo comportamiento del empleo diferencial de los monosacáridos de la sacarosa se ha reportado en la cepa *E. coli* W. En esta bacteria se observó que el crecimiento en sacarosa 2 g/l es extremadamente lento (169) y que, bajo estas condiciones consideradas de estrés nutricional, utiliza tanto la glucosa y la fructosa provenientes de la sacarosa. Sin embargo, cuando se encuentra creciendo en altas concentraciones de sacarosa (20 g/l), emplea solamente glucosa como fuente de C (169). Estas observaciones sugieren que la cepa UYSO10 en presencia de exudados no se encuentra en condiciones de estrés nutricional, probablemente porque esté utilizando otra fuente de C no detectada en este estudio.

En relación con el metabolismo de los carbohidratos y su respiración, en ambas condiciones se observan expresadas de forma constitutiva las enzimas de la vía de la glucólisis, así como las



**Figura 39.** Representación esquemática de las enzimas y sus subunidades que cambian su expresión en el Ciclo de Krebs, identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares. Las vías marcadas con negro se encuentran expresadas de forma constitutiva, las verdes sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas. Los asteriscos marcan que la enzima se expresó únicamente en presencia (verde) o ausencia (rojo) de exudados. En los casos en que una enzima está representada por más de una flecha, se representa el análisis de cada una de las subunidades de la enzima.

enzimas que permiten la conversión de piruvato en acetil-CoA, las enzimas del ciclo de Krebs y la de las vías del ciclo del glioxilato (Figura 38 y 39). La expresión de estas vías sugiere que la bacteria en condición sin exudados posee una expresión basal del metabolismo de carbohidratos, probablemente porque se encuentra en una fase de latencia (no crece). Sin embargo, en presencia de exudados se sobreexpresan algunas enzimas, sugiriendo que la célula se encuentra activa y metabolizando carbohidratos con el fin de obtener energía y poder reductor, así como intermediarios para la biosíntesis de nuevas moléculas.

En particular en el ciclo de Krebs se observaron algunos pasos con enzimas que presentaron un cambio de expresión en las condiciones evaluadas (Figura 39), sugiriendo que en presencia de exudados la cepa UYSO10 está acumulando principalmente succinato y succinil-CoA, los cuales probablemente sean utilizados como intermediarios para la síntesis de nuevas moléculas. En particular, en *G. diazotrophicus* crecida en cocultivo con caña de azúcar se observó la expresión exclusiva de la enzima Succinil-CoA ligasa (170). Los autores hipotetizaron que el acúmulo de succinato en la célula podría asociarse a la producción de EPS y ciertos succino-glicanos, los cuales han sido reportados como participantes en el establecimiento de asociaciones bacteria-planta. Es posible, que este sea también el caso de la cepa UYSO10, la cual, a partir del censado de los exudados radiculares, produzca EPS y se prepare para la interacción con la planta. En estas condiciones también se observa la sobreexpresión de la primera enzima en la vía de biosíntesis de los ácidos grasos (Figura 38). La estimulación de esta vía podría también estar relacionada con un cambio en la membrana celular y por ende repercutir en una posible interacción con la planta.

En relación con el metabolismo energético, entre las proteínas sobreexpresadas en presencia de exudados, se observó la F1F0 ATPasa, enzima que utiliza el gradiente protón motriz generado para producir ATP. Esta enzima también se ha reportado sobreexpresada en *G. diazotrophicus* y en *Burkholderia* sp. Q208 en cocultivo con plantas de caña de azúcar (133, 171). El aumento de esta enzima en presencia de exudados, junto con un aumento en el metaboli-

smo de carbohidratos, sugiere una mayor producción de ATP en la célula, probablemente porque las células se encuentran creciendo (lentamente) y están activas.

Los resultados mostraron también la expresión constitutiva de la gluconeogénesis, junto con la sobreexpresión de dos de sus enzimas en presencia de exudados (Figura 38). Esta observación, junto con la represión de la síntesis de componentes estructurales como glucógeno, celulosa y sus derivados, sugiere que la cepa UYSO10 en presencia de exudados puede estar sintetizando trehalosa (Figura 40). Dado que la síntesis y almacenamiento de este disacárido puede asociarse a situaciones de estrés osmótico (172), es probable que la cepa UYSO10 detecte la presencia de la planta a partir de sus exudados preparándose para el cambio osmótico.

#### *ii-Metabolismo del N*

A pesar de que la cepa UYSO10 es diazótrofa, no se detectó la presencia de la enzima nitrogenasa, ni en la condición con ausencia de exudados, donde no había fuente de N; ni en presencia de exudados donde posiblemente exista algún compuesto nitrogenado exudado. Probablemente, la falta de expresión de la enzima se deba a la presencia de oxígeno en ambas condiciones, el cual es un inhibidor de su síntesis (31).

En términos generales, el análisis proteómico muestra que en presencia de exudados se reprimen proteínas vinculadas a la captación de diferentes fuentes nitrogenadas, sugiriendo que en estas condiciones la bacteria emplea preferentemente compuestos fácilmente asimilables y disponibles en los exudados (Figura 40). Este hecho concuerda con el crecimiento observado cuando se emplearon los exudados radiculares como fuente de N para la cepa UYSO10 (Parte II). En ese sentido, recientemente se demostró que las plantas de trigo exudan un gran número de compuestos con N orgánico, incluyendo aminoácidos, aminos y poliaminas, compuestos de amino cuaternario, nucleobases y nucleosidos (173).

Por su parte, los transportadores de diferentes compuestos nitrogenados reprimidos en presencia de exudados están involucrados con el transporte de poliaminas del tipo putrescina, nitrato, glutamato, dipéptidos, urea, incluyendo dos enzimas necesarias para su degradación; así como

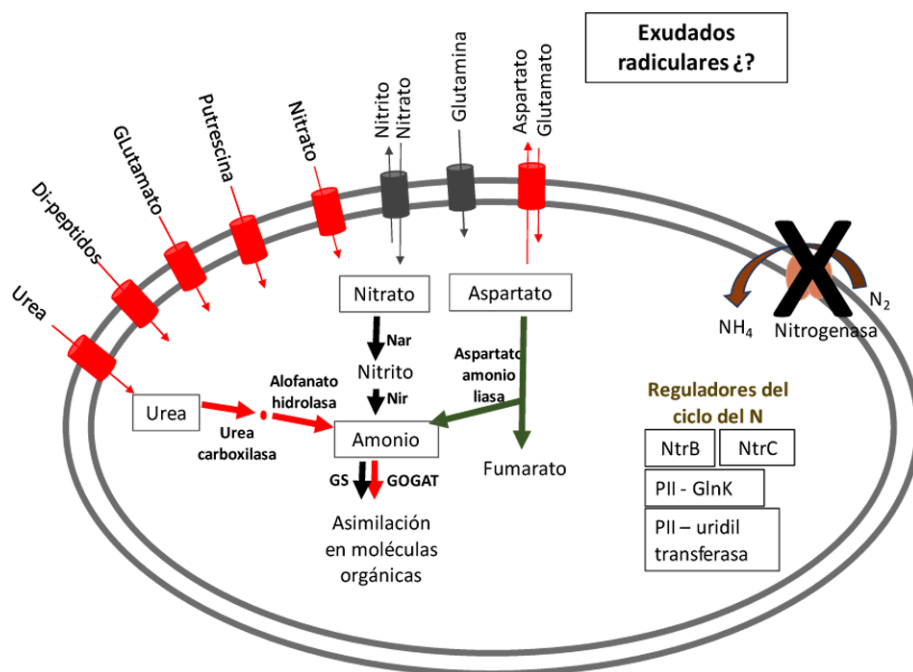
enzimas involucradas en la degradación del ácido 4-aminobutanoico. La represión de dichos transportadores concuerda con estudios previos en *E. coli*, la cual al ser crecida con fuentes de N de fácil asimilación reprime los transportadores mencionados (174). Particularmente en el caso del transportador de urea, mediante la metodología de nano LC-MS/MS, se pudo determinar que las concentraciones globales del transportador disminuyeron en presencia de exudados. Sin embargo, mediante la técnica de DIGE se observó el aumento significativo de tres de sus isoformas. La aparición de nuevas isoformas y por tanto de una modificación postraduccional, puede indicar que la proteína podría jugar un rol en la interacción. Esto también fue observado en *H. seropedicae* co-cultivada con plantas de trigo, desconociéndose específicamente su función (162) (De Souza *com. pers.*).

Por otra parte, el aspartato parecería estar asociado a la fuente de N presente en los exudados. Esta observación surge de la sobreexpresión de la enzima aspartato amonio liasa y de la represión de un transportador anti-sentido de glutamato/aspartato (Figura 40). Asimismo, esto con-

cuerda con reportes que indican que el ácido aspártico es uno de los cuatro ácidos orgánicos más abundantes presentes en el apoplasto de plantas de caña de azúcar (175), por lo que parece lógico que pueda ser una de las moléculas exudadas por la planta. Mas aún, previamente se demostró que la cepa UYSO10 puede usar asparagina como fuente de N (126).

Por último, los resultados parecen indicar que en ambas situaciones la bacteria está asimilando alguna fuente de nitrato el cual es convertido en amonio, para luego ser incorporado a formas orgánicas mediante las enzimas de expresión constitutiva glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) (Figura 40).

Particularmente, en bacterias crecidas en presencia de exudados se observó una disminución en la expresión de una de las subunidades de la GOGAT (UYSO10\_5325). Dicha enzima se encuentra vinculada a la asimilación de amonio como a la biosíntesis de glutamina, glutamato y asparagina. La disminución de la GOGAT fue también observada en *H. seropedicae* SmR1 crecida en presencia de extractos de caña de azúcar



**Figura 40.** Análisis esquemático de las posibles fuentes de N y su metabolización, identificadas en la cepa UYSO10 expuesta o no a la presencia de exudados radiculares. Las proteínas y vías marcadas con negro se encuentran expresadas de forma constitutiva, las verdes sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas.

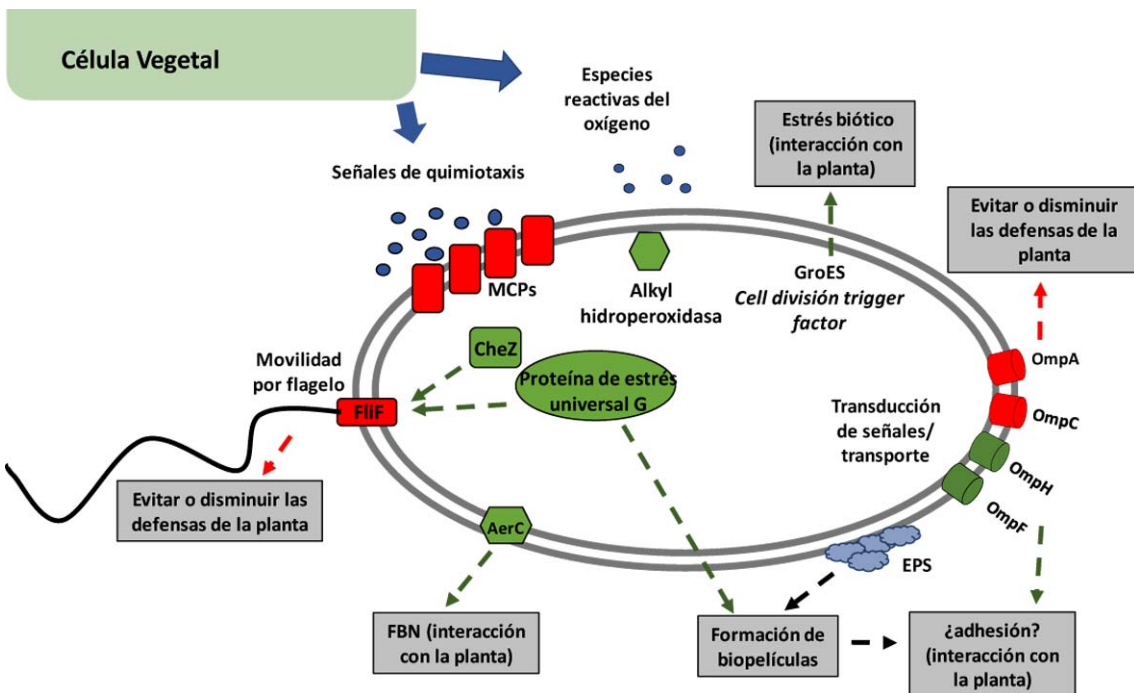
(164). En dicho trabajo los autores hipotetizan, teniendo en cuenta otros trabajos, que la expresión de dicha enzima no está regulada por amonio sino reprimida por el glutamato presente en el extracto de caña de azúcar utilizado. Si bien se demostró la presencia de ácido glutámico en el líquido apoplástico de caña de azúcar (175), esta no parece ser la situación de la cepa UYSO10 debido a que en presencia de exudados los transportadores de glutamato se encuentran reprimidos. Por otra parte, se ha reportado que en *R. etli* la actividad de la enzima GOGAT es mayor en vida libre que en simbiosis y que al realizar una mutante en el gen se observa un aumento en la secreción de amonio (176). Estos antecedentes juntamente con los resultados hacen interesante la evaluación de la actividad de la enzima GOGAT en condiciones de FBN, así como la evaluación de la capacidad de la cepa UYSO10 de excretar amonio.

