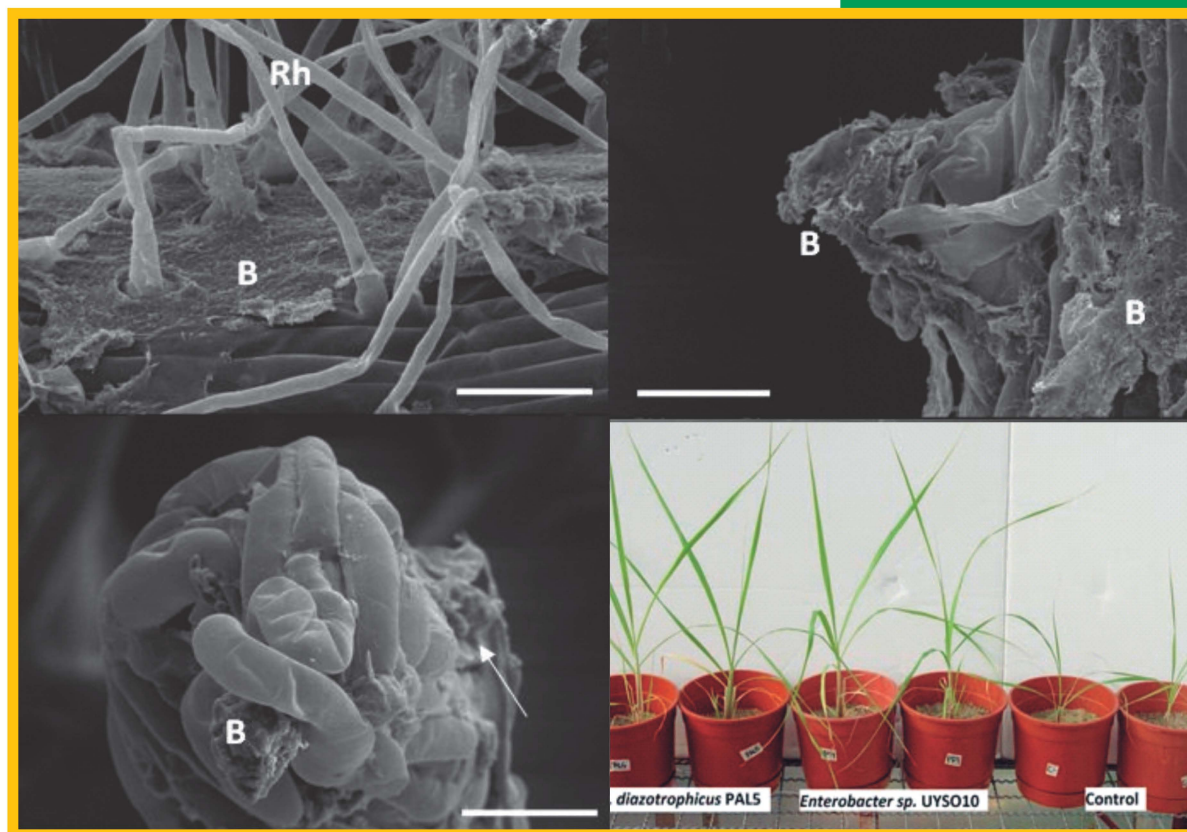




INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA
URUGUAY



BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS A CAÑA DE AZÚCAR

Julio, 2014

SERIE
FPTA-INIA

54

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS A CAÑA DE AZÚCAR

Proyecto FPTA-275 Producción sustentable en caña de azúcar: bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales

Responsable del Proyecto: Federico Battistoni*

Institución Ejecutora: Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable» (IIBCE)-MEC.

Equipo técnico de trabajo: Dra. Margarita Sicardi, Lic. Claudia Barlocco Facultad de Ciencias
MSc. Cecilia Taulé, Lic. Cintia Mareque BIOGEM-IIBCE-MEC
Ing. Agr. Fernando Hackembruch ALUR S.A

*Dr. Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM), IIBCE-MEC.
Universidad de la República.

Título: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a caña de azúcar

Responsable del Proyecto: Federico Battistoni

Institución Ejecutora: Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable»
(IIBCE)-MEC.

Equipo técnico de trabajo: Margarita Sicardi, Claudia Barlocco
Cecilia Taulé, Cintia Mareque, Fernando Hackembruch

Serie: FPTA N° 54

© 2014, 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

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T. V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente



D.M.V. Álvaro Bentancur

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18º 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
1. RESUMEN EJECUTIVO	9
2. INTRODUCCIÓN	10
El cultivo de caña de azúcar en el Uruguay	10
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	11
Endófitos bacterianos	11
Endófitos promotores del crecimiento vegetal asociados a gramíneas	12
Fijación biológica de nitrógeno en caña de azúcar	12
3. OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivo específico	13
Productos	13
4. METODOLOGÍA	14
Selección de las variedades de caña de azúcar utilizadas por los productores de ALUR, con mayor capacidad de FBN (metodología de ¹⁵ N)	14
Muestreos	14
Abundancia natural del ¹⁵ N	14
Dilución isotópica del ¹⁵ N	14
Aislamiento de endófitos-diazótrofos asociados a las variedades de caña de azúcar en condiciones naturales	15
Determinación de la capacidad de fijar nitrógeno por los aislamientos bacterianos utilizando ensayos bioquímicos y técnicas de biología molecular	16
Identificación de los aislamientos bacterianos por técnicas de biología molecular	16
Estudio de la capacidad de la colección de endófitos-diazótrofos de presentar características promotoras del crecimiento vegetal: producción de ácido indolacético (AIA), solubilización de fosfatos y producción de sideróforos	17
Caracterización fisiológica de los aislamientos: capacidad de crecer en diferentes fuentes de C, N y determinación de la resistencia intrínseca a antibióticos	17
Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	17
Resistencia intrínseca a antibióticos	18
Evaluación del crecimiento vegetal en invernáculo en respuesta a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas	18
En plantas micropropagadas	18
En plantas crecidas de esquejes	19

Ensayos de campo de promoción del crecimiento vegetal de la mejor combinación bacteria-cultivar determinada en los ensayos de invernáculo ...	19
Estudio de la interacción entre <i>Enterobacter</i> sp.UYSO10 y plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 mediante microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Selección de las variedades de caña de azúcar utilizadas por los productores de ALUR, con mayor capacidad de FBN (metodología de ¹⁵ N)	21
Abundancia natural del ¹⁵ N	21
Dilución isotópica del ¹⁵ N	21
Aislamiento de endófitos-diazótrofos asociados a las variedades de caña de azúcar en condiciones naturales	22
Determinación de la capacidad de fijar nitrógeno por los aislamientos bacterianos	23
Identificación de los aislamientos bacterianos y análisis filogenético	24
Estudio de la capacidad de la colección de endófitos-diazótrofos de producir metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal	25
Caracterización fisiológica de los aislamientos: capacidad de crecer en diferentes fuentes de C, N y determinación de la resistencia intrínseca a antibióticos	25
Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	30
Resistencia intrínseca a antibióticos	30
Evaluación del crecimiento vegetal en invernáculo en respuesta a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas	32
En plantas de cañas de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384	32
En plantas de cañas de azúcar crecidas a partir de esquejes de la variedad LCP 85-384	34
Ensayos de campo de promoción del crecimiento vegetal de la mejor combinación bacteria-variedad determinada en los ensayos de invernáculo	35
Estudio de la interacción entre <i>Enterobacter</i> sp. UYSO10 y plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 a través de microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido	36
Adhesión bacteriana a raíces y tallos	37
Infección y colonización de raíces y base del tallo	38
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
7. BIBLIOGRAFÍA	41

Cecilia Taulé, Cintia Mareque¹,
Claudia Barlocco², Fernando
Hackembruch³, Margarita Sicardi
y Federico Battistoni¹

¹BIOGEM-IIBCE-MEC; ²Facultad de
Ciencias; ³ALUR S.A

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a caña de azúcar

Proyecto FPTA 275

Período de Ejecución: Mar. 2009-Jun. 2012

1. RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto tuvo como objetivo general contribuir a mejorar la sustentabilidad económica y ambiental del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la zona norte del país. En particular, se plantea la posibilidad de disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, mediante la selección de variedades comerciales con potencial de fijar biológicamente el nitrógeno (FBN) y el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PCV). Mediante técnicas isotópicas de ¹⁵N se determinó que las tres variedades estudiadas y de interés para ALUR S.A. (Tuc 77-42, LCP 85-384 y CP 92-618) son capaces de adquirir parte de su N de la fijación biológica del N₂. Por otro lado, a partir de 7 variedades de cañas de azúcar cultivadas en Uruguay se obtuvo una colección de casi 600 aislamientos bacterianos nativos definidos en primera instancia como «probables endófitos» siendo la primera colección de estas características en Uruguay. Los mismos fueron caracterizados bioquímica, fisiológica y molecularmente. Un conjunto de 35 aislamientos fueron seleccionados teniendo en cuenta su morfología, así como sus características moleculares y fisiológicas. Mediante la secuenciación del gen *16S rDNA* se pudo identificar a los mismos como relacionadas a los géneros: *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Rahnella*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*,

Shinella, *Achromobacter* y *Agrobacterium*. Este es el primer reporte donde se presenta aislamientos pertenecientes a los géneros *Shinella*, *Rahnella* y *Achromobacter*, como probables endófito asociados a caña de azúcar. Características promotoras del crecimiento vegetal, fueron estudiadas en los 35 aislamientos identificados. Los resultados mostraron que 12 aislamientos tienen la capacidad de fijar biológicamente el N (FBN), 21 fueron capaces de solubilizar fosfatos, así como 65 y 10 fueron productores de ácido indol acético (AIA) y sideróforos respectivamente. Una colección bacteriana que posea diferentes características PCV es de gran importancia biotecnológica y estratégica con miras de desarrollar un bioinoculante para este cultivo. Teniendo en cuenta esa proyección a futuro, al mencionado conjunto de aislamientos se les estudió su capacidad de crecer en diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono, incluyendo sacarosa y azúcar de caña no refinada, evaluándose también la resistencia intrínseca a antibióticos. Posteriormente, se evaluó en condiciones de invernáculo, el efecto de la inoculación de aislamientos seleccionados de acuerdo a sus características PCV, sobre el crecimiento de esquejes y plantas de caña de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384. Los resultados mostraron que varios de los aislamientos estudiados fueron PCV de plantas de caña de azúcar en las condiciones ensayadas, destacándose la cepa

Enterobacter sp. UYSO10 en ambos experimentos. Estos datos son muy valiosos teniendo en cuenta la metodología empleada: plantas micropropagadas y esquejes, inoculados con bacterias nativas. Asimismo se sembró un ensayo de campo en el cual se evaluó la respuesta a la inoculación con los aislamientos *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 en la variedad LCP 85-384. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las variables biométricas evaluadas a los 3,8 y 12 meses de plantado. Por último, mediante microscopía óptica y electrónica se profundizó en el estudio de la interacción entre *Enterobacter* sp. UYSO10 y plantas de caña de azúcar var. LCP 85-384, lográndose definir al aislamiento *Enterobacter* UYSO10 como un «endófito verdadero» de caña de azúcar, siendo éste el primer reporte de estas características. En su conjunto, los resultados obtenidos justifican continuar tanto en la profundización de la parte aplicada de pruebas de inoculación en invernáculo y campo, así como en la investigación básica de la interacción planta-microorganismo en un cultivo estratégico para el país.

2. INTRODUCCIÓN

El cultivo de caña de azúcar en el Uruguay

La plantación del cultivo de caña de azúcar en Uruguay se restringe a la región más norte del país, en los alrededores de la ciudad de Bella Unión, Artigas. La misma se realiza principalmente bajo coordinación de Alcoholes del Uruguay S.A. (ALUR-www.alur.com.uy), empresa cuyo principal accionista es ANCAP. El cultivo de caña de azúcar posee en nuestro país dos objetivos principales: el tradicional con fines alimenticios mediante la producción de azúcar, y su nuevo uso como materia prima en la producción de biocombustibles mediante la generación de alcohol etílico. En el proceso de la cadena productiva se generan también, diversos subproductos aprovechables, tales como energía y alimento animal. Debido a esta característica, es que al mismo se lo considera como un cultivo multipropósito, hecho que mejora la sus-

tentabilidad del sistema productivo. Es así que ALUR S.A., a través del «Proyecto Sucro-Alcoholero», promueve su plantación como un cultivo estratégico y de gran importancia económica y social para nuestro país. Dicha iniciativa gubernamental, se propuso como meta el incrementar el cultivo de la caña en el norte del país de 3.400 hectáreas (2005), a 10.000 hectáreas (2009). Asimismo, se plantea como objetivo que la producción de azúcar pase de 18.000 a 50.000 toneladas anuales, produciendo conjuntamente 15.000 m³ de alcohol carburante. El proyecto Sucro-Alcoholero tiene como finalidad, el cumplir con la Ley N° 18.195, donde se encomienda a ANCAP el incorporar biocombustibles producidos en el país con materias primas nacionales, en una proporción mínima obligatoria de un 5% a partir del 1° de enero de 2012. Si bien no han alcanzado los objetivos planeados inicialmente en su totalidad, la superficie ha ido incrementándose significativamente, cosechándose en la zafra 2010/11 unas 6.648 hectáreas de caña de azúcar (Azúcar. Cultivo de Caña y Producción Industrial. Zafra 2010/11, www.mgap.gub.uy), esperándose alcanzar las 10.000 hectáreas en la próxima siembra (Hackembruch com. pers.). En Uruguay no se cuenta con un programa de mejoramiento de variedades del cultivo de caña de azúcar. La estrategia utilizada por ALUR es estudiar la adaptabilidad de variedades plantadas en la provincia de Tucumán (Argentina) la cual posee un clima muy similar al de Bella Unión. En los últimos años se ha cultivado en un 80 % del área plantada la variedad TUC77-42 debido al buen rendimiento de cosecha obtenido, repartiéndose el 20 % del área restante entre otras variedades de menor importancia. Actualmente ALUR plantea cambios en las características tradicionales de la plantación tendiendo a áreas equivalentes para cinco variedades: TUC 77-42, TUC 78-14, LCP 85-384, CP 92-618 y NA 73-2596. Esta transformación busca además de diversificar las variedades cultivadas, alargar el periodo de cosecha utilizando variedades de producción temprana y tardía, contemplando también otras características como es la tolerancia a heladas. La cosecha se realiza desde mayo a octubre, comenzando con la quema controlada del tablón y posteriormente el corte manual de los tallos.