iii- Movilidad y quimiotaxis

Los resultados obtenidos sugieren que, en presencia de los exudados radiculares, la bacte-

ria se encuentra en una situación más favorable donde podría asentar una población y no requiere de buscar mejores condiciones mediante su movimiento. Esta observación se desprende del hecho de que en presencia de exudados se sobreexpresa la proteína de estrés universal G, asociada en *E. coli* con la formación de autoagregados y la disminución de la movilidad por *swimming* (177); así como la proteína CheZ, cuya función es reprimir la quimiotaxis (Figura 41). A su vez, en dichas condiciones se reprimen la proteína estructural del flagelo FliF y cuatro *methyl-accepting chemotaxis proteins* (MCP).

La represión de genes vinculados a la síntesis del flagelo en bacterias asociadas a plantas ha sido postulada como una estrategia para disminuir las defensas de la planta, debido a que la flagelina es un MAMP (160, 163, 165, 171). Sin embargo, la inhibición del flagelo no es universal, por ejemplo, en *H. seropedicae* SmR1 creciendo en presencia de extractos de caña de azúcar, se observó la sobreexpresión de la flagelina (164). En este caso, los autores sugieren que existe una



**Figura 41.** Ilustración de las proteínas identificadas y asociadas a la envoltura celular, transducción de señales, movilidad y adhesión en la cepa UYSO10 en presencia de exudados radiculares. Las proteínas marcadas con verde se encuentran sobreexpresadas en presencia de exudados y las rojas reprimidas. Finalmente, en recuadros grises se indica una posible función de los cambios proteicos evidenciados.



fina regulación en la síntesis del flagelo en la interacción planta-bacteria, debido a que el flagelo también ha sido asociado a la colonización vegetal y a la formación de biopelículas. En nuestro modelo, la inhibición del flagelo podría sugerir que la bacteria intenta evadir las defensas vegetales.

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

#### iv- Envoltura celular

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

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa UYSO10 presentó grandes cambios en la expresión de proteínas asociadas a la biogénesis y estructura de la envoltura celular, sugiriendo una fuerte reorganización de esta y por tanto la adaptación a la presencia de exudados radiculares (Figura 41). Posiblemente, algunos de estos cambios se asocien a una potencial interacción compatible con la planta percibida por la bacteria, los cuales han sido reportados en otras BPCV creciendo en co-cultivo con plantas (180, 181).

En presencia de exudados se identificaron sobreexpresados el canal OmpF y la chaperona OmpH. La primera ha sido identificada como una de las proteínas sobreexpresada con mayor tasa de cambio en *P. putida* cultivada en presencia de exudados de plantas de canola, sugiriéndose que está involucrada en el transporte de la molécula de ACC, o la adhesión de la bacteria a la pared celular (163). Teniendo en cuenta que la cepa

UYSO10 no posee la enzima ACC desaminasa (Beracochea en preparación), sería interesante evaluar si OmpF esta involucrada en la adhesión a la superficie vegetal.

En cuanto a OmpH, la misma pertenece a la familia inmunogénica de porinas que permiten el pasaje de pequeñas moléculas a través de la membrana, actuando también como receptor y chaperona manteniendo la solubilidad de otras proteínas de membrana (133). Esta proteína fue identificada sobreexpresada en la cepa *G. diazotrophicus* en co-cultivo con caña de azúcar sugiriéndose su posible rol tanto estructural como regulatorio (133).

Por otro lado, varias proteínas estructurales (OmpC, OmpA, SecE y TolB), así como asociadas a la biogénesis de la membrana (YaeT, MsbA, LpoA y proteínas asociadas a la síntesis y transporte de LPS), se encuentran reprimidas en presencia de exudados. Muchas de ellas han sido descritas como antígenos inmunogénicos por lo que su represión podría estar vinculada a evitar la activación del sistema inmune de la planta y así lograr una interacción compatible (182).

#### v- Chaperonas y funciones relacionadas al estrés

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

En presencia de exudados se vieron sobreexpresadas dos chaperonas vinculadas al plegado de proteínas, la *Heat shock protein* GroES y la *Cell división trigger factor* (Figura 43). Particularmente GroES, suele actuar junto con la chaperona GroEL. Esta última proteína fue detectada de manera constitutiva mediante nano LC-MS/MS, mientras que en la aproximación por DIGE, se detectó significativamente disminuida en presencia de exudados. Estas observaciones sugieren que los niveles globales no cambiaron, pero si alguna de sus isoformas. Se ha reportado para el caso de *G. diazotrophicus*, las sobreexpresiones de GroEL y GroES cuando la bacteria se crece en

co-cultivo con plantas de caña de azúcar, siendo interpretado como necesarias para la condición de estrés que significa la infección de la planta (133, 170). Asimismo, la expresión de GroEL se ha asociado en *S. meliloti* a la regulación de los genes *nod* (183). Teniendo en cuenta éstos antecedentes y los resultados obtenidos, se puede especular que estas chaperonas pueden estar involucradas en una respuesta específica a la adaptación y sobrevivencia bacteriana en las condiciones de estrés biótico que supone la interacción con la planta.

También en presencia de exudados, se identificaron como reprimidas las chaperonas vinculadas al estrés: DegQ, PpiD, RavA y una aldehído deshidrogenasa. Las mismas han sido reportadas como involucradas en procesos tales como la degradación de agregados de proteínas de membrana externa plegadas erróneamente y la metabolización de aldehídos, por lo que se podría especular que las mismas estén asociadas a la situación de estrés nutricional existente, cuando la bacteria se expone al medio MS.

Por otro lado, la respuesta general al estrés también involucra la protección frente al daño oxidativo (184). En ese sentido, en presencia de exudados se identificó sobreexpresada una *Alkyl hydroperoxide reductase protein C* (AhpC), la cual es una oxidorreductasa involucrada en la homeostasis celular y redox (Figura 43). La sobreexpresión de esta enzima fue también observada en la cepa endófito *Burkholderia phytofirmans* creciendo endófiticamente en plantas de papa (185). Asimismo, la expresión de diversas enzimas antioxidantes ha sido observada en cepas endófitas en condiciones de co-cultivo con sus plantas huéspedes (133, 170, 186), por lo que AhpC podría actuar también en estas condiciones.

### 3.4 RESPUESTA DE LA CEPA UYSO24 A LOS EXUDADOS RADICULARES DE CAÑA DE AZÚCAR

En este análisis se integran los resultados obtenidos mediante la aproximación proteómica del tipo 2D-DIGE para la cepa UYSO24 expuesta a los exudados radiculares de cañas de azúcar micropropagadas. En el caso de la

cepa UYSO24 no se realizó una aproximación del tipo *shotgun*.

#### 3.4.1 Transporte y metabolismo de nutrientes

Los resultados obtenidos sugieren que en presencia de exudados la cepa UYSO24 adapta su proteoma para el empleo de compuestos como fuente de C y N, posiblemente presentes en los exudados. En estas condiciones la cepa está activa ya que sobreexpresó una aldolasa, la cual participa en la conversión de azúcares en energía, así como la enzima citrato sintasa del Ciclo de Krebs. Como se mencionó previamente, el Ciclo de Krebs también está activo en la cepa UYSO10, al igual que en *G. diazotrophicus* creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar donde la misma proteína mencionada también se identificó sobreexpresada (171).

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

#### 3.4.2 Chaperonas y funciones relacionadas al estrés

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

### 3.4.3 Interacción con la planta

Una de las proteínas inducidas con mayor tasa de cambio en presencia de exudados fue la subunidad menor de la acetolactato sintasa. Esta enzima es la primera en la biosíntesis de leucina, valina e isoleucina, la cual, bajo condiciones limitantes de oxígeno, cataliza el primer paso para la conversión de 2 piruvatos a acetoina y 2,3-butanodiol (187). La inducción de esta enzima se ha reportado en BPCV como *B. amyloliquefaciens* FZB42 en presencia de exudados (188). Particularmente en las cepas *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a, se ha demostrado que la producción de acetoina y 2,3 butanodiol induce la resistencia sistémica inducida (189), postulándose también que dichos compuestos podrían modular el desarrollo radicular (26). Asimismo, en *G. diazotrophicus*, se observó que los genes para la síntesis del 2,3 butanodiol, son expresados en presencia de sacarosa (190) Teniendo en cuenta estos reportes, se podría especular que la producción de acetoina y 2,3 butano-

diol por la cepa UYSO24, esté involucrada en alguno de los mecanismos por los cuales esta cepa promueve el crecimiento de plantas de caña de azúcar y que su inducción se realice en etapas tempranas de la interacción.

Por otro lado, en presencia de exudados se sobreexpresó la proteína asociada a la invasión, locus B (*ialB*). Esta proteína ha sido bien caracterizada en el patógeno humano *Bartonella bacilliformis*, donde se le ha asignado un rol directo en el parasitismo de los eritrocitos, específicamente asociado a la capacidad de adhesión a los mismos (191). Asimismo, se observó que la expresión del gen *ialB* respondía a señales ambientales como la temperatura, pH y estrés oxidativo (192). Posteriormente, el gen *ialB* se ha detectado en otros Rhizobiales además de *Bartonella*, incluyendo varios géneros de rizobios (172, 193), sin embargo, no se han realizado estudios funcionales en bacterias benéficas. Por lo antedicho, sería interesante estudiar el rol de esta proteína en la adhesión a las células vegetales y en la interacción planta-bacteria.

## PARTE 4:

# Estudio del rol de la fijación biológica del N<sub>2</sub> en la promoción del crecimiento vegetal de caña de azúcar por la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10

### 4.1 HIPÓTESIS

La fijación biológica del nitrógeno es uno de los mecanismos responsables de la promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar detectada en la cepa UYSO10.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Construir mutantes en los genes *nifH* y *anfH* de la cepa UYSO10, así como las cepas complementantes correspondientes.
- 2) Caracterizar *in vitro* e *in vivo* las cepas obtenidas.

### 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.3.1 Estrategia general

Análisis bioinformáticos determinaron que el genoma de la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10 presenta dos operones codificantes para la enzima nitrogenasa, el clásico operón *nifHDK* y el alternativo *anfHDGK* (Beracochea en preparación). En este capítulo se realizaron mutaciones dirigidas con el fin de eliminar los genes estructurales *nifH* y *anfH* de ambos operones y estudiar el fenotipo de las mutantes obtenidas *in vitro* e *in vivo* en interacción con la planta.

#### 4.3.2 Construcción de la cepa mutante derivada de UYSO10 desprovista de los genes *nifH* y *anfH*

Para la generación de cepas mutantes en los genes *nifH*, *anfH* y la doble mutante UYSO10  $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$  o  $\Delta\Delta$ , se decidió eliminar completamente el marco de lectura abierto (orf) de cada uno de estos genes adaptando el método descrito por Martínez-García y de Lorenzo (2012) (194, 195). En este método se emplea el mecanismo de recombinación y reparación del ADN para quitar un fragmento de ADN deseado, sin dejar «cicatrices» o marcas en el genoma modificado. Asimismo se generaron las cepas complementantes en todas las mutantes obtenidas, mediante la incorporación en *trans* de un plásmido conteniendo los genes mutados de acuerdo a los protocolos ya establecidos en el laboratorio (194, 195).

#### 4.3.3 Caracterización de la cepa UYSO10 y las mutantes obtenidas

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

Por otro lado, la caracterización *in vivo* consistió en la evaluación de la respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa

parental y las diferentes mutantes, en ensayos en cuarto de plantas con luz y temperatura controlada.

#### 4.3.3.1 Evaluación de la capacidad de las cepas en estudio, de crecer en medio de cultivo rico (condiciones de no FBN)

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

#### 4.3.3.2 Evaluación de la actividad nitrogenasa en las diferentes cepas en estudio

La actividad nitrogenasa se evaluó mediante el ensayo de ARA (196). Para esto las cepas a evaluar fueron crecidas en viales conteniendo 12 ml de medio de cultivo NFCC semisólido (Anexo A) y variaciones del mismo. Las variantes evaluadas buscaron simplificar el medio de cultivo de forma que presentará una única fuente de carbono (ácido málico o sacarosa 0,5 % (p/v)), así como una única fuente de N (glutamato 0,05 mM). También se evaluaron el medio de cultivo NFCC sin modificar líquido y sin Mo, de forma de evaluar si la presencia del Mo afecta la funcionalidad de la enzima nitrogenasa codificada por los genes *nif*. Para todas las pruebas realizadas se inocularon en el centro del vial 100  $\mu$ l de una suspensión obtenida a partir de un cultivo crecido toda la noche en medio LB<sub>Amp</sub>, LB<sub>AmpKm</sub> y LB<sub>AmpGm</sub>, según correspondiese, conteniendo  $1 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  células lavadas con NaCl 0,9 % (p/v). Asimismo, se evaluó el efecto del agregado o no de los antibió-

ticos en los medios de cultivo. A los 4 días de incubación a 30 °C, el tapón de algodón del vial se cambió por uno de goma, se sustituyó el 10% del volumen atmosférico del vial por gas acetileno (1 ml) y se incubó por 72 h a 30 °C. Posteriormente, muestras de 8  $\mu$ l de la parte gaseosa de cada vial fueron inyectadas en un cromatógrafo de fase gaseosa con detector de llama ionizante (GC-Fid) (GC-2010 Plus, Shimadzu), equipado con una columna TG-Bond (30 m x 0,32 mm ID x 10  $\mu$ m) (Thermo Scientific). Como gas transportador se empleó N<sub>2</sub>, empleándose una temperatura de columna y de detector de 35 y 150 °C, respectivamente. Cada cepa evaluada se ensayó por quintuplicado y se empleó como control negativo viales conteniendo el medio de cultivo evaluado sin inocular.

#### 4.3.3.3 Evaluación de la respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las diferentes mutantes

Plantas de caña de azúcar micropropagadas de la var. LCP de similar tamaño y en etapa de enraizamiento, fueron colocadas asépticamente en frascos conteniendo 40 ml de medio de cultivo MS 1/10 sin N (88), a razón de cuatro por frascos. A los tres días, los frascos que no presentaron contaminación visible fueron inoculados con  $1 \times 10^7$  células/planta de la cepa parental o con cada una de las mutantes (168). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 10 réplicas por tratamiento. Diez días posteriores a la inoculación, las plantas fueron trasplantadas a macetas conteniendo 1,5 kg de tierra:arena (2:1). La tierra utilizada provino de predios de la empresa ALUR en Bella Unión, Artigas. La misma presenta la característica de poseer una tradición en plantación de caña de azúcar sin el agregado de fertilizantes. Una muestra de la mezcla utilizada fue enviada para su análisis fisicoquímico al Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de INIA La Estanzuela. Dichos análisis mostraron un bajo porcentaje de N, lo que posibilita la realización de este tipo ensayo (Tabla 20).

**Tabla 20.** Análisis fisicoquímico del suelo utilizado en el ensayo de respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con las cepas UYSO10 parental y mutantes.

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

A los 15 días posteriores a la inoculación se realizó una segunda inoculación como fue descrito previamente. Las plantas fueron mantenidas en cuarto de plantas con un fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad a 26 °C y regadas con agua de la canilla según necesidad. El ensayo se cosechó a los 4 meses pi, donde se evaluaron las variables biométricas: altura de la planta, diámetro del tallo, peso seco de la parte aérea y peso seco radicular. La parte aérea se envió para análisis de N-total por el método de Kjeldahl (197) al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía, UdelaR.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa Infostat aplicando un análisis de varianza paramétrico o no paramétrico según correspondiese, con un  $p \leq 0,05$  (198). En caso de obtenerse diferencias significativas, las medias de los tratamientos fueron comparadas usando la prueba de Tukey o Kruskal-Wallis, según los datos tuviesen una distribución paramétrica o no paramétrica respectivamente.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Caracterización *in vitro* de las cepas UYSO10 parental y mutantes

Con el fin de evaluar si las mutaciones realizadas afectaron la capacidad de crecimiento de las cepas mutadas, se evaluó el crecimiento de las mismas, así como la de la cepa parental, en medio de cultivo rico LB (condiciones de no FBN), en el tiempo (Figura 42). Los resultados mostraron que no existen diferencias en el crecimiento o entre las cepas mutadas y la parental en las condiciones ensayadas.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la enzima nitrogenasa en la cepa parental y las diferentes mutantes, se realizaron ensayos de reducción del acetileno. En los mismos se evaluó la actividad de la enzima nitrogenasa en los medios de cultivo NFCC y NFCC modificado, utilizando una única fuente de C (sacarosa o ácido málico) y como fuente de N glutamato. Asimismo, se evaluó mediante esta metodología

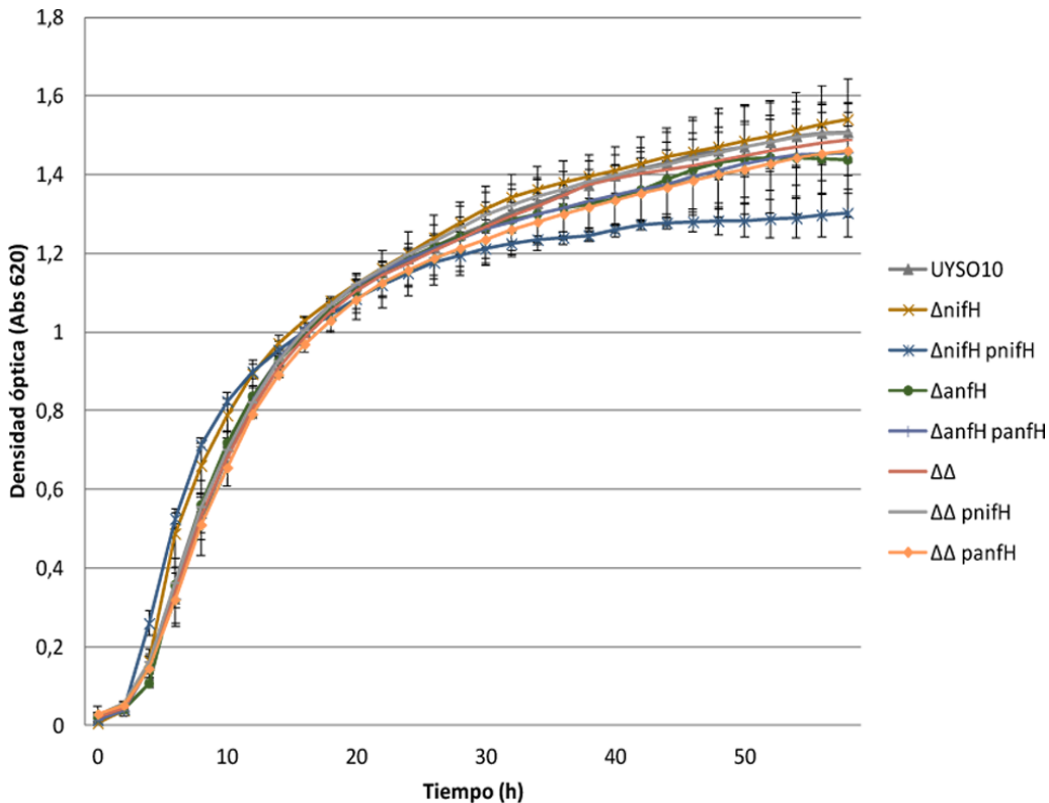


Figura 42. Curvas de crecimiento en medio de cultivo LB, de la cepa UYSO10 y las diferentes mutantes.

el efecto del número de células inoculadas, el uso de antibióticos, así como el empleo de medio de cultivo líquido. Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas, con excepción de la doble mutante, presentaron actividad nitrogenasa en la mayoría de las condiciones. Asimismo, el agregado de antibióticos en el medio de cultivo no mostró diferencias en la actividad de la enzima, sin embargo, el inocular el vial con  $1 \times 10^7$  células/vial mostró una mayor actividad enzimática, que el inocular con  $1 \times 10^8$  células.

A modo de conclusión, los resultados mostraron que la mejor condición ensayada fue cuando se utilizó un inóculo de  $1 \times 10^7$  células en medio de cultivo NFCC (sin modificar) líquido y sin el agregado de antibióticos. En dicha condición se observó producción de etileno en la cepa parental y en las mutantes excepto en la doble mutante (Tabla 21). Finalmente se realizó un último ensayo de reducción de acetileno utilizando el medio de cultivo NFCC sin el agregado de molibdeno. Los resultados mostraron el mismo patrón mencionado en el cual, la única cepa que no fue capaz de reducir acetileno fue la doble mutante (Tabla 21).