Uno de los problemas que presenta el cultivo de caña de azúcar en nuestro país, son los altos costos de producción relacionados a la fertilización química nitrogenada necesaria para su óptimo desarrollo, alcanzando aproximadamente U\$S 215/hectárea (Hackembruch, com. pers.). A este hecho, se le suma que el cultivo fertilizado utiliza solo un 50% de los nutrientes suministrados, perdiéndose el resto por escorrentía o lixiviación a aguas superficiales y/o subterráneas o por volatilización (desnitrificación). El nitrógeno solubilizado en agua y transportado hacia cuerpos de agua causa gran contaminación por promover el aumento del crecimiento de algas y bacterias, fenómeno denominado eutrofización (20, 26,58). Esta problemática enfatiza la necesidad del uso de nuevas tecnologías para ser empleadas en la agricultura con el fin de lograr sistemas de producción más sustentables desde el punto de vista económico y ambiental. Una alternativa al uso de fertilizantes químicos es el empleo de bacterias nativas promotoras del crecimiento vegetal.

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Bacterias y plantas han co-evolucionado desarrollando distintos tipos de interacciones incluyendo interacciones comensalistas, mutualistas y perjudiciales. Desde el punto de vista de la planta, una interacción beneficiosa puede incrementar el crecimiento vegetal (aumento del rendimiento), mientras que una interacción perjudicial significa una disminución en el crecimiento de la planta y un posible desarrollo de enfermedad (18,74). Con respecto a las interacciones mutualistas se conocen dos formas en que las plantas responden a la presencia de las llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV): la directa o la indirecta. Los mecanismos de acción conocidos como promotores del crecimiento vegetal **directo** incluyen: la producción de sustancias estimulantes del crecimiento como las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas), la fijación biológica del nitrógeno (FBN) y el incremento en la capacidad de absorción de minerales como fósforo o hierro (13,75,92). También se conocen meca-

nismos que estimulan la germinación de semillas así como la emergencia y el establecimiento de las plántulas, a través de la producción y liberación de sustancias fenólicas como las quinonas (18). Como mecanismos de acción **indirectos** se describen la inducción por bacterias PCV, de los mecanismos de defensa sistémicos de la planta confiriendo de esta forma protección frente a potenciales patógenos (95) y el control biológico. El control biológico de bacterias y hongos patógenos por parte de las BPCV es llevada a cabo por competencia (de espacio, nutrientes, agua, luz, oxígeno) o mediante interacciones amensalistas como la producción de antibióticos o toxinas específicas como las bacteriocinas (10,11,76).

Las bacterias PCV pueden encontrarse en vida libre o en asociaciones con plantas como bacterias epífitas (incluyendo las rizosféricas), endófitas o en simbiosis, como los rizobios en asociación con plantas de la familia leguminosa, quienes forman estructuras especiales llamadas nódulos (42,43). Esta clasificación de las bacterias muestra la existencia de diferentes grados de interacción entre bacterias y plantas, resultando en relaciones más o menos laxas. A mayor intimidad en la interacción, se presentarán características más complejas resultantes de un mayor grado de co-evolución y traducido generalmente en mejores beneficios para ambas contrapartes. El fenotipo de la interacción es generalmente plástico, dependiendo de la especificidad de genotipo de ambas partes, del estado nutricional y del desarrollo así como también de factores ambientales.

Endófitos bacterianos

La etimología de la palabra endófito viene de *endo* (dentro) y *fito* (planta), literalmente significa «*en la planta*». Wilson y colaboradores (1995) definieron el término endófito 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 y sin provocar síntomas de enfermedad (93). En este caso el uso del término se aplica a un amplio espectro de huéspedes (bacterias y hongos) y

hospederos (plantas e insectos en plantas), así como a diferentes formas de vida considerando estrategias simbióticas, saprobióticas facultativas y parásitos. De esta forma se incluyen interacciones comensalistas, mutualistas y patogénicas en estado de latencia (16). Posteriormente, el término endófito también ha sido definido con fines prácticos en referencia a las limitaciones experimentales. Es así que Quadts-Hallmann y colaboradores definieron el término endófito como aquellas bacterias que pueden ser aisladas o extraídas de tejidos de plantas esterilizados superficialmente y que no causan un daño visible en la misma (23). Sin embargo, esta definición no incluye aquellas bacterias no extraíbles o no cultivables. Más aún, Reinhold-Hurek y Hurek propusieron el criterio para identificar endófitos «verdaderos» (60). El mismo hace referencia a bacterias que no solamente fueron aisladas de tejidos superficialmente estériles sino que además se tenga evidencia microscópica de su presencia dentro de los tejidos. A su vez una bacteria endófito debe cumplir con el postulado de Koch y ser capaz de infectar nuevos hospederos. En términos evolutivos a las bacterias endófitas se las considera intermediarios entre bacterias saprófitas y patógenas, considerándolas como bacterias que potencialmente evolucionarán a un estado de patógenos o como bacterias más evolucionadas que han sido conservadas por el beneficio resultante (23). Para explicar la infección asintomática por dichas bacterias, se ha postulado que un balance entre las reacciones antagónicas causadas por endófitos virulentos y las respuestas de defensa de la planta han resultado en una colonización asintomática (69). Por otro lado se ha observado que en general las poblaciones de bacterias endófitas ocurren en más bajas densidades que las de patógenos y algunas no presentan respuestas de hipersensibilidad por parte de la planta (69). Los endófitos pueden clasificarse como obligatorios o facultativos, siendo los endófitos obligatorios bacterias que dependen del huésped para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión. Por su parte los endófitos facultativos, pueden ser caracterizados como bifásicos alternando una fase dentro de la planta y otra en el ambiente, generalmente el suelo (24).

Endófitos promotores del crecimiento vegetal asociados a gramíneas

Las bacterias endófitas han demostrado ser benéficas en la promoción del crecimiento vegetal y la salud de varios cultivos (11,26,48,74,3,71). La explotación de dicha interacción puede jugar un rol significativo en sistemas agrícolas sustentables tanto para cultivos alimenticios como no alimenticios. Durante las últimas décadas, se ha incrementado el interés en el estudio de BPCV asociadas a cultivos agrónomicamente importantes como arroz, maíz, trigo, caña de azúcar y sorgo, con especial interés en las bacterias que fijan biológicamente el N (diazótrofas), buscando extender a las gramíneas los conocimientos y usos de la fijación biológica del nitrógeno (FBN), muy estudiada en cultivos de leguminosas (4,14). Es así que se han reportado varias bacterias diazótropas promisorias para su uso biotecnológico en la rizósfera y en el interior de las plantas (91). Se postula que en comparación a la interacción bacteria diazótropas rizosféricas-planta, en la interacción endófito diazótropo-planta, la eficiencia del intercambio del nitrógeno fijado es mayor al ser liberado en el interior de la planta, quedando rápidamente disponible para sus necesidades (33). Si bien, las bacterias endófitas-diazótropas parecen ser una menor población dentro de la comunidad de endófitos (77), se postula que el aumento en número de dicha población aumentaría el beneficio percibido por la planta a partir de la FBN (65).

Fijación biológica de nitrógeno en caña de azúcar

Dadas las políticas energéticas y el balance energético positivo que posee la producción de etanol a partir del cultivo de caña de azúcar en Brasil, dicho país ha impulsado desde hace varios años el estudio del efecto de microorganismos PCV, particularmente diazótropos, en dicho cultivo. Diversos estudios muestran la importancia económica que posee la FBN en el cultivo de caña de azúcar (86). Se ha reportado que ciertas variedades son capaces de obtener hasta un 60 % del N necesario para su desarrollo a

través de la asociación con bacterias endófitas diazótrofes (7), factor dependiente del genotipo de la planta, de las bacterias asociadas y del ambiente. Particularmente para el caso de Brasil se ha sugerido que, las cantidades bajas de fertilización nitrogenada incorporada en la producción de caña de azúcar por los últimos 100 años, han seleccionado variedades con baja respuesta al nitrógeno fertilizado y con una mayor habilidad para el nitrógeno fijado (7). Estos resultados han llevado a estudiar cuáles son las bacterias responsables de la contribución de N vía FBN en cultivos de caña de azúcar (38). Mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo se han aislado e identificado diferentes bacterias asociadas a este cultivo. Es así que diversas bacterias han sido descritas como asociadas a caña de azúcar, pero como endófitos verdaderos solamente los géneros: *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* (91). En Brasil se está realizando un gran esfuerzo para desarrollar la formulación de un inoculante para este cultivo. Para esto se han evaluado diferentes inóculos bacterianos en cultivares de caña de azúcar utilizando como estrategia un pool de bacterias diazótrofes, incluyendo bacterias endófitas (51). Actualmente se ha definido la formulación y se están realizando ensayos de validación del inoculante a campo bajo diferentes condiciones ambientales (suelos, variedad de caña de azúcar, clima). Si bien hay resultados prometedores, los mismos presentan una gran variabilidad y baja reproducibilidad. Estos resultados demuestran que se requieren más estudios con respecto a la interacción entre las bacterias diazótrofes asociadas y las plantas, quien/es son los responsables y qué condiciones favorecen la actividad de dicha población y por ende la FBN.

De las variedades de caña de azúcar que se cultivan en el país se desconoce el tipo, características y funciones de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a las mismas. Tam-

co se tiene información sobre el potencial de esos microorganismos en reducir los costos del fertilizante nitrogenado por inoculación de las plantas con bacterias diazótrofes.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir a mejorar la sustentabilidad económica y ambiental del cultivo de caña de azúcar en la zona norte del país.

Objetivo específico

Disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados en el cultivo de caña de azúcar mediante el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Productos

- 3.1. Seleccionar la variedad de caña de azúcar utilizadas por los productores de ALUR, con mayor capacidad de FBN (metodología de N¹⁵).
- 3.2. Aislar endófitos-diazótrofos asociados a las variedades de caña de azúcar en condiciones naturales.
- 3.3. Determinar la capacidad de fijar nitrógeno por los aislamientos bacterianos utilizando ensayos bioquímicos y técnicas de biología molecular.
- 3.4. Identificar los aislamientos bacterianos de interés por técnicas de biología molecular.
- 3.5. Estudiar la capacidad de la colección de endófitos-diazótrofos de producir metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal.
- 3.6. Evaluar el crecimiento vegetal en invernáculo en respuesta a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofes.
- 3.7. Realizar ensayos de campo de promoción del crecimiento vegetal de la mejor combinación bacteria cultivar determinada en los ensayos de invernáculo.

4. METODOLOGÍA

Selección de las variedades de caña de azúcar utilizadas por los productores de ALUR, con mayor capacidad de FBN (metodología de ^{15}N).

Muestreos

Se realizaron dos giras en los meses de abril y setiembre del 2009, a predios de agricultores de caña de azúcar que están bajo la coordinación de técnicos de ALUR S.A. en Bella Unión (S $30^{\circ}20'56,5''$; W $57^{\circ}37'19,1''$). El recorrido por el área elegida reveló marcadas diferencias entre los predios en cuanto a las variedades utilizadas, año del cultivo (soca 1, 2, etc.) y fertilización nitrogenada. Para la colecta del material vegetal, se puso especial énfasis en elegir aquellos sitios de muestreo que tuvieran información detallada sobre la fertilización nitrogenada utilizada por el agricultor. Teniendo en cuenta la alta incidencia de la fertilización en los cultivos de caña de azúcar, se decidió a los efectos comparativos, elegir plantas de cultivos con alta fertilización (150 kgN/ha), baja fertilización (50 kgN/ha) y sin fertilización nitrogenada en los últimos 4-5 años. En cada sitio seleccionado de acuerdo a la variedad y fertilización nitrogenada, se colectaron los tallos de 12 plantas elegidas al azar dentro de un tablón. El material vegetal fue acondicionado y transportado adecuadamente al laboratorio. Por último se colectaron muestras compuestas de los suelos (0-20 cm de profundidad) de cada sitio para su análisis físico-químico.

Con la finalidad de cuantificar el aporte de la fijación biológica del nitrógeno en las diferentes variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay, se emplearon las técnicas de la abundancia natural del N^{15} y de la dilución isotópica del N^{15} .

Abundancia natural del ^{15}N

Para esta, en todos los sitios de muestreo en que se obtuvieron plantas para el aislamiento bacteriano, se colectaron las hojas +3 (la tercera en emerger)

y 10 hojas jóvenes elegidas al azar. Conjuntamente se extrajeron de cada tablón o de lugares adyacentes, especies de malezas para utilizarlas como referencia. Se eligieron plantas con porte y ciclo similar al de la caña, a las cuales se les extrajo una muestra de 10 hojas de cada una. Las muestras se acondicionaron y transportaron al laboratorio para su análisis. Las malezas fueron identificadas por el departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, UDELAR. Las muestras se secaron a 65°C hasta peso constante, se molieron finamente y a una sub-muestra de 0,5 g, de cada una, se le determinó el N total aéreo (método de Kjeldhal) y $\delta^{15}\text{N}$ de la parte aérea (por espectrometría de masas), en el Laboratorio CATNAS de la Facultad de Agronomía, Udelar. El %Nda (porcentaje de N derivado del aire) para cada muestra se calculó por la fórmula:

$$\%Nda = (\delta^{15}\text{N ref.} - \delta^{15}\text{N caña} \times 100) / (\delta^{15}\text{N ref.} - B)$$

donde: $\delta^{15}\text{N ref.}$ y $\delta^{15}\text{N caña}$ corresponden a los valores de $\delta^{15}\text{N}$ (%) para las plantas de referencia y las plantas de caña de azúcar respectivamente (6). Se asume un valor B de 0,0 $\delta^{15}\text{N}$, para aquella planta de caña de azúcar que crece con N_2 atmosférico como única fuente de nitrógeno.

Dilución isotópica del ^{15}N

En este ensayo las variedades de caña ensayadas fueron: CP 92-618, Tuc 77-42 y LCP 85-384 las cuales son de interés para ALUR. Como controles se emplearon los cultivos de maíz (*Zea mays* L. NK940) y sorgo (*Sorghum officinalis* L. DK-71-T). La evaluación se realizó a 2 niveles de fertilización nitrogenada, empleando soluciones de sulfato de amonio marcado con 10% de átomos de ^{15}N en exceso, equivalente a 10 y 50 kg de N/ha. El ensayo se cosechó a los 4 meses después de la siembra, determinándose la biomasa aérea y radical seca, el N-total aéreo y el % de átomos en exceso de ^{15}N . Para la determinación del porcentaje de N derivado de la atmósfera (%Nda) se utilizó la fórmula:

$$\%Nda = [(1 - \% \text{ a.e. } ^{15}\text{N caña} / \% \text{ a.e. } ^{15}\text{N control})] \times 100.$$

donde: el %a.e. $^{15}\text{N caña}$ y del control son los enriquecimientos en átomos en exce-

so de ^{15}N de las variedades de caña y de los cultivos controles, maíz y sorgo respectivamente. Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat usando ANAVA con un $p < 0.05$. En caso de obtener diferencias significativas, los tratamientos fueron comparados usando el test de LSD 0,05 (29).