**Tabla 21.** Actividad nitrogenasa de la cepa UYSO10 parental y las mutantes.

Cepa	NFCC (+Mo 9, 1 $\mu$ M)	NFCC (-Mo)
	Producción de etileno	
UYSO10	+	+
$\Delta nifH$	+	+
$\Delta nifH$ <i>pnifH</i>	+	+
$\Delta anfH$	+	+
$\Delta anfH$ <i>panfH</i>	+	+
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$	-	-
$\Delta nifH$ - $\Delta anfH$ <i>pnifH</i>	+	+

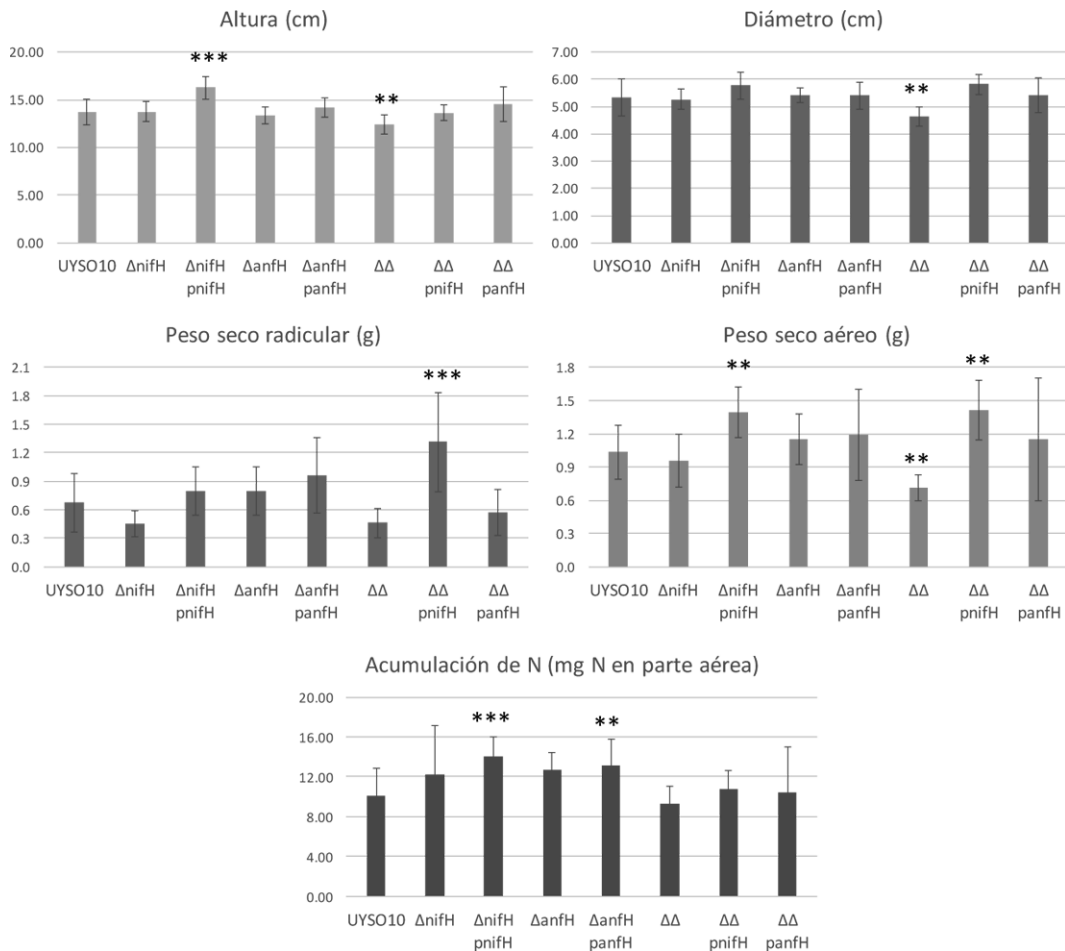
#### 4.4.2 Caracterización *in vivo* de las cepas UYSO10 parental y mutantes

Con el objetivo de evaluar el papel de la FBN en la interacción planta-bacteria, se realizó un ensayo de respuesta de plantas de caña de azúcar micropropagadas a la inoculación con las cepas UYSO10 parental y las diferentes mutantes. El mismo se realizó bajo condiciones controladas, en un sistema donde previamente se reportó la promoción del crecimiento vegetal por la cepa UYSO10 (126, 168).

El análisis estadístico de los parámetros biométricos evaluados, mostraron que la inoculación con las cepas UYSO10  $\Delta nifH$  y UYSO10  $\Delta anfH$  (simples mutantes), no fue significativamente diferente de la inoculación con la cepa parental. Sin embargo, cuando se inoculó la cepa UYSO10  $\Delta nifH$  *pnifH* (doble mutante), se observó un aumento significativo del crecimiento de las plantas de caña de azúcar en un 19 % en la altura, 8 % en el diámetro y un 40 % en la acumulación de N, mientras que al inocular con la cepa UYSO10  $\Delta anfH$  *panfH* se registró un aumento de un 30 % en la acumulación de N. Por otro lado, la inoculación con UYSO10  $\Delta nifH$ - $\Delta anfH$  ( $\Delta\Delta$ ), mostró una disminución significativa del crecimiento en un 9 % en la altura, 13 % en el diámetro y un 32 % en el peso seco aéreo, en comparación con la cepa UYSO10 parental (Figura 43 y 44). Asimismo, la respuesta de las plantas a la inoculación con las cepas UYSO10  $\Delta\Delta$ , conteniendo en plásmidos el promotor y el gen *nifH* ( $\Delta\Delta$  *pnifH*) o *anfH* ( $\Delta\Delta$  *panfH*), mostraron una recuperación del efecto promotor del crecimiento vegetal (Figura 43 y 44).



**Figura 43.** Vista del ensayo de PCV de plantas de caña de azúcar inoculadas con las cepas UYSO10 parental y mutantes, a los 3 meses pi.



**Figura 44.** Respuesta de plantas de caña de azúcar a la inoculación con la cepa parental y las mutantes en las enzimas nitrogenasas. Con asteriscos se indican los tratamientos que difieren significativamente del tratamiento inoculado con la cepa UYSO10 (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,01$ ).

## 4.5 DISCUSIÓN

### 4.5.1 FBN en gramíneas por endófitos diazótrofos

El estudio de BPCV asociadas a gramíneas, ha aumentado considerablemente a nivel mundial, buscándose extender los conocimientos de la FBN muy estudiada en leguminosas (199). Varios endófitos PCV han sido descritos como biotecnológicamente promisorios, siendo la FBN y la producción de fitohormonas, los principales mecanismos reportados como responsables de la promoción (42, 184, 200, 201).

Mediante el empleo de técnicas isotópicas del  $^{15}N$ , se ha demostrado que diversos cultivos de gramíneas son capaces de adquirir parte de su N

nutricional a partir de la FBN. En particular, para el cultivo de caña de azúcar, se calculó que el N proveniente de la FBN puede alcanzar hasta un 60 % en variedades cultivadas en Brasil y entre 34-59 % en variedades cultivadas en Uruguay (71, 199). Asimismo, la expresión de la nitrogenasa por bacterias endófitas en los tejidos internos de las plantas hospederas, se ha confirmado mediante diferentes aproximaciones, incluyendo: i) la presencia y/o cuantificación de transcritos del gen *nifH*, ii) la construcción de fusiones de genes o de promotores con genes reporteros, iii) inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra la enzima nitrogenasa y iv) técnicas isotópicas del  $^{15}N$  aplicadas a plantas inoculadas con una bacteria, en condiciones controladas (202–207).



Con la finalidad de poder determinar el rol de la FBN en la promoción del crecimiento vegetal, se construyeron en las cepas endofíticas diazotróficas *G. diazotrophicus* Pal5, *K. pneumoniae* 342 y *Azoarcus* sp. BH72, mutantes *knockout* en genes codificantes para la enzima nitrogenasa, particularmente en los genes estructurales *nifD*, *nifH* y *nifK* respectivamente (115, 202, 208). En los casos mencionados, mediante ensayos de respuesta de las plantas hospederas a la inoculación con las cepas parental y las mutantes, se pudo demostrar que la FBN es al menos en parte, responsable de la PCV observada, cuando se evaluó los parámetros biométricos altura, ancho de tallo, peso seco y el N incorporado. Tanto para la cepa *G. diazotrophicus* como para *K. pneumoniae* se evaluó también la colonización de las plantas por las cepas parentales y mutantes, no observándose diferencias significativas y sugiriendo que las mutaciones no afectaron la capacidad colonizadora de las bacterias. Es de destacar que, en todas las cepas nombradas, la única nitrogenasa presente es del tipo MoFe-nitrogenasa, y que en ninguno de estos estudios se realizó la construcción de la cepa mutada *nif* con la complementación posterior del gen eliminado en *trans* (complementante).

#### 4.5.2 Nitrogenasas

La nitrogenasa es la enzima encargada de la reducción del dinitrógeno a amonio. La misma posee dos componentes proteicos generalmente denominados como la proteína Fe y la proteína MoFe. Estos términos hacen referencia a la composición metálica de los grupos prostéticos que contienen dentro cada componente proteico. Todos los diazótrofos conocidos poseen la MoFe-nitrogenasa y algunos poseen además una o las dos nitrogenasas llamadas «alternativas»: la VFe-nitrogenasa y la FeFe-nitrogenasa (209). A pesar de las diferencias en su contenido en metales, estos subtipos son estructuralmente similares y se encuentran filogenéticamente relacionados. Sin embargo, la eficiencia de la MoFe-nitrogenasa es mayor, porque requiere de menos moléculas de ATP y menor poder reductor por molécula de N<sub>2</sub> fijada (33). Por ser la MoFe-nitrogenasa universal, la primera en ser descubierta y ser más eficiente, ha sido el subtipo más estudiado. Se

postula que el tamaño de la población de diazótrofos equipados únicamente con la MoFe-nitrogenasa supera en varios ordenes de magnitud a aquellos que contienen a su vez nitrogenasas alternativas (209). Por estos motivos, han sido pocos los trabajos que buscaron comprender el rol de las nitrogenasas alternativas.

El organismo modelo más estudiado por poseer las 3 variantes de nitrogenasas ha sido *A. vinelandii*. Estudios en este organismo han demostrado una regulación jerárquica por disponibilidad de metales, donde en presencia de Mo, se expresa la MoFe-nitrogenasa y se reprimen las otras formas. En ausencia de Mo y presencia de V, se expresa la VFe-nitrogenasa y solo en ausencia de ambos metales lo haría la FeFe-nitrogenasa (210, 211). Esta regulación fisiológica de según la disponibilidad de metales ha sido entendida como de optimización del proceso por parte del organismo (33). En el mismo sentido, en la cepa *Rhodobacter capsulatus* que posee la MoFe- y FeFe-nitrogenasa, la cepa mutante  $\Delta$ nifHDK (FeFe-nitrogenasa funcional), no pudo crecer de forma diazotrófica o expresar los genes *anf* en concentraciones de Mo > 10 Nm (212). Curiosamente esta represión de las nitrogenasas alternativas en *A. vinelandii* se observa solamente a temperaturas mayores a 15 °C y no por debajo (213), sugiriendo que la temperatura puede ser otro factor de regulación. A partir de estas observaciones, surge una de las hipótesis de la existencia de las nitrogenasas alternativas, la cual postula que las mismas están especializadas para ser activas en ambientes específicos (209). Sin embargo, en aparente contradicción, la VFe- y FeFe-nitrogenasa están presentes en organismos que habitan diversos ambientes desconociéndose su real contribución (214).

Por otro lado, a partir de estudios transcriptómicos realizados en *A. vinelandii* y *Rhodospseudomonas palustris*, se comprobó que cuando se expresan las nitrogenasas alternativas, se observa un gran aumento de los genes de adquisición de nitrógeno (210, 215). Entre los genes sobreexpresados se encuentran los asociados al transporte de compuestos nitrogenados y al acceso de N fijado. De esta forma, se hipotetizó una nueva forma de regulación de las enzimas alternativas, sugiriendo que su expresión podría responder a

los niveles de falta de N fijado, en vez de ser una respuesta directa a la presencia de metales (215).

Actualmente, mediante estudios de genómica comparativa se ha propuesto que la presencia de nitrogenasas alternativas no se encuentra tan restringida como se ha sugerido (216). A su vez, un nuevo método llamado ISARA (*Isotopic acetylene reduction assay*), ha sido desarrollado para discriminar la actividad de cada subtipo de nitrogenasa (214). Al aplicar esta técnica, se pudo comprobar que las nitrogenasas alternativas contribuyen significativamente a la FBN en muestras ambientales (214, 216).