Aislamiento de endófitos-diazótrofos asociados a las variedades de caña de azúcar en condiciones naturales

El material de partida utilizado para este procedimiento, fueron tallos de plantas traídos directamente del campo así como tallos jóvenes crecidos en el labo-

torio a partir de yemas colectadas en los muestreos (Figura 1). Las variedades de caña de azúcar utilizadas fueron CP 92-618, LCP 85-384, TUC 77-42, TUC 67-27, TUC 78-12 y FAM 81-77. Con el fin de optimizar el procedimiento, se pusieron a punto diferentes protocolos en los cuales el material biológico se esterilizó superficialmente extrayéndose el fluido apoplástico o macerándose asépticamente. A partir de la suspensión obtenida en ambos casos, se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-6} sembrándose 200 μl de cada una de las mismas, en viales conteniendo los medios de cultivo semi-sólidos LGI, LGI-P-caldo y JNFb (55,62,84). Los viales fueron incubados a 30°C por siete días y aquellos que presentaron una película de crecimiento, fueron repicados en un vial fresco para

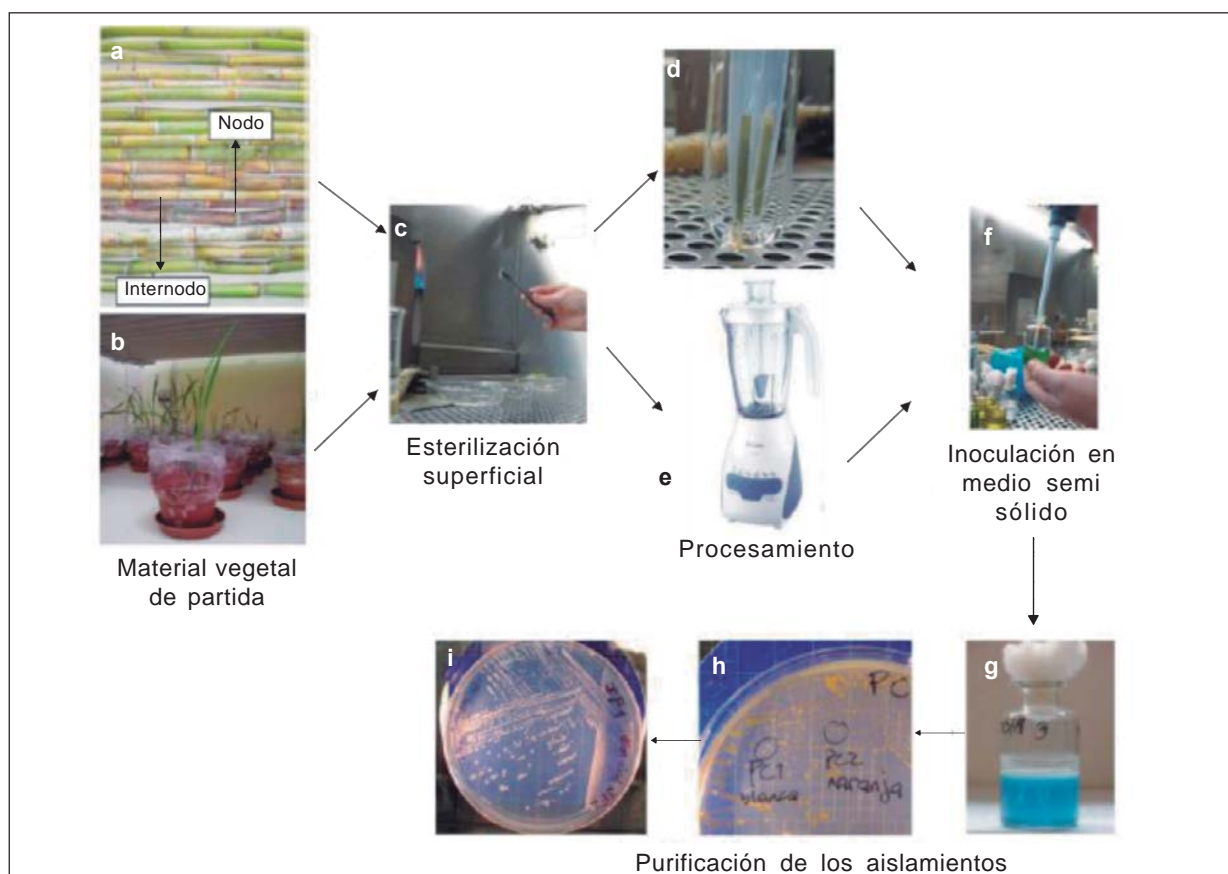


Figura 1. Estrategia utilizada para el aislamiento de bacterias endófitas diazótrophas. **a-b)** Material vegetal utilizado para el aislamiento de bacterias potencialmente endófitas: **a)** nodos e internodos de tallos traídos de campo y **b)** plantas rebrotadas a partir de yemas. **c-f)** ilustración del procedimiento utilizado para el aislamiento bacteriano: **c)** esterilización superficial, **d)** obtención del apoplasto, **e)** macerado de los tallos mediante uso de licuadora y **f)** inoculación de los viales conteniendo medio semi-sólido sin nitrógeno. **g-i)** Purificación de los aislamientos: **g)** visualización de la película de crecimiento característica de bacterias diazótrophas, **h)** estriamiento de una película de crecimiento en medio sólido sin nitrógeno, **i)** purificación de los aislamientos en medio rico de cultivo.

luego ser estriados en placas conteniendo el mismo medio con el fin de obtener colonias aisladas. Finalmente cada colonia obtenida fue crecida en placas conteniendo medio TY para su clasificación morfológica.

Determinación de la capacidad de fijar nitrógeno por los aislamientos bacterianos utilizando ensayos bioquímicos y técnicas de biología molecular

Las bacterias endófitas-diazótrofas tienen la característica de formar halo en medios de cultivo semisólido sin nitrógeno (91). Es así que teniendo en cuenta esta característica todas las cepas de la colección fueron crecidas en viales conteniendo medios de cultivo semisólido LGI, LGI-P, y JNFb. Asimismo toda la colección fue sometida a la reacción de PCR con el fin de amplificar uno de los genes estructurales de la nitrogenasa (*nifH*) usando los cebadores *nifHFwd* (5'-ATYGTCCGGYTGAYCCSAARGC-3') y *nifHRev* (5'-ATGGTGTGGCGGCRTA-VAKSGCC-3') (54).

La actividad nitrogenasa de los aislamientos *nifH* positivos fue determinada mediante el ensayo de reducción del acetileno (ARA)(25). Como controles positivos se utilizaron las cepas *Burkholderia tropica* PP8, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 crecidas 5 días en viales conteniendo LGI-P; *Azospirillum amazonensis* CBAMC crecida 5 días en viales conteniendo LGI; *Herbaspirillum seropedicae* Hrc-54, *Herbaspirillum rubrisubalcans* Hcc-103 crecidas 2 días en viales conteniendo JNFb. Como control negativo se utilizó un vial el cual no fue inoculado.

Con el objetivo de poder visualizar la diversidad genómica de los aislamientos que evidenciaron la presencia del gen *nifH*, así como un crecimiento en forma de halo en medio semisólido sin N, se realizaron amplificaciones de regiones consensuales repetitivas intergénicas de los aislamientos, mediante la técnica de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*), usando los cebadores *ERIC1R*(5'-ATGTAAGCTCCT-

GGGATTAC-3') y *ERIC2* (5'-AAGTA-AGTGACTGGGGTGAGCG-3') (27). En todos los casos las reacciones de PCR se realizaron usando como molde un lisado bacteriano obtenido a partir de colonias aisladas en medio sólido. Los productos de la reacción se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa 0,7% y tinción con bromuro de etidio. Los ensayos se realizaron por duplicados independientes. Los geles fueron analizados visualmente y los aislamientos agrupados de acuerdo a perfiles de bandas similares a un 80%.

Identificación de los aislamientos bacterianos por técnicas de biología molecular

La amplificación y secuenciación del gen *16S ARNr* se realizó en un grupo de aislamientos que presentaron el gen *nifH* así como diferente patrón de bandas en el ensayo de ERIC-PCR. Los cebadores universales utilizados fueron *Eub27f* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y *Eub1525r* (5'-AAGGAGGTGATCCAGC-CGCA-3') (37). Las reacciones de PCR se realizaron usando como molde una suspensión bacteriana obtenida a partir de colonias aisladas en medio sólido. Los productos de la reacción se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa 0,7% y tinción con bromuro de etidio. Con la finalidad de obtener las secuencias correspondientes al gen *16S ARNr*, los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar a MACROGEN, Korea. Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas fueron ensambladas usando el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012) (<http://www.DnaBaser.com>). La identidad de las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el algoritmo BLAST. Para los análisis filogenéticos, los alineamientos nucleotídicos fueron obtenidos con el programa Greengenes usando la herramienta NASTA (12). Los árboles filogenéticos fueron construidos con el programa Mega4 (81) usando 1458 nucleótidos de la secuencia del gen *16S*

ARNr en el caso de las Gamaproteobacterias o con 1471 nucleótidos de secuencia para el caso de las Alfa o Betaproteobacterias. El algoritmo de Neighbor-joining (67) y el modelo de Kimura de sustitución de 2 parámetros fueron usados para la construcción de los árboles filogenéticos, estimándose la robustez de cada rama de los mismos con un repetición de un bootstrap de 1000 (73).

Estudio de la capacidad de la colección de endófitos-diazótrofos de presentar características promotoras del crecimiento vegetal: producción de ácido indo acético (AIA), solubilización de fosfatos y producción de sideróforos

La producción de AIA por los aislamientos se estudió a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento mediante el ensayo colorimétrico de Sarkowski (68). Como controles positivos se utilizaron las cepas *H. seropedicae* H54 y *G. diazotrophicus* Pal5, mientras que como control negativo se usó el medio de cultivo sin inocular. Para el caso de los aislamientos solubilizadores de fosfatos, cada cepa a ser analizada se sembró en placas de Petri con medio rico GL conteniendo sales de fosfato precipitadas (78). Las bacterias solubilizadoras de fosfato se detectaron por la presencia de un halo translúcido alrededor de la colonia el cual se midió a las 72 horas de crecimiento. La cepa *Burkholderia tropica* PP8 se utilizó como control positivo. Los aislamientos productores de sideróforos, fueron identificadas mediante el ensayo de cromoazurol (CAS) en placas con agar (70). Las colonias positivas fueron detectadas por la presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia luego de 5 días de crecimiento. En este caso, las cepas *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *Pseudomonas fluorescense* CFBP 2392 fueron empleadas como control positivo (19,40). En todos los casos, cada ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los aislamientos.

Caracterización fisiológica de los aislamientos: capacidad de crecer en diferentes fuentes de C, N y determinación de la resistencia intrínseca a antibióticos

Para esta caracterización, las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Panotaea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, fueron seleccionadas de acuerdo a sus características PCV detectadas *in vitro*.

Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

En estos experimentos, una suspensión de cada cepa se sembró por triplicado en medio sólido JNFb, LGI o LGI-P (según su medio de aislamiento original), sustituyendo la fuente de C por 5g/l de: sacarosa, ácido málico, glucosa, glicerol, manitol y azúcar de caña no refinada (ACnr). En el caso del N, se utilizó sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), nitrato de potasio (KNO_3), cloruro de amonio (NH_4Cl), L-tirosina (L-Tyr), L-asparagina (L-Asn) y L-ácido glutámico (L-Glu) en concentración 5mM. Como control positivo se utilizaron los medios originales y como control negativo los medios sin fuente de C y N inoculados, en ambos casos, con las cepas en estudio. Teniendo en cuenta que la composición interna de la caña de azúcar es de un 8-15 % de sacarosa, se estudió también el comportamiento de las cepas a una concentración similar y doblemente mayor de sacarosa y de ACnr (100 y 200 g/l). La ACnr utilizada posee un contenido algo menor de sacarosa (> 94%) que el azúcar blanco o refinado conservando aún parte de la miel a partir de la cual fue fabricado. Luego de 10 días de haber sido inoculados los medios, se realizó la evaluación visual del crecimiento en las placas y se las clasificó en: sin crecimiento (-); colonias aisladas en la estría (+); crecimiento continuo sin colonias aisladas en la estría (++)

Resistencia intrínseca a antibióticos

La resistencia a antibióticos fue determinada sembrando 5µl de una suspensión celular de cada cepa a ensayar, en placas conteniendo medio rico DYG's con diferentes concentraciones de antibióticos. Los antibióticos con las máximas concentraciones evaluadas fueron: Amplicilina 1000 mg/l; Kanamicina 650 mg/l; Streptomina 450 mg/l y Spectinomicina 800 mg/l. Las soluciones de antibióticos, esterilizadas por filtración (0,2 µm), se agregaron al medio de cultivo estéril y termostatzado. Las placas se incubaron a 30 °C registrándose la presencia o ausencia de crecimiento a las 48 h. El ensayo se realizó por triplicado para cada tratamiento. Como control positivo se inocularon las mismas cepas en medio DYG's sin el agregado de antibióticos.

Evaluación del crecimiento vegetal en invernáculo en respuesta a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas

En plantas micropropagadas

Frascos de vidrio de 250 ml fueron preparados con 20 ml de medio MS modificado (63). En los mismos se colocaron asépticamente entre cuatro y cinco plantas de caña de azúcar micropropagadas de similar tamaño en etapa de enraizamiento (53). A los 3 días, los frascos que no presentaron contaminación, fueron inoculados con 1×10^7 células/planta (63) con los siguientes aislamientos: *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Rahnella* sp. UYSO22, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Pseudomonas* sp. UYSO14 y

Shinella sp. UYSO24. Como cepa de referencia se utilizó *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 y como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. Asimismo, se incluyó un tratamiento donde se inocularon los 6 aislamientos evaluados en este ensayo (MIX), a una concentración final de 1×10^7 células/planta (21). Para cada tratamiento se realizaron 10 réplicas. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Diez días posteriores a la inoculación (pi), las plantas fueron traspasadas a almacigueras con arena: vermiculita estéril (2:1) y regadas con medio MS modificado sin N. Como las gramíneas no pueden adquirir el total del N a partir de la FBN, se regó alternadamente con medio MS con N para que las plantas no presenten déficit de éste elemento. Durante estas primeras etapas las plantas fueron mantenidas a 30 °C con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad. A los 25 días pi se trasplantaron las plantas a macetas conteniendo 1.5 kg de arena:vermiculita estéril (2:1) trasladándose al invernáculo con un fotoperiodo controlado de 8/16 horas luz/oscuridad (Figura 2). A los 4 meses pi se cosechó el ensayo midiéndose las variables biométricas: altura de la planta (desde la base del tallo hasta el collarín) y diámetro del tallo (medido en la base de la planta). Asimismo se determinó el peso seco de la parte aérea y radicular. Para esto las plantas se seccionaron en raíz y parte aérea, secándose a 60 °C hasta alcanzar peso constante. Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat usando ANAVA ($p < 0,05$). En caso de obtener diferencias significativas, los tratamientos fueron comparados usando el test de Tukey (29).



Figura 2. Etapas del ensayo de promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con aislamientos seleccionados. **a-** inoculación aséptica de plantas enraizadas en frascos, **b-** aclimatación y **c-** en macetas en invernáculo.

En plantas crecidas de esquejes

En este ensayo se utilizaron macetas conteniendo 1,5 kg de sustrato arena-suelo (1:1). El suelo (0-20 cm de profundidad) fue extraído de la zona experimental de Bella Unión, secado y tamizado en el laboratorio antes de su uso, mientras que la arena fue lavada con agua corriente y esterilizada. El diseño del ensayo fue completamente al azar con 8 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos inoculados fueron: *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rahnella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomona* sp. UYSO27 y la mezcla de las 8 cepas (MIX). Como referencia se incluyó un tratamiento con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5. Como control positivo se realizó un tratamiento al cual se le agregó una solución de urea equivalente a 100 kg N/ha, mientras que como control negativo se emplearon plantas de cañas de azúcar sin inocular y sin fertilizar. En la siembra se utilizaron esquejes de la variedad LCP 85-384. Los mismos fueron lavados con agua corriente, desinfectados superficialmente con etanol 70% y cortados en trozos, dejando una yema por esqueje. Las macetas fueron regadas con agua destilada a capacidad de campo sembrándose a los 3 días, 1 esquejes por maceta. Las macetas fueron colocadas en un cuarto de crecimiento de plantas controlado a 28 °C y 60% de humedad relativa (HR), para facilitar la germinación de las yemas (5-7 días). Posteriormente se las creció con un fotoperíodo de luz: oscuridad de 14:10 h con 5750-6700 luxes. Cuando las plántulas tuvieron aproximadamente 20 cm de altura se trasladaron al invernáculo. Los tratamientos fueron inoculados a los 20 y 65 días desde la aparición de las primeras hojas con 1×10^7 células/planta. En los tratamientos nitrogenados se añadió 20 ml de una solución de urea equivalente a 25Kg N/há por maceta a los 20, 35, 65 y 95 días desde la siembra. El riego se realizó siempre en el plato inferior de la maceta, utilizando agua corriente y una vez por semana solución nutritiva Fahraeus sin N (17). A los 4 meses se cosechó el ensayo midiéndose las variables biométricas: altura de la planta y diámetro del tallo. Asimismo se determi-

nó el peso seco de la parte aérea y radicular. Para esto las plantas se seccionaron en raíz y parte aérea, secándose a 60°C hasta alcanzar peso constante. Posteriormente la parte aérea se molió finalmente para análisis de N-total por el método de Kjeldhal en el Laboratorio de Nutrición animal de la Facultad de Agronomía, UdelaR. Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat usando ANAVA con un $p < 0,05$. En caso de obtener diferencias significativas, los tratamientos fueron comparados usando el test de LSD Fisher (29).

Ensayos de campo de promoción del crecimiento vegetal de la mejor combinación bacteria-cultivar determinada en los ensayos de invernáculo

El ensayo se realizó en el campo experimental de ALUR, Bella Unión, de forma de tener una preparación del suelo similar a la de las siembras comerciales de caña. El diseño fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Cada bloque (4 en total) midió 8 m de ancho por 20 m de largo separados por calles de 2 m de ancho. Asimismo, cada bloque estaba constituido por 4 parcelas (una por tratamiento) y dentro de cada parcela habían 4 surcos separados por 0,60-0,80m (Figura 3). Los surcos fueron abiertos por sembradora convencional momentos antes de la siembra para evitar la pérdida de humedad del suelo. La elección de las cepas a evaluar en campo se basó en los resultados del ensayo en invernáculo. Se realizaron 4 tratamientos: dos cepas (*Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24), el control positivo (fertilización con urea equivalente a 150Kg N/ha, condiciones similares a las realizadas por ALUR) y el control negativo (sin inoculación y sin fertilización).

Los inóculos fueron preparados 24 h antes de instalar el ensayo. Para eso las cepas fueron crecidas en matraces conteniendo 400ml de medio DYG's, igualándose la densidad óptica a 560nm ($D.O._{560nm}$) de los inóculos entre 0,6-0,8. Dos bolsas con 200ml cada una de turba estéril (Calister S.A.) se impregnaron con cada cepa mezclándose cuidadosa-



Figura 3. a: diagrama del ensayo de campo en predio del campo experimental de ALUR, Bella Unión. b: inoculación de esquejes. c: Siembra de esquejes

mente. La eficiencia del proceso de preparación del inoculante se verificó por el recuento en placa en medio DYG's a tiempo 0 con el fin de obtener las ufc/g inoculante de cada cepa. Posteriormente se determinó por el mismo método la sobrevivencia de cada cepa a los 7, 30, 60, 90 y 120 días desde la inoculación de la turba. El personal de campo de ALUR preparó los esquejes de la variedad LCP 85-384 previo a su inoculación y siembra (40 cm de largo, con 2-3 yemas). La inoculación se realizó en un tanque limpio, mezclando 25 g de inoculante con 80 g de adherente S1 (Biagro S.A.) y 4 litros de agua corriente. En la mezcla se sumergieron los esquejes durante 10 min e inmediatamente se sembraron 20 tallos continuos por surco. La inoculación y la siembra se realizaron con todas las precauciones para evitar contaminación entre los tratamientos. Los esquejes se taparon inmediatamente de colocados en los surcos para evitar su desecación e inmediatamente se añadió al voleo el fertilizante fosfatado (138 unidades de P/ha) regándose. Esquejes inoculados y no inoculado se transportaron al laboratorio con la finalidad de determinar el número de bacterias/superficie de esqueje, por recuento en placas en medio LGI-P (medio del cual se aislaron las cepas originalmente). Siguiendo el manejo rutinario del cultivo, a los 5 días se aplicó herbicida, a los 90 días se adicionó fertilizante potásico (160 unidades de K/ha) y a los 100 días se añadió a las parcelas con N, el fertilizante nitrogenado (150 unidades de N/ha). A los 3, 8 y 12 meses de sembrado el ensayo se determinó la altura y el número de hojas de tres plantas elegidas al azar en cada parcela. La extracción de plantas se realizó en los

surcos centrales de cada parcela. Asimismo, muestras de las mismas se secaron a 65 °C hasta peso constante y se obtuvo el peso seco de 3 plantas/parcela. Luego, se las molió hasta obtener una textura tipo polvo, al cual se le analizó el N-total por el método de Kjeldhal. Para este análisis se enviaron 0,5 g de muestra al Laboratorio de Suelos, IECA-UN-CIEP de la Facultad de Ciencias, Udelar. Por otra parte el personal de ALUR S.A. determinó: 1) La población: el n° de tallos por hectárea (NTH), 2) el rendimiento cultural: las toneladas de caña por hectárea (TCH), 3) el peso de tallos individuales (PT), 4) el rendimiento industrial teórico: % de azúcar (RIT), 5) el rendimiento final: toneladas de azúcar por hectárea (TAH), 6) Fibra (FIB), 7) daños por *Diatraea saccharalis*, (DIATINT), 8) el largo de cañas individuales (LARCAÑA) y 9) el número de entrenudos (ENTR). Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat usando ANAVA con un $p < 0,05$. En caso de obtener diferencias significativas, los tratamientos fueron comparados usando el test de Tukey (29).

Estudio de la interacción entre *Enterobacter* sp.UYSO10 y plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 mediante microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido

El aislamiento *Enterobacter* sp. UYSO10 fue seleccionado para la realización de estudios de infección, colonización y abundancia, teniendo en cuenta su capacidad de promover el crecimiento

de plantas de la variedad LCP 85-384 en invernáculo. Plantas micropropagadas en etapa de enraizamiento de la variedad LCP 85-384 fueron transferidas a un nuevo frasco conteniendo medio de cultivo MS modificado (85). Al tercer día los frascos que no mostraron contaminación fueron inoculados con 1×10^7 células/planta de *Enterobacter* sp. UYSO10. Como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. Las plantas fueron cosechadas a las 6, 12, 24, 48 horas y 6 días post inoculación (pi), separándose el tejido aéreo del radicular. Las muestras fueron guardadas en PBS: H₂O (1:10) hasta su análisis. Por cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones. Como tejido de estudio, se seleccionaron la base del tallo y las raíces, por ser los sitios con mayor probabilidad de encontrar bacterias endófitas, así como los cultivos puros para su comparación. En el caso de las muestras para los estudios de microscopía óptica o electrónica de transmisión, las muestras fueron seccionadas y tratadas según las recomendaciones (49,33). Los cortes se visualizaron en microscopio óptico de campo claro utilizando los lentes: 10x, 20x, 40x y 100x o en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-900. Para el caso de estudios de microscopía electrónica de barrido, las muestras fueron tratadas según las recomendaciones (63) y observadas en un Digital Scanning Microscope Zeiss DSM-962.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de las variedades de caña de azúcar utilizadas por los productores de ALUR, con mayor capacidad de FBN (metodología de ¹⁵N)

Abundancia natural del ¹⁵N

El objetivo de esta aproximación fue el de conocer si ocurre un aporte de N atmosférico a las plantas de caña en condiciones naturales de campo. Para esto se empleó el método de abundancia natural del ¹⁵N, utilizando diferentes especies como plantas controles, elegidas

dentro de los cultivos de caña estudiados. En el Cuadro 1 se muestran los valores de %Nda obtenidos en las variedades de caña teniendo en cuenta los diferentes niveles de fertilización así como los controles utilizados. En la tabla mencionada, se presentan dos valores de %Nda para la caña: 1-utilizando los valores promedios de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas control, 2- utilizando el valor de $\delta^{15}\text{N}$ del sorgo. El sorgo es una gramínea con similares características a la caña de azúcar, que mostró un valor de $\delta^{15}\text{N}$ alto en comparación con las restantes plantas control. La crotalaria, leguminosa utilizada como control positivo, presentó el valor de $\delta^{15}\text{N}$ más bajo, demostrándose como era de esperar, una alta fijación de N₂ (5).

Los valores de %Nda de las muestras de caña de azúcar, mostraron diferencias significativas independientemente del control utilizado, siendo la variedad TUC 77-42 (SF) la que obtuvo un valor notoriamente mayor. Al utilizar al sorgo como planta control, los valores de %Nda de las muestras de caña oscilaron entre 13 y 70%, mientras que al utilizar el promedio de las plantas control oscilaron entre 15 y 62%. Estos resultados demuestran que, en condiciones de campo, las plantas de caña sin fertilización nitrogenada, toman el N mayoritariamente de la atmósfera, al presentar valores de %Nda mayores. En las plantas de caña con una fertilización nitrogenada equivalente a 50 y 150 kg N/ha, no se encontró una correlación con el valor de %Nda de las muestras (Cuadro 1). Sin embargo se pudo comprobar un aporte del N₂ atmosférico por parte de las diferentes variedades de plantas. Estos datos están en correlación con los resultados obtenidos empleando la técnica de dilución isotópica del ¹⁵N así como con la literatura (5,6).

Dilución isotópica del ¹⁵N

La capacidad FBN por las tres variedades (CP 92-618, TUC 77-42 y LCP 85-384), fue estimada mediante el método de dilución isotópica utilizando una variedad de sorgo y maíz como plantas referencia, a 2 niveles de fertilización 10 y 50 mg N kg⁻¹ (F10 y F50, respectivamente). Los valores de % de átomos de ¹⁵N en exceso de la parte aérea y de la

Cuadro 1. Evaluación de la capacidad FBN de 5 cultivares de caña de azúcar cultivadas en Uruguay, en tres niveles de fertilización nitrogenada, utilizando el método de abundancia natural del ^{15}N

Cultivo	Fertilización Nitrogenada ¹	$\delta^{15}\text{N}^2$	%Nda ³ caña	%Nda ⁴ caña
TUC 77-42	AF	5,72	26,77	41,66
LCP 85-384	AF	7,84	-----	20,03
TUC 77-42	SF	2,99	61,74	69,52
TUC 77-42	BF	6,57	15,86	32,97
LCP 85-384	BF	6,02	22,88	38,56
FAM 81-77	n.d.	7,83	-----	20,15
CP 92-618	n.d.	6,07	22,31	38,11
TUC 95-24	n.d.	8,46	-----	13,67
Control sorgo (-)	n.d.	9,8	-----	-----
Control (-) promedio	n.d.	7,8	-----	-----
Control crotalaria (+)	n.d.	0,2	-----	-----

¹AF: alta, 150kg N/ha; BF: baja, 50Kg N/ha; SF: sin fertilizar, sin fertilizar por 4-5 años. n.d.: no determinado. ² $\delta^{15}\text{N}$: relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en la planta. %Nda: porcentaje de N derivado de la atmósfera. %Nda³: %Nda calculado con el promedio de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas control. %Nda⁴: %Nda calculado con el valor de $\delta^{15}\text{N}$ del sorgo como planta control.

hoja +3 de las plantas de caña de azúcar fueron similares y significativamente menores a los de los controles a los dos niveles de fertilización (Cuadro 2). Valores similares de peso seco aéreo fueron observados entre las diferentes variedades de caña de azúcar a los dos niveles de fertilización ensayados sin embargo la media del N acumulado por la caña de azúcar fue 90 y 60% mayor que las plantas de referencia a F10 y F50 respectivamente. Estos resultados indican que las 3 variedades de caña de azúcar obtienen aportes de N mediante la fijación biológica del N y que el %Nda, estimado para la parte aérea fue entre 41,3 y 58,8% a F10, mientras que a F50 fue entre 34,8 a 49,7% (Cuadro 2).

Los resultados del ensayo de dilución isotópica del ^{15}N en invernáculo apoyan la hipótesis de que existe una contribución de la FBN en los 3 cultivares de caña de azúcar plantados en nuestro país y que la misma es afectada por los niveles de fertilización nitrogenada. Estos resultados son consistentes con la literatura en el tema, particularmente en Brasil (6,86). Variaciones en los rangos de contribución de FBN en caña de azúcar (0-72 %) han sido reportados, debidas básicamente a los diferentes cultivares ensayados,

los niveles de fertilización nitrogenada así como los factores ambientales empleados (26,38,86,94). Este es el primer reporte en el país en el cual se demuestra una contribución de la FBN en variedades de caña de azúcar cultivadas.