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

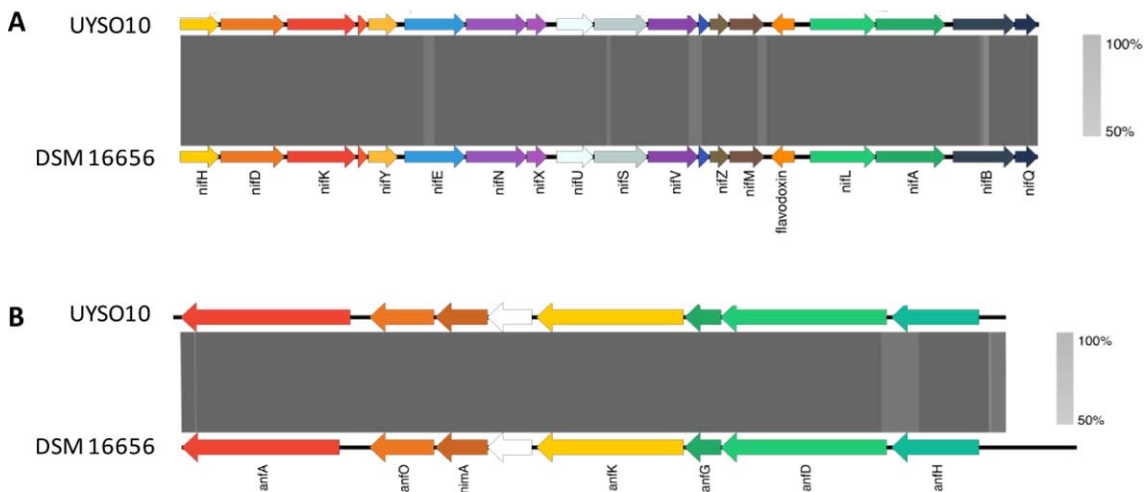
### 4.5.3 Caracterización de las nitrogenasas presentes en la cepa UYSO10

Mediante el ensayo de reducción de acetileno, se determinó previamente que la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10, presenta la capacidad de fijar biológicamente el N<sub>2</sub> atmosférico *in vitro* (71). Asimismo,

estudios bioinformáticos determinaron la presencia en el genoma de 2 operones que codifican para las enzimas MoFe- y FeFe-nitrogenasa (Figura 45) (Beracochea en preparación). Con el objetivo de evaluar el efecto de la FBN en la capacidad PCV observada para esta cepa y el papel que juega cada subtipo de nitrogenasa en el mismo, se construyeron y caracterizaron mutantes individuales y dobles por delección de uno de los genes estructurales de cada nitrogenasa, *nifH* y *anfH*.

Los resultados obtenidos demostraron que la reducción de acetileno se detectó en todas las condiciones ensayadas exceptuando en la doble mutante  $\Delta nifH-\Delta anfH$ , lo que confirma que solo la delección de ambos genes estructurales impide la FBN. Observaciones similares fueron reportadas en *Rhodopseudomonas palustris*, diazótrofo que posee 3 nitrogenasas, donde mutantes capaces de expresar una única nitrogenasa fijaron el N<sub>2</sub> atmosférico, pero no lo hizo la triple mutante ( $\Delta nifH\Delta vnfH\Delta anfA$ ) (215). Asimismo, en nuestro modelo de estudio, la inhibición de la FBN se revirtió tras la complementación *in trans* con un plásmido conteniendo el gen *nifH* o *anfH* con sus promotores correspondientes.

Los resultados obtenidos también demostraron que la actividad de la FeFe-nitrogenasa no es inhibida por la presencia de Mo (9,1 μM), ni tampoco se observó un aumento de su actividad



**Figura 45.** Arreglo genómico de los genes que codifican para la MoFe-nitrogenasa y FeFe-nitrogenasa en la cepa UYSO10 y su comparación con la cepa *K. radicincitans* DSM16656<sup>T</sup>. **A.** Comparación del operón *nif*. **B.** Comparación del operón *anf*. Para su construcción se utilizó la homología de secuencia a nivel de aminoácidos. La figura fue gentilmente cedida por Martín Beracochea (Beracochea en preparación).

al disminuir la concentración de dicho metal. Si bien, puede que la presencia de Mo ejerza una inhibición de la enzima a mayores concentraciones, este no parece ser el caso, ya que concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y 10 nM inhibieron la expresión de las nitrogenasas alternativas en los diazótrofos *A. vinelandii* y *R. capsulatus*, respectivamente (211, 212). Un caso similar al aquí observado fue reportado en el diazótrofo *R. palustris*, donde una cepa mutante en la MoFe-nitrogenasa, creciendo diazotróficamente en presencia de una sal de Mo (15 nM a 100  $\mu\text{M}$ ), expresó la VFe- y FeFe-nitrogenasa, según la disponibilidad de V en el medio de cultivo (215). Esta observación también se realizó en *Rhodospirillum rubrum*, donde la bacteria sintetizó la FeFe-nitrogenasa en presencia de Mo, cuando la MoFe-nitrogenasa no podía ser expresada de forma funcional (217).

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

Recientemente se publicó un artículo muy similar al trabajo aquí realizado. En el mismo se construyeron a partir de la cepa *K. radicincitans* DSM16656<sup>T</sup> las mutantes  $\Delta nifH$ ,  $\Delta anfH$  y  $\Delta anfH\text{-}\Delta nifH$ , las cuales fueron evaluadas en su capacidad de FBN, mediante la medición del contenido de N e incorporación de <sup>15</sup>N. Los resultados mostraron la contribución de N de la MoFe-nitrogenasa, pero no de la FeFe-nitrogenasa, bajo las condiciones ensayadas (218). También evaluaron disminuir la cantidad de Mo del medio de cultivo de 230  $\mu\text{M}$  a 0,4  $\mu\text{M}$ , sin observar efecto sobre la FeFe-nitrogenasa. Es muy interesante resaltar que si bien la cepa DSM16656<sup>T</sup> posee un 98.91% de similitud a nivel genómico con la cepa UYSO10 y ambas poseen el mismo arreglo genómico de los operones *nif* y *anf* con casi un 100 % de identidad en la secuencia de aminoácidos (Figura 45) (Beracochea en preparación), los resultados obtenidos por dichos autores son diferentes a los obtenidos por nuestro grupo. Entre las posibles causas para explicar esta situación se podrían enumerar i) la existencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para la FeFe-

nitrogenasa, que impidan la actividad en la cepa DSM16656, ii) que la mutante  $\Delta nifH$  construida por Ekanjo y colaboradores tenga algún efecto sobre la FeFe-nitrogenasa o iii- la diferencia provenga del medio de cultivo y condiciones de crecimiento ensayadas.

En su conjunto los resultados muestran falta todavía conocer como es la regulación de los subtipos de nitrogenasas en *Kosakonia* sp. UYSO10, aunque todo sugiere que no es únicamente por la disponibilidad de metales (Mo, V).

#### 4.5.4 La FBN es responsable en parte de la PCV de cañas de azúcar inoculadas con la cepa UYSO10

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

El género *Kosakonia* ha sido recientemente definido a partir de un grupo de cepas anteriormente clasificadas como pertenecientes a el género *Enterobacter* (74). Dichas cepas han sido principalmente reportadas como asociadas a plantas y se las ha descrito como promotoras del crecimiento vegetal (166, 219–223). En particular, las cepas *Kosakonia* sp. NN145S y NN143E mostraron ser capaces de promover el crecimiento vegetal de plantas de caña de azúcar micropropagadas y se demostró, mediante ensayos de dilución isotópica del <sup>15</sup>N que la FBN era uno de los mecanismos actuantes (224). En otro trabajo, la cepa *Kosakonia* sp R4-368, aislada de plantas de *Jatropha curcas*, mostró ser capaz de reducir acetileno y promover el crecimiento vegetal de dicha planta (225). Estudios bioinformáticos realizados por estos autores concluyeron que el genoma de esta cepa posee únicamente el operon *nif*. Al realizar mutantes *knockout* en los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* por separado, observaron que las cepas mutadas perdían la capacidad de

reducir el acetileno y de promover en parte el crecimiento vegetal. Asimismo, los autores observaron que las poblaciones de la cepa parental y mutantes que colonizaron las plantas fue similar, por lo que las mutaciones no estarían afectando la colonización de la planta por la bacteria (225). Por otro lado, en las cepas *K. radicincitans* DSM16656<sup>T</sup> y UMEnt01/12, *K. oryzae* Ola51T y YD4 y *Kosakonia* sp. NN145S y NN143E, se ha descrito la presencia de la Mo- y la FeFe-nitrogenasa (218, 224, 226). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el efecto de cada nitrogenasa en la planta, mediante la construcción y evaluación de cepas mutantes.

En los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de cepas pertenecientes al género *Kosakonia* y su interacción con las plantas. En ese sentido han sido varios los reportes de promoción del crecimiento de diversos cultivos por la inoculación de cepas de este género, realizados en condiciones de invernáculo y campo (20, 166, 227) señalándose en algunos casos a la FBN como uno de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal [(224, 225), sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación y actividad de los subtipos de nitrogenasas que presentan. En el presente trabajo, observamos que tanto la MoFe-nitrogenasa como la FeFe-nitrogenasa son funcionales y se encuentran activas *in vitro*. Curiosamente, la FeFe-nitrogenasa no parece estar regulada por los niveles de Mo y V en el medio de cultivo. Asimismo, los ensayos *in vivo* muestran que la FBN es uno de los mecanismos responsables de la promoción de esta cepa y que la presencia de una u otra enzima poseen el mismo efecto sobre las plantas. A partir de lo antedicho, se propone el género *Kosakonia* como un interesante modelo de estudio para seguir profundizando y evaluar la importancia de los subtipos de nitrogenasas en el contexto de la PCV.

## 5. CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Se demostraron los efectos PCV de cuatro diazotrofos, probables endófitos, al inocularse en las variedades de caña de azúcar más comunes cultivados en Uruguay en condiciones de invernáculo y campo. Estos efectos fueron diferenciales de acuerdo al genotipo de la planta, así como por el nivel de fertilización química nitrogenada, sugiriendo la posible participación de la FBN en los efectos PCV observados. Los resultados resaltan la importancia de continuar las evaluaciones de las cepas PCV de la colección como inoculantes en sistemas más complejos, ya que son los pasos necesarios y sientan las bases para su aplicación biotecnológica como bioinsumos.
- 2) Las cepas UYSO10 y UYSO24, presentan diversas características fenotípicas potencialmente involucradas en la interacción y son endófitos verdaderos de caña de azúcar.
- 3) Se descifraron parte de las proteínas involucradas en los primeros pasos de la interacción planta-bacteria. Particularmente en presencia de los exudados radiculares de plantas de caña de azúcar, ambas cepas adaptan su proteoma con la finalidad de transportar y metabolizar diferentes nutrientes y de interactuar con la planta huésped.
- 4) Se logró determinar que las nitrogenasas codificadas en el genoma de la cepa UYSO10 son funcionales y que la FBN es al menos en parte, responsable de la PCV de caña de azúcar *in vivo* por la cepa UYSO10.

En su conjunto los resultados son muy novedosos y promisorios, los cuales justifican el continuar estudiando los mecanismos moleculares imperantes en la interacción caña de azúcar-bacteria, así como en la promoción del crecimiento vegetal, conocimientos básicos necesarios para el desarrollo futuro de un bioinoculante para el cultivo en estudio.

# Anexo A:

## Medios de cultivo y soluciones

### A.1. Medios de cultivo para bacterias

#### Medio de cultivo triptona-extracto de levadura (TY) (228)

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

#### Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (229)

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

#### Medio de cultivo LGI (230)

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

#### *Solución de vitaminas*

Biotina .....	0,01 g
Pyridoxal-HCl .....	0,02 g
H <sub>2</sub> O c. s. p. 1 litro .....	

Ajustar el pH a 6,0-6,2 con solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 %.

\*Agregar el extracto de levadura solamente para los medios sólidos.