Aislamiento de endófitos-diazótrofos asociados a las variedades de caña de azúcar en condiciones naturales

En el marco de este proyecto se construyó la primera librería de posibles endófitos nativos asociados a las diferentes variedades cultivadas en Uruguay, la cual contiene unos 596 aislamientos (Figura 4). Debido a que los productores propagan la caña de azúcar a partir de los tallos, nos focalizamos en aislar las bacterias que estaban presentes en los tejidos internos de los mismos. Cabe destacar que no se obtuvieron diferencias significativas en el número de bacterias contadas en placa, al compararse los diferentes cultivares o los diferentes niveles de fertilización nitrogenada. En total se obtuvieron unos 66 morfotipos diferentes al crecer la colección en placas conteniendo medio rico TY.

Cuadro 2. Evaluación de la capacidad FBN de tres cultivares de caña de azúcar cultivadas en Uruguay, en dos niveles de fertilización nitrogenada, utilizando el método de dilución isotópica del ^{15}N

Cultivo	% ^{15}N ae		% Nda (M) ¹ Parte aérea	% Nda (S) ² Parte aérea	Peso seco aéreo (g planta ⁻¹)	Concentración de N parte aérea (mg g ⁻¹ peso seco)	N total (mg planta ⁻¹)
	Parte aérea	Hoja ⁺³					
F10							
CP 92-618	0,17c	0,17a	50,3 a	58,8 a	19,39b	10,4a	203,1a
Tuc 77-42	0,23c	0,20a	41,3 a	51,4 a	25,36a	7,8b	207,6a
LCP 85-384	0,19c	0,20a	51,6 a	58,3 a	25,68a	6,4 bc	167,1b
Maíz	0,39 b	-	-	-	20,56	3,9c	79,9b
Sorgo	0,47 a	-	-	-	27,52	4,3c	117,8b
CV (%)	19,1	24,6	23,4	28,0	17,2	13,8	15,8
F50							
CP	-	-	-	-	-	-	-
TUC1	1,33b	1,11a	34,8a	44,3a	26,86a	7,5b	199,7a
LCP	0,99c	1,06a	41,2a	49,7a	24,88a	7,7a	188,5a
Maíz	1,69a	-	-	-	18,52	5,0b	86,2b
Sorgo	1,97a	-	-	-	23,25	6,7ab	156,9a
CV (%)	17,7	22,6	17,3	27,1	19,5	17,6	16,7

% ^{15}N a.e.: % de átomos en exceso de ^{15}N ; % Nda: % de N derivado de la atmósfera calculado con ¹ maíz y ² sorgo como cultivos controles. Los valores en cada columna seguidos por distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD 0.05. CV: coeficiente de variación (%).

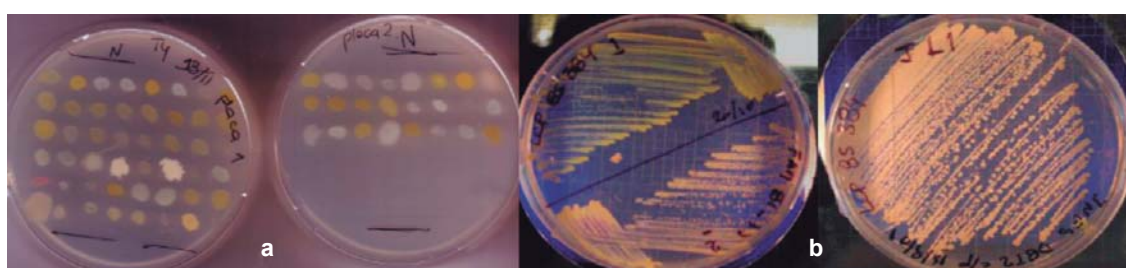


Figura 4. Aislamientos de bacterias endófitas a partir de medios semisólidos selectivos sin N. **a** y **b**-Diferentes morfotipos y aislamientos obtenidos respectivamente.

Determinación de la capacidad de fijar nitrógeno por los aislamientos bacterianos

Con este fin y en primera instancia, toda la colección fue evaluada por su capacidad de crecer en los medios semisólidos sin N: JNFb, LGI-P y LGI. Como resultado de esa aproximación, 180 aislamientos fueron capaces de producir una película de crecimiento característico de bacterias diazótrofes (Figura 5a-c).

Posteriormente a los aislamientos formadores de películas en medios semisólidos sin N mencionados, se les evaluó la presencia del gen *nifH* por PCR, encontrándose 103 de los mismos positivos (Figura 5d). La diversidad genómica de los aislamientos *nifH* positivos fue analizada por ERIC-PCR encontrándose 26 grupos diferentes con una similitud del 80%. De este último grupo, solo 12 aislamientos mostraron la capacidad de reducir el acetileno en los ensayos de ARA (Cuadro 4). Diversos estudios han repor-

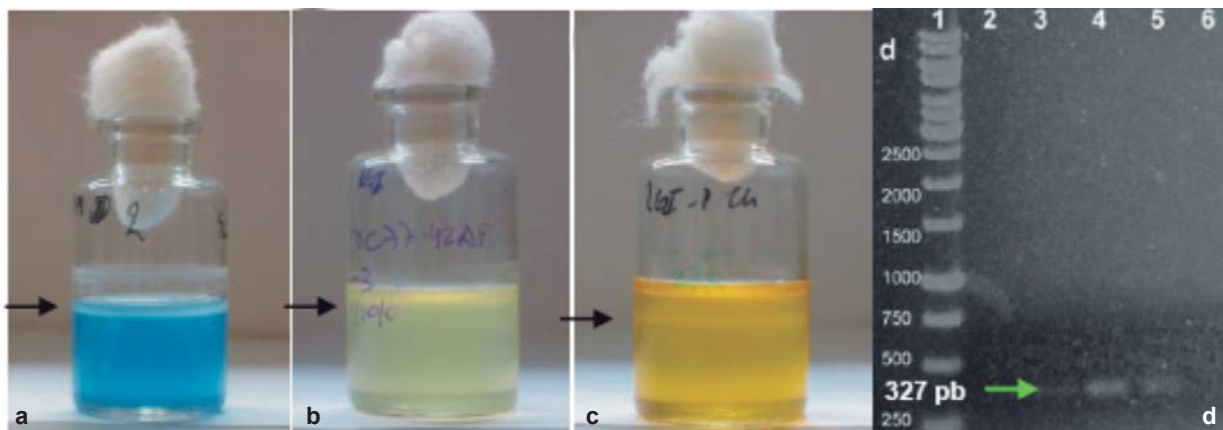


Figura 5. Búsqueda de aislamientos diazotróficos en la colección. **a, b y c-** Visualización de la altura de la película de crecimiento de bacterias diazotróficas en medio semisólido sin N. **a-** película de crecimiento superficial, **b-** película de crecimiento sub-superficial y **c-** película de crecimiento baja. **d-** amplificación por PCR del gen *nifH*. Carriles: **1-** Marcador de peso molecular: Generuler 1 Kb Fermentas, **2-** control negativo de la PCR, **3 al 5-** aislamientos que amplificaron el gen *nifH*, **6-** aislamiento que no amplificó el gen *nifH*.

tado colecciones de endófitos que poseen el gen *nifH* pero sin embargo presentan un bajo porcentaje de aislamientos ARA-positivos (15). Una explicación posible es que debido a la gran variedad de géneros bacterianos aislados, las condiciones empleadas en el ensayo de ARA no hayan sido las óptimas para la expresión de la nitrogenasa en muchos de los aislamientos. Asimismo puede ser que los cebadores utilizados no sean los óptimos para poder detectar el gen *nifH* en una colección de aislamientos tan diversa.

Identificación de los aislamientos bacterianos y análisis filogenético

Mediante la amplificación por PCR y secuenciación del gen *16S ARNr* se identificaron en la colección, bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium* y *Shinella* (Alfaproteobacterias) y al género *Achromobacter* (Betaproteobacterias) (Cuadro 3). Sin embargo, el grupo más numeroso y diverso de bacterias aisladas en el presente trabajo pertenece a las Gammaproteobacterias, representado por los géneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhanelia*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas* (Cuadro 3 y Figura 7). Es importante mencionar que mediante la metodología empleada en este trabajo, no se obtuvieron aislamientos correspondientes a

miembros de géneros diazotróficos típicamente asociados a caña de azúcar (ej.: en Brasil), tales como *Herbaspirillum*, *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum* o *Burkholderia*, todos los cuales pertenecen a las Alfa o Betaproteobacterias (30). Una explicación posible es que la composición de la comunidad de endófitos depende de la especificidad entre la bacteria y el genotipo de la planta, el clima, el tipo de riego así como los niveles de fertilización utilizados (61). Es también de destacar que en el presente trabajo, las bacterias fueron aisladas de tallos de caña de azúcar y que los aislamientos endófitos-asociativos mencionados anteriormente son más abundantes en las raíces (8,31–33,62).

Por otra parte, es interesante el hecho de que aunque los posibles endófitos aislados fueron provenientes de plantas saludables, algunos de los géneros identificados han sido reportados como fitopatógenos de otras especies vegetales como por ej. *Agrobacterium tumefaciens* y *Xanthomonas albilineans*. Más aún, posibles patógenos de humanos también fueron identificados, incluyendo *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter ludwigii* (65, 66) sin embargo y a pesar del potencial patogénico de una minoría de los aislamientos, varios de los géneros identificados en el presente estudio han sido reportados como endófitos PCV asociados a diferentes cultivos incluyendo, pero no ex-

Cuadro 3. Similitud de las secuencias nucleotídicas del gen *16s ARNr* de los aislamientos bacterianos endófitos de cultivares comerciales de caña de azúcar

Aislamiento	Variedad de caña de azúcar	Grupo ERIC	Mejor candidato	Similitud (%)	Nº de acceso en la base de datos NCBI
UYSO01	CP 92618	5	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain X96 (HM137034)	99	JF262577
UYSO02	CP 92618	10	<i>Alcaligenes</i> sp. isolate 159 (AJ002804)	99	JF262578
UYSO03	TUC 7742	4	<i>Acinetobacter</i> sp. BMC-4 (GU451168)	99	JF262567
UYSO04	TUC 7742	26	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain 30D (GQ337862)	99	JF262579
UYSO05	TUC 7742	17	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262584
UYSO06	LCP 85384	17	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262585
UYSO07	LCP 85384	17	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262586
UYSO08	TUC 7742	17	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262587
UYSO09	TUC 7742	19	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain K9 (EF175735)	99	JF262588
UYSO10	FAM 8177	24	<i>Enterobacter</i> sp. HY241 (EU784139)	99	JF262582
UYSO11	TUC 7742	2	<i>Pantoea ananatis</i> strain pY2-2 (EU331415)	99	JF262565
UYSO12	LCP 85384	9	<i>Pantoea</i> sp. J1-13-7a (EU816766)	99	JF262566
UYSO13	CP 92618	7	<i>Pantoea agglomerans</i> strain BJCP2 (HM130693)	99	JF262564
UYSO14	TUC 7812	7	<i>Pseudomonas</i> sp. MW6 (HQ231962)	99	JF262570
UYSO15	TUC 7742	14	<i>Pseudomonas</i> sp. KW20 (HQ231956)	99	JF262571
UYSO16	TUC 7742	14	<i>Pseudomonas</i> sp. KW20 (HQ231956)	99	JF262572
UYSO17	LCP 85384	25	<i>Pseudomonas</i> sp. GXSCRI B5 (DQ666336)	100	JF262568
UYSO18	LCP 85384	25	<i>Pseudomonas</i> sp. GXSCRI B5 (DQ666336)	100	JF262569
UYSO19	FAM 8177	27	<i>Pseudomonas</i> sp. DK2009-3a (FN600406)	100	JF262574
UYSO20	FAM 8177	N.D.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> S16 (DQ095904)	99	JF262575
UYSO21	FAM 8177	N.D.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 14675 (GU198125)	99	JF262576
UYSO22	TUC 7742	4	<i>Rahnella</i> sp. Pc201 (EU333141)	99	JF262562
UYSO23	TUC 7742	11	<i>Rahnella</i> sp. Pc201 (EU333141)	99	JF262563
UYSO24	TUC 7742	N.D.	<i>Shinella</i> sp. CTN-13 (FJ598327)	99	JF262583
UYSO25	TUC 7812	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262559
UYSO26	LCP 85384	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	100	JF262555
UYSO27	TUC 7812	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262558
UYSO28	LCP 85384	8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262556
UYSO29	CP 92618	12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262560
UYSO30	FAM 8177	13	<i>Stenotrophomonas</i> sp. I_Gauze_K_8_5 (FJ267572)	99	JF262561
UYSO31	TUC 7742	15	<i>Stenotrophomonas</i> sp. DNPA8 (FJ404810)	100	JF262573
UYSO32	LCP 85384	N.D.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	99	JF262557
UYSO33	TUC 7742	N.D.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PSM-6 (GQ267817)	100	JF262554
UYSO34	LCP 85384	18	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> strain G-7 (FJ493060)	100	JF262580
UYSO35	TUC 7742	22	<i>Xanthomonas</i> sp. Aed03 (EU740995)	100	JF262581



Figura 6. Árbol filogenético de los aislamientos pertenecientes a las Alfa y Betas-proteobacterias basado en secuencias del gen *16S ARNr*. El árbol fue construido con el programa Mega4 (81) usando el algoritmo de Neighbour-joining (67) y empleando el modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros. La robustez de cada rama fue estimada con un bootstrap de 1000 replicas (73). La cepa de referencia *Bacillus subtilis* (HQ536002.1) se usó como grupo externo.

clusivamente a la caña de azúcar (65, 66).

Árboles filogenéticos fueron construidos en base a la secuencia del gen *16S ARNr* para las Alfa, Betaproteobacterias y las Gammaproteobacterias (Figura 6 y 7 respectivamente).

Los resultados mostraron que la clase más abundante y diversa en la colección fueron las Gammaproteobacterias. Dentro del orden Enterobacteriales, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Rhanella* y *Serratia* spp. han sido previamente reportadas como endófitos y/o asociadas a varios cultivos de Poaceas. Por ejemplo, especies de *Pantoea* fueron descritas como diazotrofos asociados a caña de azúcar y maíz (45,47), así como endófitos de arroz (90). Particularmente, especies pertenecientes al género *Enterobacter* han sido frecuentemente aisladas como endófitos asociados a varias plantas (65) y varias han sido reportadas como PCV de caña de azúcar (46). Por su parte la bacteria *Rhanella aquatilis* es conocida por su capacidad biocontroladora de patógenos en plantas de manzanas y tomates (9) y ha sido reportada como FBN en la rizósfera de maíz y trigo (3) así como un posible endófito de plantas de algodón (15).

El orden Pseudomonadales de las Gammaproteobacterias está también representado en la colección, habiéndose identificado los aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Acine-*

tobacter. Miembros de estos géneros han sido extensamente reportado como PCV, así como probables endófitos-diazotrofos asociados a plantas de algodón y caña de azúcar (15,41,85). En particular, *A. baumannii* LMG 1041, la cual fue aislada como probable endófitas asociada a soja, posee varias potenciales características PCV (36).