**Medio de cultivo NFCC (231)**

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

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

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

**Medio de cultivo CAS (232)**

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

*Solución colorante*

CAS.....	60,48 g
Agua desionizada.....	59 ml

*Preparación:* Agregar al medio base estéril 10 ml de glucosa 20 % estéril. Por otro lado, agregar a la solución colorante 1 ml de una solución de FeCl<sub>3</sub> (135 mg de FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O en 50 ml de una solución HCl 0,01 N). A continuación, agregar dicha solución gota a gota sobre una solución de HDTMA 72,88 mg en 40 ml de agua desionizada. Finalmente, agregar la solución resultante al medio base justo antes de armar las placas.

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

**Medio de cultivo Aleksandrov (233)**

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
Sacarosa .....	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
CaCO <sub>3</sub> .....	1,0 g
Agar .....	15,0 g
H <sub>2</sub> O c. s. p. 1 litro	
Ajustar el pH a 7,5.	

**A.2. Medio de cultivo para plantas****Medio de cultivo MS (234)**

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

**Solución de vitaminas del medio de cultivo Staba**

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

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

En esta tesis se trabajó con una modificación del medio cultivo, para ello se preparó el medio MS diluido al décimo y sin agregar la fuente de N (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ni KNO<sub>3</sub>) (124).

**A.3. Soluciones****Solución de Bradford (145)**

Disolver 100 mg de Azul Comassie G-250 en 50 mL de EtOH 95 %. A continuación, agregar 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % y agua destilada hasta 200 ml. Filtrar la solución 4-5 veces.

# BIBLIOGRAFÍA

1. **Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ.** 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends Microbiol.* **18**:365–373.
2. **Lagunas B, Schäfer P, Gifford ML.** 2015. Housing helpful invaders: the evolutionary and molecular architecture underlying plant root-mutualist microbe interactions. *J. Exp. Bot.* **66**:2177–2186.
3. **Oldroyd GED.** 2013. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**:252–263.
4. **Hartlova A, Krocova Z, Cerveny L, Stulik J.** 2011. A proteomic view of the host-pathogen interaction: The host perspective. *Proteomics* **11**:3212–3220.
5. **Knief C, Delmotte N, Vorholt J.** 2011. Bacterial adaptation to life in association with plants - A proteomic perspective from culture to in situ conditions. *Proteomics* **11**:3086–3105.
6. **Turner TR, James EK, Poole PS.** 2013. The plant microbiome. *Genome Biol.* **14**:1–10.
7. **Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM.** 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**:478–486.
8. **Wilson D.** 1995. The Evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**:274–276.
9. **Quadt-Hallmann A, Hallmann J, Kloepper JW.** 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can. J. Microbiol.* **43**:254–259.
10. **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.
11. **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.
12. **Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper J.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**:895–914.
13. **Mitter B, Petric A, Shin MW, Chain PSG, Hauberg-Lotte L, Reinhold-Hurek B, Nowak J, Sessitsch A.** 2013. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front. Plant Sci.* **4**:120.
14. **López-Fernández S, Sonogo P, Moretto M, Pancher M, Engelen K, Pertot I, Campisano A.** 2015. Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils similarities and differences between endophytes and other symbiotic bacteria. *Front. Microbiol.* **6**:419.
15. **Carvalho TLG, Balsemao-Pires E, Saraiva RM, Ferreira PCG, Hemerly AS.** 2014. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J. Exp. Bot.* **65**:5631–5642.
16. **Mercado-Blanco J.** 2015. Life of microbes inside the plant, p. 25–32. *In* Lugtenberg, B (ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture.* Springer.
17. **James E.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *F. Crop. Res.* **65**:197–209.
18. **Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, Ferreira PCG, Hemerly AS, Cheng Z, Silhavy TJ, Ruiz N, Kahne D, Rediers H, Bonnacarrère V, Rainey PB, Bonnetcarre V, Hamonts K, Vanderleyden J, Peralta H, Aguilar A, Díaz R, Mora Y, Martínez-Batallar G, Salazar E, Vargas-Lagunas C, Martínez E, Encarnación S, Girard L, Mora J, Pankiewicz VCCS, Camillos-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passeti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM, Schmid F, Biol C, Chen X, Miché L, Sachs S, Wang Q, Buschart A, Yang H, Vera Cruz CM, Hurek T, Reinhold-Hurek B, Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, Ferreira PCG, Hemerly AS,**



- Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B, Cambiaghi A, Ferrario M, Masseroli M, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankiewicz VCCS, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA, Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A, Hu J, Rampitsch C, Bykova N V, Braun M, Silhavy TJ, Lodha TD, Hembram P, Basak Nitile Tep J, Cheng Z, Duan J, Hao Y, McConkey BJ, Glick BR, Alberton D, Muller-Santos M, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Cordeiro FA, Yates MG, De Oliveira Pedrosa F, de Souza EM, Ferrari CS, Amaral FP, Bueno JCF, Scariot MC, Valentim-Neto PA, Arisi ACM. 2016. Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. *Plant Mol. Biol.* **90**:561–574.
19. Vargas L, Brígida ABS, Mota Filho JP, De Carvalho TG, Rojas CA, Vaneechoutte D, Van Bel M, Farrinelli L, Ferreira PCG, Vandepoele K, Hemerly AS. 2014. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *gluconacetobacter diazotrophicus*: A transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS One* **9**.
  20. Berger B, Brock AK, Ruppel S. 2013. Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. *Plant Soil* **370**:641–652.
  21. Oliveira ALM, Canuto EL, Silva EE, Reis VM, Baldani JI. 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian J. Microbiol.* **35**:295–299.
  22. 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.
  23. Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G. 2013. Microbial control of plant root diseases, p. 391–403. *In* de Bruijn, FJ (ed.), *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. Wiley.
  24. Spaepen S. 2015. Plant Hormones Produced by Microbes, p. 247–256. *In* Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer International Publishing, Cham.
  25. Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. 2005. Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense*-induced Lateral Root Formation in Tomato. *Planta* **221**:297–303.
  26. Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, de la Cruz HR, Macías-Rodríguez L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **51**:75–83.
  27. Patten C, Glick B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiology* **42**:207–220.
  28. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:425–48.
  29. Glick BR. 2015. Stress control and ACC deaminase, p. 257–264. *In* Lugtenberg, B (ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture*. Springer.
  30. Adesemoye AO, Kloepper JW. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**:1–12.
  31. de Bruijn FJ. 2015. Biological nitrogen fixation, p. 215–224. *In* Lugtenberg, B (ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture*. Springer.
  32. Newton W. 2015. Recent advances in understanding nitrogenases and how they work, p. 7–20. *In* de Bruijn, FJ (ed.), *Biological nitrogen fixation*. Wiley Blackwell.
  33. Poza Carrión C, Echavarrri Erasun C, Rubio LM, Poza-Carrión C, Echavarrri-Erasun C, Rubio LM. 2015. Regulation of *nif* Gene Expression in *Azotobacter vinelandii*, p. 101–107. *In* de Bruijn, FJ (ed.), *Biological nitrogen fixation*. Wiley.
  34. Barea J-M, Richardson M. 2015. Phosphate mobilisation by soil microorganisms, p. 225–234. *In* Lugtenberg, B (ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture*. Springer.
  35. 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.
  36. Bally R, Elmerich C. 2007. Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria, p. 171–190. *In* *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer Netherlands, Dordrecht.

37. **Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëne-Loccoz Y.** 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321**:341–361.
38. **Rosenblueth M, Martínez-Romero E.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:827–837.
39. **Haichar F el Z, Santaella C, Heulin T, Achouak W.** 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol. Biochem.* **77**:69–80.
40. **Rudrappa T, Biedrzycki ML, Kunjeti SG, Donofrio NM, Czymmek KJ, Paul W. P, Bais HP.** 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* **3**:130–138.
41. **Baetz U, Martinoia E.** 2014. Root exudates: The hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci.* **19**:90–98.
42. **Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD Van.** 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**:463–471.
43. **Coskun D, Britto DT, Shi W, Kronzucker HJ.** 2017. How plant root exudates shape the nitrogen cycle. *Trends Plant Sci.* **22**:661–673.
44. **Santi C, Bogusz D, Franche C.** 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* **111**:743–767.
45. **Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Camilios-Neto D, Brusamarello-Santos L, Balsanelli E, Weiss V, Baura VA, Wassem R, Cruz LM, De Oliveira Pedrosa F, Souza EM, Monteiro RA.** 2015. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. *Front. Microbiol.* **6**:491.
46. **Webster G, Jain V, Davey MR, Gough C, Vasse J, Denarie J, Cocking EC.** 1998. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant, Cell Environ.* **21**:373–383.
47. **Vanbleu E, Vanderleyden J.** 2007. Molecular Genetics of Rhizosphere and Plant-Root Colonization, p. 85–112. *In* Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Springer Netherlands, Dordrecht.
48. **Tadra-Sfeir MZ, Souza EM, Faoro H, Müller-Santos M, Baura V a, Tuleski TR, Rigo LU, Yates MG, Wassem R, Pedrosa FO, Monteiro R a.** 2011. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:2180–3.
49. **Burdman S, Dulguerova G, Okon Y, Jurkevitch E.** 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:555–561.
50. **Downie JA.** 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:150–170.
51. **Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**:526–533.
52. **Balsanelli E, Serrato R V., de Baura VA, Sasaki G, Yates MG, Rigo LU, Pedrosa FO, de Souza EM, Monteiro RA.** 2010. *Herbaspirillum seropedicae* *rffB* and *rffC* genes are required for maize colonization. *Environ. Microbiol.* **12**:2233–2244.
53. **Meneses CHSG, Rouws LFM, Simões-Araújo JL, Vidal MS, Baldani JI.** 2011. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**:1448–1458.
54. **Olivares FL.** 1997. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infeccao e colonizacao de plantas de cana-de-acucar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do genero *Herbaspirillum*. Ecologia. Tese de Doctor em Agronomia. UFRRJ.
55. **Angus A, Hirsch A.** 2013. Biofilm formation in the rhizosphere: multispecies interactions and implications for plant growth, p. 703–712. *In* de Bruijn, FJ (ed.), *Molecular microbial ecology of the rhizosphere* First. Wiley Blackwell, New Jersey.
56. **Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* **106**:169–178.
57. **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.
58. **Hurek T, Reinhold-Hurek B.** 2005. Molecular ecology of N<sub>2</sub>-fixing microbes associated with gramineous plant: hidden activities of unknown bacteria., p. 173–198. *In* Werner, D, Newton,

- WE (eds.), Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and Environment. Springer, Berlin/Heidelberg.
59. **Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM.** 2012. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil* 175–196.
  60. **Rosenblueth M, Martínez-Romero E.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. plant-microbe Interact.* **19**:827–837.
  61. **Ambrosini A, de Souza R, Passaglia LMP.** 2015. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. *Plant Soil* 193–207.
  62. **Miché L, Battistoni F, Gemmer S, Belghazi M, Reinhold-Hurek B.** 2006. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**:502–511.
  63. **Carvalho TLG, Ferreira PCG, Hemerly AS.** 2011. Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. *Trop. Plant Biol.* **4**:31–41.
  64. **Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* **105**:1141–57.
  65. **Sinclair TR, Ruffy TW.** 2012. Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. *Glob. Food Sec.* **1**:94–98.
  66. **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.
  67. **Schulz B, Boyle C.** 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **109**:661–686.
  68. **Ryan RPR, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**:1–9.
  69. **Mei C, Flinn BS.** 2010. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Pat. Biotechnol.* **4**:81–95.
  70. **Fogliata F.** 1995. Agronomía de la caña de azúcar, p. 1–10. *In* Tomo I: Tecnología, costos y producción. El graduado (Ed.), Tucumán, Argentina.
  71. **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.
  72. **Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Sicardi M, Hackembruch F, Battistoni FJ.** 2012. INFORME FINAL DEL PROYECTO: FPTA-275 Producción sustentable en caña de azúcar / : bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales. INIA Ser. FPTA-INIA.
  73. **Battistoni FJ, Sicardi M, Taulé C, Barlocco C, Mareque C, Hackembruch F.** 2012. INFORME FINAL DEL PROYECTO FPTA-275: Producción sustentable en caña de azúcar: bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales.
  74. **Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P.** 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., . *Syst. Appl. Microbiol.* **36**:309–319.
  75. **Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J.** 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* ( *Beijerinck*) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.. *Can. J. Microbiol* **24**:967–980.
  76. **Cavalcante V, Döbereiner J.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23–31.
  77. **InfoStat(2008).** InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
  78. **James EK.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *F. Crop. Res.* **65**:197–209.
  79. **Thaweenut N, Hachisuka Y, Ando S, Yanagisawa S, Yoneyama T.** 2011. Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids):

- expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. *Plant Soil* **338**:435–449.
80. **Fischer D, Pfitzner B, Schmid M, Simões-Araújo JL, Reis VM, Pereira W, Ormeño-Orrillo E, Hai B, & AH& MS& EM-R, Hartmann JIB& A.** 2012. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Soil* **356**:83–99.
81. **Silva MF, Antonio CS, Oliveira PJ, Xavier GR, Rumjanck NG, Barros Soares LH, Reis VM.** 2012. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant Soil* **356**:231–243.
82. **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.
83. **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.
84. **Oliveira ALM, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JI.** 2002. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* **242**:205–215.
85. **Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A.** 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.* **45**:106–113.
86. **Bloemberg G V, Carvajal MMC.** 2006. Microbial Interactions with Plants: a Hidden World?, p. 321–336. *In* Schulz, B, Boyle, C, Sieber, TN (eds.), *Microbial Root Endophytes*, 9th ed. Springer-Verlag, Berlin.
87. **Oliveira ALM, Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI.** 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil* **284**:23–32.
88. **Schultz N, de Moraes RF, da Silva JA, Baptista RB, Oliveira RP, Leite JM, Pereira W, de Barros Carneiro Júnior J, Alves BJR, Baldani JI, Boddey RM, Urquiaga S, Reis VM.** 2012. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **47**:261–268.
89. **Pereira W, Leite JM, Hipólito GDS, dos Santos CLR, Reis VM.** 2013. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Rev. Cienc. Agron.* **44**:363–370.
90. **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.
91. **Keyeo F, Noor O, Ai'shah, Amir HG.** 2011. The Effects of Nitrogen Fixation Activity and Phytohormone Production of Diazotroph in Promoting Growth of Rice Seedling. *Biotechnology* **10**:267–273.
92. **Zhu B, Chen M, Lin L, Yang L, Li Y, An Q.** 2012. Genome sequence of *Enterobacter* sp. strain SP1, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from sugarcane. *J. Bacteriol.* **194**:6963–4.
93. **Naveed M, Mitter B, Yousaf S, Pastar M, Afzal M, Sessitsch A.** 2014. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol. Fertil. Soils* **50**:249–262.
94. **Jha P, Kumar A.** 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb. Ecol.* **58**:179–188.
95. **Sgroj V, Cassán F, Masciarelli O, Papa MF Del, Lagares A, Luna V.** 2009. Isolation and characterization of endophytic plantgrowth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating(PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**:371–381.
96. **Ma Y, Rajkumar M, Freitas H.** 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J. Environ. Manage.* **90**:831–7.
97. **Gulati A, Vyas P, Rahi P, Kasana RC.** 2009. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter* rhizosphaerae strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Curr. Microbiol.* **58**:371–377.
98. **Shi J, Liu A, Li X, Feng S, Chen W.** 2010. Identification of endophytic bacterial strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested

- papaya fruit. J. Sci. Food Agric. **90**:227–32.
99. **Rokhbakhsh-Zamim F, Sachdev D, Kazemi-pour N, Engineer A, Pardesi KR, Zinjarde S, Dhakephalkar PK, Chopade BA.** 2011. Characterization of Plant-Growth-Promoting Traits of *Acinetobacter* Species Isolated from Rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. J. Microbiol. Biotechnol. **21**:556–566.
  100. **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.
  101. **Jimenez-salgado T, Fuentes-ramirez LE, Tapia-hernandez A, Mascarua-esparza MA, Martinez-romero E.** 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. Appl. Environmental Microbiol. **63**:3676–3683.
  102. **Fierer N, Jackson RB.** 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**:626–31.
  103. **Reis Junior F, Reis VM, Da Silva L, Dobereiner J.** 2000. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Pesqui. Agropecuária Bras. **35**:985–994.
  104. **Govindarajan M, Balandreau J, Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C.** 2006. Improved Yield of Micropropagated Sugarcane Following Inoculation by Endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. Plant Soil **280**:239–252.
  105. **Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM.** 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil **311**:1–18.
  106. **Yasmin S, Hafeez FY, Schmid M, Hartmann A.** 2013. Plant-beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. Pakistan J. Bot. **45**:655–662.
  107. **Taulé C.** 2011. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. PEDECIBA, Universidad de la República.
  108. **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.
  109. **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.
  110. **Kruus K, Ra M.** 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. J. Appl. Microbiol. **640**–646.
  111. **Sack U, Hofrichter M, Fritsche W.** 1997. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardi*. FEMS Microbiol. Lett. **152**:227–234.
  112. **Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, Frioni L, Battistoni F, Fabiano E.** 2012. New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. Appl. Environ. Microbiol. **78**:1692–700.
  113. **Mareque C, Taulei C, Beracochea M, Battistoni F.** 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). Ann. Microbiol. **65**:1057–1067.
  114. **de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, Beracochea M, Battistoni F.** 2016. Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. Ann. Microbiol. **66**:329–342.
  115. **Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C.** 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif<sup>+</sup>* mutant strains. Mol. Plant Microbe Interact. **14**:358–366.
  116. **Platero R, de Lorenzo V, Garat B, Fabiano E.** 2007. *Sinorhizobium meliloti* fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the *mntA* promoter in a manganese-responsive manner. Appl. Environ. Microbiol. **73**:4832–8.
  117. **Castro-Sowinski S, Martinez-Drets G, Okon Y.** 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiol. Lett. **209**:119–125.
  118. **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.
119. Rosconi F, Trovero F, De Souza E, Fabiano E. 2015. Serobactins mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. *Environ. Microbiol.*
120. Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiology* **40**:911–915.
121. Diaz-Rosales P, Chabrillon M, Arijó S, Martínez-Manzanares E, Morinigo MA, Balebona MC. 2006. Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* **29**:355–364.
122. Rashid MH, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:4885–4890.
123. 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.
124. Reis VM, Olivares FL, de Oliveira ALM, dos Reis Junior FB, Baldani JI, Dobereiner J. 1999. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil* **206**:205–211.
125. Callejas MC. 2011. Caracterización ecofisiológica de matas microbianas denominadas por Cianobacterias en suelos de la isla Rey Jorge: Antártida Marítima. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UdelaR.
126. Barlocco C. 2012. Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.): bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aporte a la fijación de nitrógeno. PEDECIBA, UdelaR.
127. Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cabadilla CF, Ortega E, Rodes R. 1994. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). *Plant Physiol.* **105**:1139–1147.
128. Njoloma J, Tanaka K, Shimizu T, Nishiguchi T, Zakria M, Akashi R, Oota M, Akao S. 2006. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. *Biol. Fertil. Soils* **43**:137–143.
129. Kim J, Lim J, Lee C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnol. Adv.* **31**:1358–1373.
130. Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:249–273.
131. Buschart A, Sachs S, Chen X, Herglotz J, Krause A, Reinhold-Hurek B. 2012. Flagella Mediate Endophytic Competence Rather Than Act as MAMPS in Rice–*Azoarcus* sp. Strain BH72 Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**:191–199.
132. 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.
133. Lery LMS, Hemerly AS, Nogueira EM, von Krüger WM a, Bisch PM. 2011. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol. plant-microbe Interact.* **24**:562–576.
134. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* **4**:1–19.
135. 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.
136. 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.
137. **Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A.** 2013. The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**:937–945.
  138. **Asis C a., Shimizu T, Khan MK, Akao S.** 2003. Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**:915–920.
  139. **Mareque C.** 2014. Caracterización de la población endófito bacteriana asociada a plantas de sorgo dulce. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable». PEDECIBA BIOLOGÍA. Montevideo, Uruguay.
  140. **Chi F, Shen S, Cheng H, Jing Y, Yanni YG, Dazzo FB.** 2005. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia , from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology Ascending Migration of Endophytic Rhizobia , from Roots to Leaves , inside Rice Plants and Assessment of Benefits . *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7271–7278.
  141. **Gutiérrez-Zamora ML, Martínez-Romero E.** 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* **91**:117–26.
  142. **Mehboob I, Naveed M, Zahir ZA.** 2009. Rhizobial Association with Non-Legumes: Mechanisms and Applications. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **28**:432–456.
  143. **García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena M-H, Flores-Félix J-D, Fernández MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix Á, Velázquez E.** 2012. *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLoS One* **7**:e38122.
  144. **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.
  145. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
  146. **Alban A, David SO, Bjorkesten L.** 2003. A novel experimental design for comparative two dimensional gel analysis: Two dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**:36–44.
  147. **Unlu M, Morgan ME, Minden JS.** 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**:2071–2077.
  148. **Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M, Jensen, Lars Juhl von Mering C, Bork P.** 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* **44**:286–293.
  149. **Yu N., Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL.** 2010. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**:1608–1615.
  150. **Yu CS, Lin CJ, Hwang JK.** 2004. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.* **13**:1402–1406.
  151. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
  152. **Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang H-Y, Dosztányi Z, El-Gebali S, Fraser M, Gough J, Haft D, Holliday GL, Huang H, Huang X, Letunic I, Lopez R, Lu S, Marchler-Bauer A, Mi H, Mistry J, Natale DA, Necci M, Nuka G, Orengo CA, Park Y, Pesseat S, Piovesan D, Potter SC, Rawlings ND, Redaschi N, Richardson L, Rivoire C, Sangrador-Vegas A, Sigrist C, Sillitoe I, Smithers B, Squizzato S, Sutton G, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Xenarios I, Yeh L-S, Young S-Y, Mitchell AL.** 2017. InterPro in 2017 — beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* **45**:190–199.
  153. **The Uniprot Consortium.** 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**:D158–D169.
  154. **Liu H, Sadygov RG, Yates JR.** 2004. A model for