Finalmente, el orden de las Xanthomonadales, perteneciente a las Gammaproteobacteria, estuvo representado por el género *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*. Como se mencionó anteriormente, aislamientos relacionados a *S. maltophilia* fueron identificados en la colección. Dicha cepa fue reportada en primera instancia como patógeno humano, sin embargo recientemente también ha sido reportada como PCV de diversos cultivos de importancia agronómica (28). Más aún y de particular importancia para este trabajo, la cepa *S. pavanii* LMG25348, fue descrita como probable endófito-diazótrofo de caña de azúcar (59). En el caso de las *Xanthomonas* y aunque *X. albilineans* es un conocido patógeno endófito causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en plantas de caña de azúcar (33), diversas cepas no-patogénicas han sido también aisladas de suelos y plantas como probables endófitos (65).

En este trabajo, la clase Betaproteobacteria está representada por las cepas

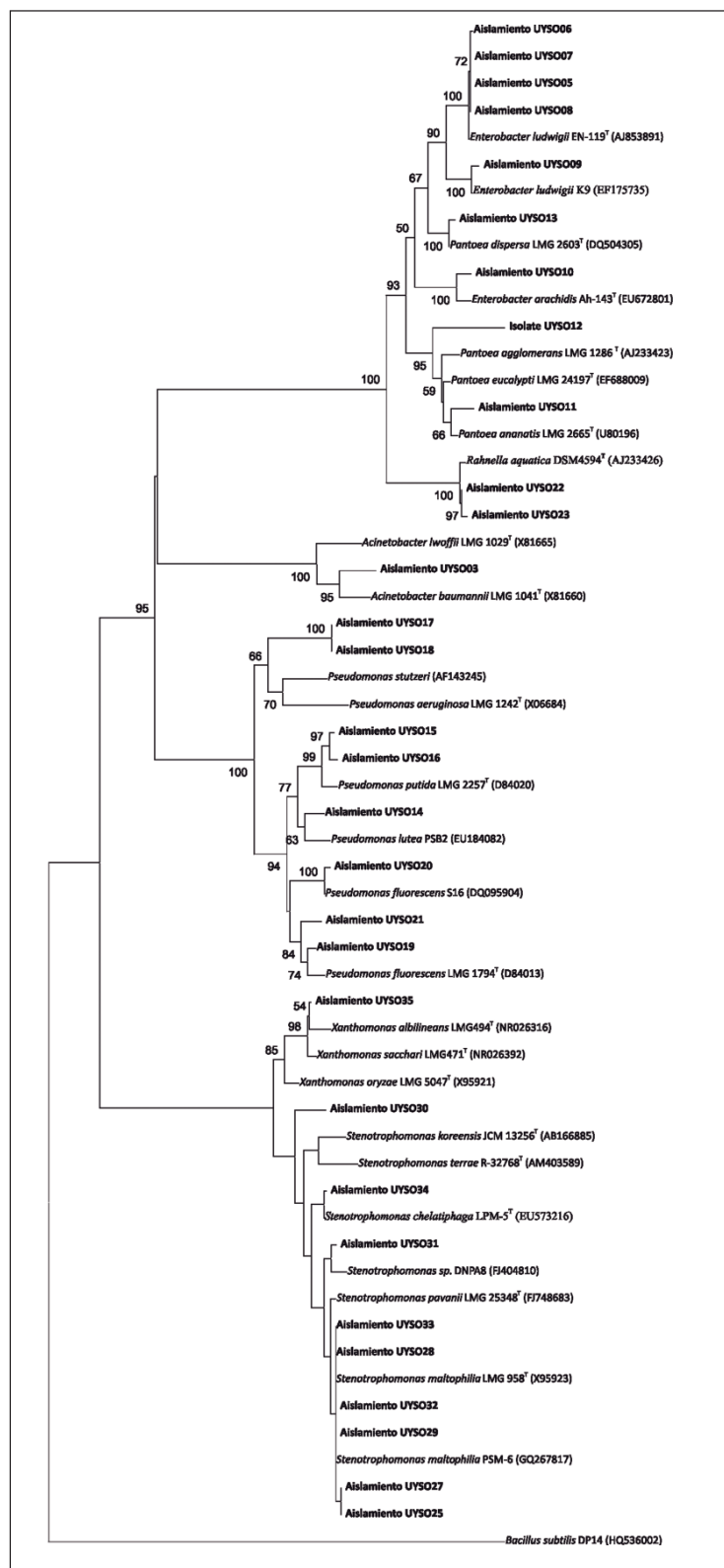


Figura 7. Árbol filogenético de los aislamientos pertenecientes a las Gama-proteobacterias basado en secuencias del gen *16S ARNr*. El árbol fue construido con el programa Mega4 (81) usando el algoritmo de Neighbour-joining (67) y empleando el modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros. La robustez de cada rama fue estimada con un bootstrap de 1000 replicas (73). La cepa de referencia *Bacillus subtilis* (HQ536002.1) se usó como grupo externo.

pertenecientes al género *Achromobacter*, algunas de las cuales han sido descritas previamente como probables endófitos asociados a plantas de citrus y girasol (65).

Los pocos aislamientos de las Alpha-proteobacteria obtenidos pertenecieron a los géneros *Agrobacterium* y *Shinella*. Aunque *Shinella* no ha sido reportada previamente como endófito, la cepa *S. kummorowiae* posee el gen *nifH* y se aisló recientemente a partir de nódulos, describiéndose como una posible bacteria simbiote (39). Por su parte y aunque el género *Agrobacterium* es bien conocido por contener ejemplares fitopatógenos, algunas cepas han sido descritas como fijadoras de N en vida libre, así como en simbiosis con leguminosas (34). Asimismo cepas del género *Agrobacterium* han sido también aisladas como probables endófitos de plantas de álamo (85).

Estudio de la capacidad de la colección de endófitos-diazótrofos de producir metabolitos con actividad promotora del crecimiento vegetal

Con la finalidad de evaluar la presencia de posibles características promotoras del crecimiento vegetal en la colección de probables endófitos nativos asociados a caña de azúcar, los aislamientos *nifH* positivos fueron seleccionados para ensayar la habilidad de solubilizar fosfatos, de producir ácido-indol acético así como de sideróforos (Cuadro 4). Los resultados mostraron que de los 103

aislamientos que presentaron el gen *nifH*, 21 fueron capaces de solubilizar fosfatos, 65 de producir AIA y 10 de producir sideróforos (Cuadro 4 y Figura 8).

La producción de fitohormonas como el AIA por bacterias y sus efectos benéficos en la promoción del crecimiento vegetal, ha sido extensamente reportado (71,72). Por su parte bacterias solubilizadoras de fósforo y hierro juegan un importante rol en las interacciones planta-microorganismo así como en el biocontrol de fitopatógenos (64,72,89). El poder disponer de una colección bacteriana que posea diferentes características PCV, es esencial para el desarrollo de bioinoculantes efectivos en cultivos agrónomicamente importantes, como lo es la caña de azúcar. Aquellas cepas que posean una o alguna de ellas serán candidatos muy prometedores para futuros experimentos de promoción del crecimiento vegetal.

Caracterización fisiológica de los aislamientos: capacidad de crecer en diferentes fuentes de C, N y determinación de la resistencia intrínseca a antibióticos

Para esta caracterización, se seleccionaron las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Panotea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, teniendo en cuenta sus características PCV observadas *in vitro*.



Figura 8. Características PCV en los aislamientos de la colección. **a-** ensayo colorimétrico de Sarkowski para evaluar la producción de AIA, un aislamiento positivo presenta coloración roja en el pocillo de la placa. **b-** ensayo de solubilización de fosfatos, un aislamiento positivo presenta un halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana. **c-** ensayo de sideróforos, un aislamiento positivo presenta un halo amarillo alrededor de la colonia bacteriana.

Cuadro 4. Características PCV de los aislamientos nativos endofíticos asociados a variedades comerciales de caña de azúcar

Aislamiento	Variedad de caña de azúcar	Grupo ERIC	ARA	Producción de IAA (µg/ml)	Solubilización de fosfatos (relación halo/colonia)	Producción de sideróforos (relación halo/colonia)
UYSO02	CP 92618	10	-	14,7	2,1	-
UYSO03	TUC 7742	4	+	10,0	2,7	1,9
UYSO05	TUC 7742	17	-	17,0	-	-
UYSO06	LCP 85384	17	-	15,6	1,8	-
UYSO07	LCP 85384	17	-	16,8		N.D.
UYSO08	TUC 7742	17	-	13,4	-	-
UYSO09	TUC 7742	19	-	-	1,9	-
UYSO10	FAM 8177	24	+	10,7	-	-
UYSO11	TUC 7742	2	-	16,8	3,0	2,4
UYSO12	LCP 85384	9	-	19,8	-	2,1
UYSO13	CP 92618	7	-	13,9	2,3	-
UYSO14	TUC 7812	7	+	-	-	-
UYSO15	TUC 7742	14	-	-	-	1,6
UYSO16	TUC 7742	14	-	14,8	-	1,4
UYSO17	LCP 85384	25	-	16,0	-	-
UYSO18	LCP 85384	25	-	17,2	-	N.D.
UYSO19	FAM 8177	27	+	-	1,6	1,9
UYSO20	FAM 8177	N.D.	-	22,6	-	-
UYSO21	FAM 8177	N.D.	+	13,0	-	1,7
UYSO22	TUC 7742	4	+	41,1	1,1	-
UYSO23	TUC 7742	11	+	35,6	-	-
UYSO24	TUC 7742	1	+	11,4	-	-
UYSO25	TUC 7812	1	-	6,9	-	-
UYSO26	LCP 85384	3	-	6,9	-	-
UYSO27	TUC 7812	3	+	13,7	-	-
UYSO28	LCP 85384	8	-	16,2	-	1,9
UYSO29	CP 92618	12	-	31,8	-	-
UYSO30	FAM 8177	13	+	-	-	-
UYSO32	LCP 85384	N.D.	-	17,6	-	-
UYSO33	TUC 7742	N.D.	-	7,6	2,9	-
UYSO34	LCP 85384	18	-	-	-	3,2
UYSO35	TUC 7742	23	-	-	-	2,8
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5			+	31,9	N.D.	N.D.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> H54			+	15,4	N.D.	N.D.
<i>Burkholderia tropica</i> PP8			+	0	5,0	N.D.
<i>Azospirillum amazonensis</i> CBAMC			+	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021			N.D.	N.D.	N.D.	2,2

Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Las bacterias suelen presentar diferentes requerimientos de fuentes de C y N para su crecimiento. En particular, en el estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, dicha información es muy útil para delinear las estrategias para su aplicación biotecnológica, como por ejemplo la selección de en qué medios de cultivos es más viable, desde el punto de vista industrial, crecer los aislamientos. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en el Cuadro 5, en la misma se observa que las cepas ensayadas, presentaron similar crecimiento en las diferentes fuentes de C y N evaluadas. Sin embargo, la sacarosa y la glucosa (a 5g/l) y los aminoácidos L-tirosina, L-asparagina y L-ácido glutámico, así como el NH_4Cl ; fueron las fuentes más utilizadas de C y N respectivamente. Cuando se ensayaron la sacarosa y Acnr en concentraciones de 100 y 200g/l, se observó que en ambas concentraciones la sacarosa fue la más utilizada (Cuadro 5).

En general, todas las cepas presentaron alta versatilidad en la utilización de las fuentes de C y de N (Tabla 5). Por su parte la cepa de referencia, *G. diazotrophicus* PAI-5 fue la única que no utilizó el ácido málico como fuente de C. Todas las cepas presentaron un máximo crecimiento en la fuente de C de donde fueron aisladas (ácido málico y sacarosa), con la excepción de la cepa *Stenotrophomonas* sp. UYSO27. Asimismo y si bien, la mayoría de las cepas presentaron valores similares de crecimiento en las fuentes de C y N ensayadas, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27 presentó un crecimiento notoriamente menor y uniforme al resto (Cuadro 5). Una característica importante de resaltar, es que todas las cepas crecieron en glicerol y Acnr, las cuales son fuentes económicas de C y accesibles en nuestro país, lo que se señala como propiedad positiva a tener en cuenta en la formulación de medios de cultivo bacterianos a escala industrial. Por otro lado, fue notorio la producción de una sustancia gomosa en el medio de cultivo (probablemente exopolisacáridos), de las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Rhanella* sp. UYSO22 en comparación a las restantes cepas (Cuadro 5).

Resistencia intrínseca a antibióticos

La resistencia intrínseca a antibióticos fue evaluada en los aislamientos mencionados. El poseer resistencia a uno o más antibióticos les confiere a las bacterias, ventajas competitivas con respecto a otras cepas, además de ser una herramienta experimental importante para el desarrollo de protocolos. Esta resistencia se estudió para 4 antibióticos: kanamicina (Km), estreptomycin (Str), espectinomycin (Spc) y ampicilina (Amp) a diferentes concentraciones. Dichos antibióticos fueron seleccionados debido a que todos actúan sobre bacterias Gram negativas y pertenecen a diferentes grupos de antibióticos: la kanamicina y estreptomycin son antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, la espectinomycin de los glicopéptidos y la ampicilina de los betalactámicos.

Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 6, donde se puede observar que todas las cepas mostraron resistencia a la ampicilina y a la espectinomycin, siendo en el primero donde se observaron mayores niveles de resistencia, con valores superiores a 1000mg/l. Por su parte, las cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13 y *Pseudomonas* sp. UYSO21, no mostraron resistencia a la estreptomycin ni a la kanamicina, mientras que *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Shinella* sp. UYSO24, no fueron capaces de crecer en presencia de kanamicina únicamente. Más detalladamente, *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, mostraron resistencia a 450mg/l de estreptomycin; *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, resistieron concentraciones de 1000mg/l de ampicilina; *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, presentaron resistencia a concentraciones de 650mg/l de kanamicina; mientras que las cepas *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, mostraron resistencia en 800mg/l de espectinomycin. Por lo tanto, las cepas *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, no solo presentaron resistencia intrínseca a todos los antibióticos, sino que lo hicieron en las mayores concentraciones evaluadas.