- random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **76**:4193–4201.
155. **Carvalho PC, Lima DB, Leprevost, Felipe V Santos, Marlon D.M. Fischer, Juliana S.G. Aquino PF, Moresco JJ, Yates III, John R. Barbosa VC.** 2016. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* **11**:102–117.
156. **Lugtenberg B.** 2015. Life of microbes in the rhizosphere, p. 7–16. *In* Lugtenberg, B (ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for sustainable agriculture.* Springer.
157. **Hartmann A, Schmid M, Tuinen D van, Berg G.** 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**:235–257.
158. **Badri D V., Vivanco JM.** 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant cell Environ.* **32**:666–681.
159. **Witzel K, Strehmel N, Baldermann S, Neugart S, Becker Y, Becker M, Berger B, Scheel D, Grosch R, Schreiner M, Ruppel S.** 2017. *Arabidopsis thaliana* root and root exudate metabolism is altered by the growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* DSM 16656T. *Plant Soil* **419**:557–573.
160. **Mark GL, Dow JM, Kiely PD, Higgins H, Haynes J, Bayse C, Abbas A, Foley T, Franks A, Morrissey J, O’Gara F.** 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**:17454–17459.
161. **Mareque C, Taulé C, Beracochea M, Battistoni F.** 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann. Microbiol.* **65**:1057–1067.
162. **Pankievicz VCS, Camilios-Neto D, Bonato P, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Chubatsu LS, Donatti L, Wajnberg G, Passetti F, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM.** 2016. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Mol. Biol.* **90**:589–603.
163. **Cheng Z, Duan J, Hao Y, McConkey BJ, Glick BR.** 2009. Identification of Bacterial Proteins Mediating the Interactions Between *Pseudomonas putida* UW4 and *Brassica napus* (Canola). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**:686–694.
164. **Cordeiro FA, Tadra-Sfeir MZ, Huergo LF, De Oliveira Pedrosa F, Monteiro RA, De Souza EM.** 2013. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. *J. Proteome Res.* **12**:1142–1150.
165. **Shidore T, Dinse T, Ohrlein J, Becker A, Reinhold-Hurek B.** 2012. Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Environ. Microbiol.* **14**:2775–2787.
166. **Brock AK, Berger B, Mewis I, Ruppel S.** 2013. Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on Growth, Glucosinolate Profile, and Immune Responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microb. Ecol.* **65**:661–670.
167. **Witzel K, Üstün S, Schreiner M, Grosch R, Börnke F, Ruppel S.** 2017. A proteomic approach suggests unbalanced proteasome functioning induced by the growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **8**:661.
168. **Taulé C.** 2011. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable». PEDECIBA BIOLOGÍA. Montevideo, Uruguay.
169. **Sabri S, Nielsen LK, Vickers CE.** 2013. Molecular control of sucrose utilization in *Escherichia coli* W, an efficient sucrose-utilizing strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:478–487.
170. **Dos Santos MF, Muniz de Padua VL, Nogueira EDM, Silva Hemerlyd A, Barbosa Domont G.** 2010. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J. Proteomics* **73**:917–931.
171. **Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Yeoh YK, Donose BC, Webb RI, Parsons J, Liao W, Sagulenko E, Lakshmanan P, Hugenholtz P, Schmidt S, Ragan MA.** 2016. Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting *Burkholderia* species. *Sci. Rep.* **6**:37389.
172. **Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LGP, Ollero FJ, Nicolás MF, Pains Rodrigues E, Shigeyoshi Nakatani A, Silva Batista JS, Oliveira Chueire LM, Souza RC, Ribeiro Vasconcelos AT, Megías M, Hungria M, Martínez-Romero E.** 2012. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* **13**:735.



173. **Warren CR.** 2015. Wheat roots efflux a diverse array of organic N compounds and are highly proficient at their recapture. *Plant Soil* **397**:147–162.
174. **Zimmer DP, Soupene E, Lee HL, Wendisch VF, Khodursky AB, Peter BJ, Bender RA, Kustu S.** 2000. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:14674–14679.
175. **Tejera N, Ortega E, Rodes R, Lluch C.** 2006. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. *J. Plant Physiol.* **163**:80–5.
176. **Castillo A, Taboada H, Mendoza A, Valderrama B, Encarnación S, Mora J.** 2000. Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli*. *Microbiology* **146**:1627–1637.
177. **Nachin L, Nannmark U, Nyström T, Nystro T.** 2005. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and Motility. *J. Bacteriol.* **187**:6265–6272.
178. **Yao J, Allen C.** 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J. Bacteriol.* **189**:6415–6424.
179. **Xie Z, Ulrich LE, Zhulin IB, Alexandre G.** 2010. PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *PNAS* **107**:2235–2240.
180. **Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankievicz VC, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA.** 2016. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **18**:2343–2356.
181. **Bonato P, Batista MB, Camilios-Neto D, Pankievicz VCS, Tadra-Sfeir MZ, Monteiro RA, Pedrosa FO, Souza EM, Chubatsu LS, Wasseem R, Rigo LU.** 2016. RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ. Microbiol.* **18**:2677–2688.
182. **Boller T, Felix G.** 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**:379–406.
183. **Ogawa J, Long SR.** 1995. The *Rhizobium meliloti* *groELc* locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.* **9**:714–729.
184. **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.
185. **Sheibani-Tezerji R, Rattei T, Sessitsch A, Trognitz F, Mitter B.** 2015. Transcriptome profiling of the endophyte burkholderia phytofirmans psjn indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio* **6**:e00621-15.
186. **Alquères S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A.** 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**:937–45.
187. **Ryu C-M.** 2015. Bacterial volatiles as airborne signals for plants and bacteria, p. 53–62. *In* Lugtenberg, B (ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Microbes for sustainable agriculture. Springer.
188. **Kierul K, Voigt B, Albrecht D, Chen XH, Carvalhais LC, Borriss R.** 2015. Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology* **161**:131–147.
189. **Ryu C-M, Farag MA, Hu C, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW.** 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:4927–4932.
190. **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.
191. **Coleman SA, Minnick MF.** 2001. Establishing a direct role for the Bartonella bacilliformis invasion-associated locus B (Ia1B) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect. Immun.* **69**:4373–4381.
192. **Coleman SA, Minnick MF.** 2003. Differential expression of the invasion-associated locus B (Ia1B) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. *Microb. Pathog.* **34**:179–186.
193. **Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Pühler A, Purnelle B,**

- Ramsperger U, Renard C, Thébault P, Vandenbol M, Weidner S, Galibert F. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. PNAS **98**:9877–9882.
194. Martínez-garcía E, Lorenzo V De. 2012. Synthetic Gene Networks **813**:267–283.
195. Platero RA. 2014. Informe proyecto ANII FCE 6580. Aplicación de herramientas moleculares sintéticas para el estudio de las interacciones bacteria-organismo hospedero.
196. Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. **43**:1185–1207.
197. APHA. 1985. Standar methods for the examination of water and wastewater APHA/AWWA/WPCF. Washington.
198. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2016. InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
199. Boddey RM, Polidoro JCJC, Resende AS, Alves BJR, Urquiaga S. 2001. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugarcane and other grasses. Aust. J. Plant Physiol. **28**:889–895.
200. Boddey RM, Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, Dobereiner J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil **174**:195–209.
201. De-Bashan LE, Hernandez JP, Bashan Y, Maier RM. 2010. Bacillus pumilus ES4/ : Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. Environ. Exp. Bot. **69**:343–352.
202. Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y. 2002. Azoarcus Grass Endophytes Contribute Fixed Nitrogen to the Plant in an Unculturable State. Mol. Plant-Microbe Interact. **15**:233–242.
203. 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.
204. Egner 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.
205. 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.
206. 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.
207. Thaweenut N, Hachisuka Y, Ando S, Yanagisawa S, Yoneyama T. 2010. Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. Plant Soil **338**:435–449.
208. Iniguez aL, Dong Y, Triplett EW. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Mol. plant-microbe Interact. **17**:1078–1085.
209. Glazer AN, Kechris K, Howard JB. 2015. Distribution and Ecological Niches of Nitrogenases, p. 87–98. In de Bruijn, FJ (ed.), Biological nitrogen fixation. Wiley.
210. Hamilton TL, Ludwig M, Dixon R, Boyd ES, Dos Santos PC, Setubal JC, Bryant DA, Dean DR, Peters JW. 2011. Transcriptional profiling of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **193**:4477–4486.
211. Joerger RD, Loveless TM, Pau RN, Mitchenall LA, Simon BH, Bishop PE. 1990. Nucleotide sequences and mutational analysis of the structural genes for nitrogenase 2 of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **172**:3400–8.
212. Schneider K, Muller A, Schramm U, Klipp W. 1991. Demonstration of a molybdenum and vanadium independent nitrogenase in a *nifHDK* deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. Eur.J.Biochem. **195**:653–661.
213. Walmsley J, Kennedy C. 1991. Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:622–624.
214. Zhang X, McRose DL, Darnajoux R, Bellenger JP, Morel FMM, Kraepiel AML. 2016. Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications. Biogeochemistry

- 127:189–198.
215. **Oda Y, Samanta SK, Rey FE, Yan T, Zhou J, Harwood CS.** 2005. Functional Genomic Analysis of Three Nitrogenase Isozymes in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* **187**:7784–7794.
216. **McRose DL, Zhang X, Kraepiel AML, Morel FMM.** 2017. Diversity and activity of alternative nitrogenases in sequenced genomes and coastal environments. *Front. Microbiol.* **8**:1–13.
217. **Lehman LJ, Roberts GP.** 1991. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **173**:5705–11.
218. **Ekanjio LK, Ruppel S, Remus R, Witzel K, Patz S and, Becker Y.** 2018. DSM16656T, Site-directed mutagenesis to deactivate two nitrogenase isozymes of *Kosakonia radicincitans*. *Can. J. Microbiology* **64**:97–106.
219. **Ruppel S, Merbach W.** 1995. Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp. in bacterial pure culture: An investigation using  $^{15}\text{N}_2$  incorporation and acetylene reduction measures. *Microbiol. Res.* **150**:409–418.
220. **Bergottini VM, Filippidou S, Junier T, Johnson S, Chain PS, Otegui MB, Zapata PD, Junier P.** 2015. Genome sequence of *Kosakonia radicincitans* strain YD4, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). *Genome Announc.* **3**:e00239–15.
221. **Kämpfer P, Ruppel S, Remus R.** 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**:213–221.
222. **Ruppel S, Hecht-Buchholz C, Remus R, Ortman U, Schmelzer R.** 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant Soil* **145**:261–273.
223. **Witzel K, Gwinn-Giglio M, Nadendla S, Shefchek K, Ruppel S.** 2012. Genome sequence of *Enterobacter radicincitans* DSM16656(T), a plant growth-promoting endophyte. *J. Bacteriol.* **194**:5469.
224. **Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q.** 2012. Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. *Microbes Environ.* **27**:391–398.
225. **Madhaiyan M, Peng N, Te N, Hsin I C, Lin C, Lin F, Reddy C, Yan H, Ji L.** 2013. Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species. *Biotechnol. Biofuels* **6**:140.
226. **Li Y, Li S, Chen M, Peng G, Tan Z, An Q.** 2017. Complete genome sequence of *Kosakonia oryzae* type strain Ola 51T. *Stand. Genomic Sci.* **12**:8–11.
227. **Berger B, Wiesner M, Brock AK, Schreiner M, Ruppel S.** 2015. *K. radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agron. Sustain. Dev.* **35**:1521–1528.
228. **Josey DP, Beynon JL, Johnston AWB, Beringer JE.** 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **46**:343–350.
229. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Mol. cloning a Lab. manual.
230. **Baldani JI, Baldani VLD, Sampaio MJAM, Doberainer J.** 1984. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An. Acad. Bras. Cienc.* **256**–265.
231. **Mirza BS, Rodrigues JLM.** 2012. Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:5542–9.
232. **Schwyn B, Neilands JB.** 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**:47–56.
233. **Avakyan ZA, Pivovarova TA, Shinner F.** 1986. Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya* **55**:477–482.
234. **Murashige T, Skooge F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**:473–497.

**INIA Dirección Nacional**  
Andes 1365, P. 12  
Montevideo  
Tel.: 598 2902 0550  
Fax: 598 2902 3633  
iniadn@dn.inia.org.uy

**INIA La Estanzuela**  
Ruta 50, Km 11  
Colonia  
Tel.: 598 4574 8000  
Fax: 598 4574 8012  
iniale@le.inia.org.uy

**INIA Las Brujas**  
Ruta 48, Km 10  
Canelones  
Tel.: 598 2367 7641  
Fax: 598 2367 7609  
inia\_lb@lb.inia.org.uy

**INIA Salto Grande**  
Camino al Terrible  
Salto  
Tel.: 598 4733 5156  
Fax: 598 4732 9624  
inia\_sg@sg.inia.org.uy

**INIA Tacuarembó**  
Ruta 5, Km 386  
Tacuarembó  
Tel.: 598 4632 2407  
Fax: 598 4632 3969  
iniatbo@tb.inia.org.uy

**INIA Treinta y Tres**  
Ruta 8, Km 281  
Treinta y Tres  
Tel.: 598 4452 2023  
Fax: 598 4452 5701  
iniatt@tyt.inia.org.uy

[www.inia.uy](http://www.inia.uy)