Cuadro 5. Caracterización bioquímica de aislamientos seleccionados de la colección

	Aislamientos ensayados								
	UYSO02	UYSO03	UYSO10	UYSO13	UYSO21	UYSO22	UYSO24	UYSO27	PAL-5
	Fuentes de C								
Sacarosa (5 g/l)	++	++	++*	++	++	++*	++	+	++
Sacarosa (100 g/l)	+	++	++*	++	++	++*	++	+	++
Sacarosa (200 g/l)	+	+	+	++	+	++*	+	+	++
Glucosa	++	++	++*	++	++	++	++	+	++
Glicerol	++	+	++*	++	++	++*	++	+	++
Ácido málico (5 g/l)	++	++	++	++	++	++	++	+	-
Manitol	+	+	++*	++	++	++*	++	+	++
Acnr (5 g/l)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acnr (100 g/l)	+	++	++*	++	++	++	+	+	++
Acnr (200 g/l)	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Fuentes de N (5 mM)									
NH ₄ Cl	++	++	++	++	++	++	++	+	++
L-Tyr	++	++	++	++	++	++	++	+	++
L-Asn	++	++	++	++	++	++	++	+	++
L-Glu	++	++	++*	++	++	++*	++	+	++
(NH ₄) ₂ SO ₄	++	++	++	+	++	++	++	+	++
KNO ₃	+	++	++	++	++	++*	++	+	++

Acnr: azúcar de caña no refinada, (NH₄)₂SO₄: sulfato de amonio, KNO₃: nitrato de potasio, NH₄Cl: cloruro de amonio, L-Tyr: L-tirosina, L-Asn: L-asparagina, L-Glu: L-ácido glutámico. (-): sin crecimiento; (+): colonias aisladas en la estría; (++) : crecimiento continuo sin colonias aisladas. (*): formación de sustancia gomosa en el medio de cultivo.

Cuadro 6. Resistencia intrínseca a antibióticos de las cepas bacterianas

Aislamientos	Antibióticos ensayados (mg/l)			
	Str	Amp	Km	Spc
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	1/20*	250/300*	0	150/200*
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	0	100/150*	0	100/150*
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	0	45/50*	0	15/20*
<i>Pantoea</i> sp. UYSO13	0	50/100*	0	10/20*
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	0	>1000**	0	150/200*
<i>Rhanella</i> sp. UYSO22	>450**	>1000**	>650**	>800**
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	40/50*	>1000**	0	300/350*
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27	>450**	>1000**	>650**	>800**
<i>G. diazotrophicus</i> PAI-5	50/100*	200/250*	40/50*	50/100*

Str: estreptomicina, Amp: ampicilina, Km: kanamicina, Spc: espectinomicina. (0): No resistente, (*)Resistente/NO resistente. (**)Resistente a concentraciones mayores. En negrita se destacan los valores mayores.

Evaluación del crecimiento vegetal en invernáculo en respuesta a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas

En plantas de cañas de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384

En este ensayo, los aislamientos *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Rahnella* sp. UYSO22, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Pseudomonas* sp. UYSO21 y *Shinella* sp. UYSO24, fueron seleccionados de acuerdo a sus características PCV *in vitro*, así como a los

géneros bacterianos a los que pertenecen. Como referencia se utilizó la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 y como control negativo se utilizaron plantas sin inocular. Los resultados obtenidos para las variables biométricas medidas se presentan en la Figura 9 y en el Cuadro 7. Como se observa en la misma, los tratamientos inoculados con *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 se diferenciaron significativamente ($p < 0,05$) del control negativo para las variables: peso seco aéreo y diámetro del tallo. En cuanto al peso seco radicular *Shinella* sp. UYSO24 y *Acinetobacter* sp. UYSO03 mostraron diferencias significativas con el control. Por otro lado y con el fin de determinar si habían diferencias en el crecimiento de la planta se calculó la relación peso seco aéreo/peso seco radicular. Los análisis mostraron que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados (datos no mostrados). Por último, cuando se evaluó la altura de los tratamientos, se observó que las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10, *Shinella* sp. UYSO24, *Pantoea* sp. UYSO13, *Rahnella* sp. UYSO22, el MIX de aislamientos y *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 se diferencian significativamente del control (Cuadro 7). Es de resaltar que el tratamiento inoculado con la cepa *Shinella* sp. UYSO24 mostró diferencias significativas con el control para todas las variables medidas y que la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10 para tres de ellas (Cuadro 7).

Varios estudios realizados en plantas de caña de azúcar inoculadas con bacterias aisladas de los mismos cultivos han mostrado un efecto promotor del crecimiento vegetal dependiendo, en ciertas ocasiones, de la especificidad genotipo planta-genotipo bacteria. Este hecho justificó la creación de una colección de bacterias adaptadas a las variedades y a las condiciones de plantación del cultivo en Uruguay, así como a la evaluación de las mismas como promotoras del crecimiento de las variedades de caña de azúcar utilizadas en el país. En los puntos anteriores se describió la generación de una colección de bacterias aisladas a partir de cultivos de caña cultivadas en nuestro país y su caracterización en búsqueda de capacidades PCV *in vitro*. En el presente estudio la estrategia adop-



Figura 9. Vista del ensayo de PCV de plantas de cañas de azúcar micropropagadas de la variedad LCP-85-384, inoculadas con diferentes aislamientos de interés. **De izquierda a derecha:** plantas inoculadas con *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, aislamientos ensayados (**a**-*Enterobacter* sp. UYSO10 y **b**-*Shinella* sp. UYSO24) y control negativo sin inocular.

Cuadro 7. Respuestas de plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384, a la inoculación con aislamientos seleccionados

Tratamiento	Variables evaluadas			
	Peso seco (g)		Diámetro (cm)*	Altura (cm)*
	Aéreo	Radicular		
Control	0,72 a**	1,29 a	5,09 a	8,14 a
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO14	0,93 a	1,75 ab	5,36 ab	9,04 ab
<i>Pantoea</i> sp. UYSO13	0,97 ab	1,82 abc	5,29 ab	10,34 bcd
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	1,08 abc	1,93 bc	5,77 ab	9,64 abc
<i>Rhanella</i> sp. UYSO22	1,09 abc	1,71 ab	5,97 ab	10,14 bcd
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	1,10 abc	1,75 ab	5,97 ab	10,73 cd
MIX	1,11 abc	1,85 abc	5,7 ab	10,42 bcd
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO010	1,46 c	1,6 ab	6,4 b	10,18 bcd
<i>Shinella</i> sp. UYSO024	1,37 bc	2,34 c	6,19 b	11,13 d

MIX: Tratamiento que incluye la mezcla de las 6 cepas ensayadas en este estudio. *Los datos fueron transformados para cumplir los requisitos para aplicar el test de ANAVA. **Letras diferentes muestran diferencias significativas aplicando el test de Tukey con un $p < 0,05$.

tada para la evaluación de bacterias seleccionadas por sus características PCV *in vitro*, fue la inoculación de plantas de caña de azúcar en sistemas asépticos y controlados de laboratorio, proyectando sentar la base para futuros ensayos en sistemas más complejos. Las condiciones de inoculación de plantas de caña de azúcar micropropagadas con el objetivo de favorecer la colonización endofíticas, fue descrita y optimizada para *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (32,63). Posteriormente, en diversos estudios se ha evaluado los efectos PCV de bacterias asociadas o endófitas sobre plantas micropropagadas así como su distribución en los tejidos de la planta (48,51,71). Normalmente en los ensayos de PCV, las plantas son inoculadas en la etapa de micropropagación para después ser transferidas a maceta de forma de permitir el desarrollo de la misma. Dependiendo de los objetivos planteados las macetas se mantienen hasta su cosecha en el invernáculo o se considera ésta una etapa de aclimatación, cuando el destino final es su plantación en el campo (21,53). Utilizando la metodología recomendada en la bibliografía, los aislamientos mencionados, fueron evaluados en invernáculo y comparados con la cepa de referencia *G. diazotrophicus* Pal5, así como con un control sin inocular. La cosecha del ensayo se realizó a los 4 meses post-inoculación y a partir de la medición y

comparación de variables biométricas de la planta se observó que, las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 promovieron significativamente el crecimiento de las plantas. Ambas cepas mostraron, *in vitro*, la capacidad de reducir acetileno y producir ácido indol-acético bajo las condiciones ensayadas. *In vivo* promovieron el incremento del peso seco de la parte aérea así como el diámetro y altura del tallo con respecto al control y en el caso de *Shinella* se observó además, un incremento en el peso seco radicular. Si bien se observaron diferencias en el efecto causado por la inoculación de bacterias PCV a los 4 meses, no debemos descartar que los mismos se potencien o aparezcan nuevos efectos a mayores tiempos de cosecha como ha sido reportado (51). Aislamientos pertenecientes al género *Enterobacter* han sido reportados por su efecto PCV en ensayos de inoculación de plantas de arroz y en el álamo de Virginia (35,80). Particularmente en el caso de cañas de azúcar micropropagadas, se ha reportado que la inoculación con cepas pertenecientes al género *Enterobacter* resultó en la PCV de la planta y la incorporación a los tejidos vegetales de N proveniente de la FBN calculado en un 28% (46). En el caso del género *Shinella*, este es el primer estudio en que se describe como bacteria PCV en asociaciones no-simbióticas.

**En plantas de cañas de azúcar
crecidas a partir de esquejes de la
variedad LCP 85-384**

Con el fin de evaluar el efecto de la inoculación de plantas de caña de azúcar con aislamientos bacterianos en un sistema no estéril, se realizó un ensayo en invernáculo utilizando esquejes de la variedad LCP-85-384, plantados en macetas, conteniendo suelo de la zona donde se cultiva caña de azúcar y arena estéril (1:1). Para esto ocho aislamientos fueron seleccionados de acuerdo a sus características PCV, incluyéndose también, un tratamiento en el cual se inoculó conjuntamente las 8 cepas a ensayar (MIX), así como un tratamiento de referencia donde se inoculó *G. diazotrophicus* Pal5. Como control negativo se utilizaron esquejes sin inocular y sin el agregado de fertilizante y como positivo esquejes a los que se les agregó fertilizante químico nitrogenado (100 kgN/ha). El resumen de los resultados obtenidos se muestra en el Cuadro 8. Como se observa, en todas las variables ensayadas, los tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto al control positivo, confirmando así el efecto promotor del agregado de dicho nutriente (N) a la planta. En cuanto a los tratamientos

donde se utilizaron inóculos bacterianos, muchos de los mismos consiguieron diferenciarse del tratamiento control negativo. Si analizamos la variable altura se observa que todos los tratamientos a excepción de la inoculación con *Pseudomonas* sp. UYSO21 se diferenciaron significativamente del control negativo. Con referencia al diámetro del tallo de las plantas, solamente los tratamientos inoculados con *Acinetobacter* sp. UYSO03 y con *Enterobacter* sp. UYSO10 se diferenciaron del control negativo. Por su parte, cuando se evaluó el peso seco radicular se observó que todos los tratamientos, a excepción del MIX, presentaron diferencias significativas con el control negativo. En particular, es interesante destacar que aquellos tratamientos en los que se inoculó la cepa *Achromobacter* sp. UYSO02, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pseudomonas* sp. UYSO21 y *Rahnella* sp. UYSO22, no presentaron diferencias con el control positivo (fertilizado con N). En cuanto al peso seco aéreo, todos los tratamientos a excepción de *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Pseudomonas* sp. UYSO21, presentaron diferencias significativas con el control negativo. Por otro lado, se observa que todas las cepas inoculadas presentaron en promedio un 36% de incremento

Cuadro 8. Respuesta de esquejes de plantas de azúcar de la variedad LCP-85-384, a la inoculación con aislamientos seleccionados

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro tallo (mm)	Variables evaluadas			
			Peso seco (g)		[N] parte aérea (mg N/peso seco)	Acumulación de N parte aérea (mg N/planta)
			Raíz	Parte aérea		
Control nitrogenado (+)	22,20a	9,06a	1,83a	4,56a	7,06 a	32,17 a
<i>Pantoea</i> sp UYSO13	16,86b	7,19cd	1,45bcd	2,92b	4,98 ef	14,55 bcd
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	16,44b	7,56bcd	1,48abc	2,24cde	5,11 def	11,44 ef
MIX	16,43b	7,38bcd	1,10de	2,59bcd	5,09 ef	13,18 de
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27	16,36b	7,03d	1,27cd	2,72bc	5,17 cdef	14,07 d
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	16,25b	7,25cd	1,35bcd	2,67bcd	6,10 bc	16,28 bc
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	16,25b	7,99b	1,38bcd	2,64bcd	4,89 f	12,90 de
<i>G. diazotrophicus</i> Pal5	16,19b	7,41bcd	1,27cd	2,43bcd	6,84 ab	16,61 b
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	16,00b	7,72bc	1,67ab	2,36cd	6,06 bcd	14,30 cd
<i>Rhanella</i> sp. UYSO22	15,57bc	7,58bcd	1,63abc	2,67bcd	5,10 cdef	13,86 d
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	14,43cd	7,12cd	1,48abc	2,15de	6,17 ab	13,25 de
Control (-)	13,19d	6,97d	0,75e	1,79e	5,90 bcde	10,57 f

Los valores en cada columna seguidos por distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$) de acuerdo al test LSD Fisher.

en la acumulación de N de la parte aérea con respecto al control negativo. Asimismo, las cepas *Shinella* sp. UYSO24, *G. diazotrophicus* Pal5, *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Pseudomonas* sp. UYSO21 presentaron en promedio un 6% de incremento en la concentración de N de la parte aérea con respecto al control negativo.

En resumen, la inoculación con las diferentes bacterias mostraron un efecto promotor del crecimiento vegetal en varias de las características evaluadas. En particular cabe resaltar que la inoculación con la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10 se diferenció del control negativo en las 6 variables evaluadas. Los tratamientos que mostraron diferencias al menos en 5 variables fueron: *Shinella* sp. UYSO24 y *G. diazotrophicus* Pal5. Ambas cepas presentaron los mayores valores de concentración y acumulación de N en la parte aérea luego del control positivo. Estos resultados apoyan los obtenidos en el ensayo de micropropagación, mostrando a su vez el efecto PCV de más cepas. Los mismos son muy importantes ya que en este sistema, que no es estéril, las cepas deben competir por la colonización con las bacterias que ya se encuentran en el suelo y la rizósfera, así con las que se encuentran en los esquejes de la planta.

Ensayos de campo de promoción del crecimiento vegetal de la mejor combinación bacteria-variedad determinada en los ensayos de invernáculo

En condiciones de campo, se estudió la respuesta de plantas de cañas de azúcar de la variedad LCP-85-384, a la inoculación con los aislamientos *Shinella* sp. UYSO24 y *Enterobacter* sp. UYSO10 seleccionados por su capacidad de PCV en los ensayos de invernáculo. Para esto, en primera instancia se evaluó la abundancia y sobrevivencia de las cepas inoculadas en el sustrato utilizado como inoculante. Para cada cepa se determinó las unidades formadoras de colonia en el inoculante (ufc/g de turba), a los 0, 7, 30, 60, 90 y 120 días después de inoculada la turba. Los resultados mostraron que para el caso de la cepa UYSO10, a tiempo 0 se detectó un orden

de 10^9 ufc/g de turba, aumentando a los 30 días un orden (10^{10} ufc/g), disminuyendo posteriormente a 10^9 ufc/g y manteniéndose así hasta los 120 días. Para el caso de la cepa UYSO24, a tiempo 0 se obtuvo un valor del orden de 10^{10} ufc/g de turba, aumentando a los 7 días a 10^{12} ufc/g, disminuyendo a 10^{10} ufc/g hasta los 90 días y a 10^9 ufc/g a los 120 días. Estos resultados indican que las dos cepas bacterianas tuvieron una buena sobrevivencia en turba durante los días evaluados, siendo este sustrato factible de ser usado para los experimentos de campo así como para la formulación futura de un bioinoculante.

Por otra parte, se evaluó en un esqueje inoculado con cada cepa (de acuerdo al procedimiento realizado en campo) y en un esqueje no inoculado, el número de bacterias/superficie de esqueje. Los resultados mostraron que los esquejes inoculados presentaron 10^5 ufc/cm² de tallo, mostrando únicamente un tipo de colonia, mientras que los tallo sin inocular presentaron 10^4 ufc/cm² de tallo, observándose varias colonias en la placa. Estos resultados estarían mostrando un efecto marcado de la inoculación sobre la comunidad bacteriana del esqueje.

En el Cuadro 9 se muestran un resumen de los resultados obtenidos para las medidas biométricas determinadas para el ensayo de campo a los 3, 8 y 12 meses. Como se observa en la misma, no hubieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en el peso seco y %N-total de la parte aérea de la planta a los 3, 8 y 12 meses de instalado el ensayo. Asimismo, no se observaron diferencias en la concentración de N/peso seco entre los tratamientos, pero si se observaron diferencias en la acumulación de N/planta entre *Enterobacter* sp. UYSO10 y ambos controles. En la variable altura de la planta, se observó que el control negativo fue quien obtuvo un valor mayor a los restantes tratamientos, diferenciándose significativamente del tratamiento inoculado con *Enterobacter* sp. UYSO10. Por el contrario, en el número de hojas, *Enterobacter* sp. UYSO10 presentó un mayor valor, diferenciándose significativamente del tratamiento control negativo y del inoculado con *Shinella* sp. UYSO24. Por otra parte, en el momento de la cosecha del ensayo (12 meses) se evaluaron 11 variables (ver

Cuadro 9. Respuestas de esquejes de plantas de caña de azúcar de la variedad LCP-85-384, a la inoculación con aislamientos seleccionados en condiciones de campo

Tratamiento	Variables evaluadas									
	3 meses						8 meses		12 meses	
	Peso seco parte aérea (g)	Altura tallo (m)	N° hojas	% N-total parte aérea	[N] parte aérea (mg N/peso seco)	Acumulación de N parte aérea (mg N/planta)	% N-total parte aérea	% N-total parte aérea		
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	22,92 a	0,90 b	12,00 a	1,89 a	18,85 a	432,04 a	1,58 a	0,59 a		
<i>Shinella</i> sp. UYSO24 (C+)	21,24 a	0,97 ab	10,00 c	1,76 a	17,55 a	372,76 ab	1,58 a	0,61 a		
(C-)	17,67 a	0,93 ab	11,33 ab	2,01 a	20,08 a	354,73 b	1,63 a	0,57 a		
(C-)	17,07 a	1,04 a	10,33 bc	1,93 a	19,28 a	329,02 b	1,57 a	0,59 a		

Tratamiento	12 meses										
	Altura tallo (m)	ENTR (n°)	PT (g)	LARCAÑA (cm)	% N total parte aérea	NTH (n° tallo/ha)	TCH (t/ha)	RIT (% de azúcar)	TAH (t azúcar/ha)	FIB (%)	DIATINT (%daño)
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	2,10 a	14,32 a	430,66 a	118,75 a	0,59 a	126,68 a	54,57 a	11,25 a	6,14 a	13,25 a	4,35 a
<i>Shinella</i> sp. UYSO24 C+	2,10 a	15,00 a	468,51 a	122,75 a	0,61 a	116,00 a	54,09 a	11,25 a	6,14 a	13,63 a	2,08 a
C+	2,10 a	14,88 a	426,22 a	123,5 a	0,57 a	128,49 a	54,69 a	11,16 a	6,12 a	13,85 a	1,85 a
C-	2,08 a	13,95 a	436,00 a	123,75 a	0,59 a	111,42 a	48,44 a	11,80 a	5,73 a	13,70 a	1,63 a

ENTR: número de entrenudos, PT: peso de tallos individuales, LARCAÑA: largo de cañas individuales, NTH: n° de tallos por hectárea (población), TCH: toneladas de caña por hectárea (rendimiento cultural), RIT: rendimiento industrial teórico (% de azúcar), TAH: toneladas de azúcar por hectárea (rendimiento final), FIB: Fibra, DIATINT: daños por *Diatraea saccharalis*. Los valores expresados son la media de tres repeticiones. Medidas que tienen diferente letra en cada columna son significativamente diferentes por el test LSD-Fisher ($\alpha \leq 0,05$).

metodología). Ninguna de las mismas, presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. Estos resultados están acordes con los obtenidos por los técnicos de ALUR, quienes observan cambios significativos recién al segundo año. Teniendo esto en cuenta así como los resultados obtenidos a los 12 meses es que se decidió continuar un año más el ensayo de campo, utilizando como esquejes los tallos de caña cosechados (planta madre). En este caso, la inoculación se realizará directamente en el surco en cada uno de los tratamientos.

Estudio de la interacción entre *Enterobacter* sp. UYSO10 y plantas micropropagadas de la variedad LCP 85-384 a través de microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido

En condiciones naturales las plantas se encuentran en contacto íntimo con bacterias endófitas, siendo sus efectos

sobre las mismas aún no comprensibles en su totalidad. Para aprovechar los efectos positivos de esta interacción, el desafío planteado es poder manejar las comunidades microbianas a favor de la colonización por bacterias benéficas. Sin embargo esto será posible solamente cuando se tenga un mejor conocimiento de la ecología y la interacción molecular de los endófitos y las plantas (65). Por lo tanto, a la hora de pensar en una bacteria como posible inoculante, es necesario contar con información ecológica sobre las características de su colonización epi- y endofítica si corresponde (83). Con el fin de estudiar el proceso de infección y localización de la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10, la misma fue inoculada en plantas de cañas de azúcar micropropagadas de la variedad LCP 85-384. Muestras de raíces y tallos fueron cosechadas a diferentes tiempos con la finalidad de realizar un seguimiento de la infección bacteriana, observándose por microscopía óptica así como electrónica de transmisión y de barrido. Los resultados obte-

nidos se presentan siguiendo las etapas definidas en el proceso de interacción: adhesión, infección y colonización.

Adhesión bacteriana a raíces y tallos

Los resultados de los estudios de microscopía óptica y electrónica de barrido mostraron la presencia de bacterias individuales y aisladas, adheridas de forma apolar a la superficie de las raíces a las 6 horas pi (Figura 10a). A mayores tiempos pi, las bacterias se encontraron únicamente formando agregados ubicados en la zona pilífera de la raíz (Figura 10b-d). Los agregados fueron más frecuentes y grandes después de las 24 horas pi. Asimismo en un ejemplar se visualizó la adhesión bacteriana en forma de película sobre la emergencia de una raíz lateral (Figura 10e). En la misma las bacterias parecen adheridas por una sustancia mucosa. Es de destacar que las aberturas naturales y heridas en la raíz son un típico sitio de infección por parte de bacterias endófitas. Por otra parte, en las muestras analizadas no se observaron bacterias en la superficie de los tallos. En el resto del tejido no se observó la formación de agregados ni la presencia de películas bacterianas.

Infección y colonización de raíces y base del tallo

Mediante estudios de microscopía óptica, se observó la presencia bacteriana en casi todos los cortes de raíces y bases de tallos, de plantas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10. Los estudios de visualización de la infección bacteriana a lo largo del tiempo mostraron la presencia de bacterias en los espacios intercelulares de las raíces a partir de las 6 horas pi. (Figura 11 a y b). A las 12 horas pi, se observaron bacterias en los haces vasculares de las raíces y a partir de las 24 horas post inoculación (pi) se las observó tanto en los espacios intercelulares como en los haces vasculares de raíces y base del tallo (Figura 11 c y d). Si bien la mayoría de las veces que se las encontró en espacios intercelulares fue en el cortex del tallo, también se las observó en el cilindro central del mismo. Asociada a la colonización de las bacterias en los espacios intercelulares, se

observa la apertura espacial de los mismos, probablemente debido a que las bacterias degraden la lámina media que une las paredes de las células vegetales (Figura 12). Por otra parte, no se visualizaron estructuras de la planta que se encontraran aparentemente involucradas en el proceso de infección y conducción de las bacterias a través de los tejidos. Sin embargo, se observó la producción de una sustancia mucosa por parte de la planta (Figura 11b y c). Se conoce que la producción de sustancias de este tipo puede estar asociada a respuestas patogénicas, sin embargo las técnicas de microscopía no pueden evidenciarlo.

Como resultado de las diferentes aproximaciones realizadas se presenta un modelo sobre la infección de esta bacteria bajo las condiciones ensayadas. En el mismo se propone que en un principio las bacterias se acercan a la raíz y se adhieren a la misma en forma apolar, formando posteriormente agregados bacterianos en la zona pilífera de la raíz. A continuación comienza la infección bacteriana de la planta, postulándose como un posible sitio de ingreso las aberturas naturales ocurridas por la emergencia de raíces secundarias. Una vez dentro de la planta, el primer sitio de infección son los espacios intercelulares tanto en las raíces como en la base del tallo, colonizando a continuación los tejidos vasculares de la raíz. Finalmente esta cepa alcanzaría el tejido vascular del tallo. El modelo presentado para la adhesión, vía de infección y colonización de plantas de caña de azúcar micropropagadas por *Enterobacter* sp. UYSO10 presenta similitudes y diferencias con otros modelos propuestos en plantas de caña de azúcar micropropagadas y los endófitos diazotrófos: *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* y *G. diazotrophicus* (Cuadro 10). En las especies de *Herbaspirillum* la adhesión se presenta en forma de ataque apolar mientras que *G. diazotrophicus* lo realiza de forma polar. Sin embargo, a diferencia de *Enterobacter* sp. UYSO10, se encuentran formando monocapas y raramente agregados. Los sitios de infección descritos para estas tres especies son las zonas de emergencia de las raíces secundarias y principalmente heridas de la epidermis y particularmente en el caso

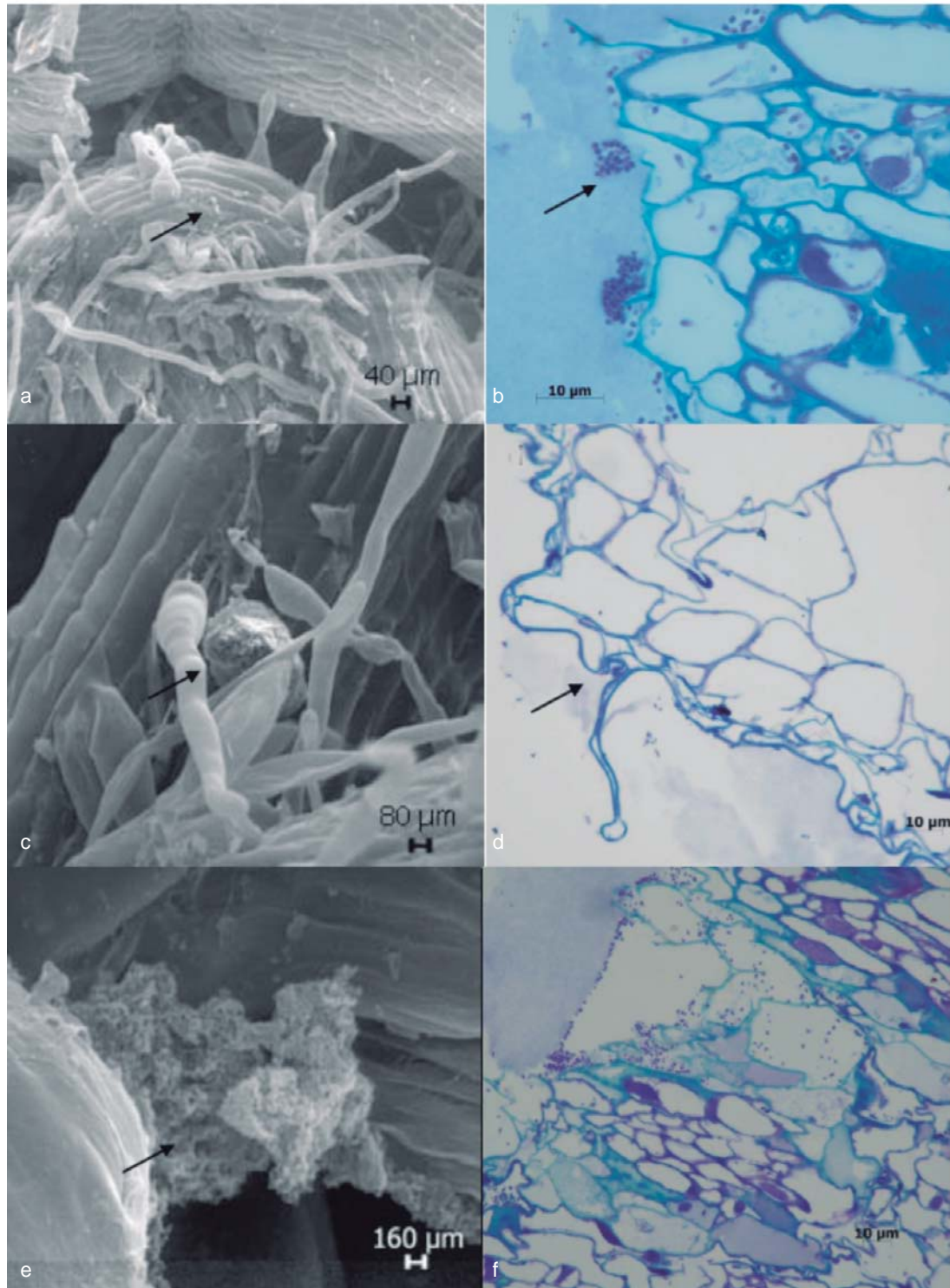


Figura 10. Adhesión de la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10 a raíces y base de tallos de plantas de caña de azúcar. **a-** Microscopía electrónica de barrido (MEB) 6 horas post inoculación (pi), se observa la adhesión de bacterias aisladas a la superficie de raíces y base del tallo, **b-** Microscopía óptica (MO) 12 horas pi, vista de agregados en la superficie de la base del tallo, **c-** MEB 24 horas pi, se ve un agregado superficial cerca de la base de los pelos radiculares, **d-** MO 6 horas pi, vista de pequeño agregado en la base de un pelo radicular, **e-** MEB 24 horas pi, se observa una película bacteriana sobre la abertura natural de una raíz lateral y **f-** MO 12 horas pi, se visualiza infección bacteriana a partir de heridas presentes en la base del tallo.

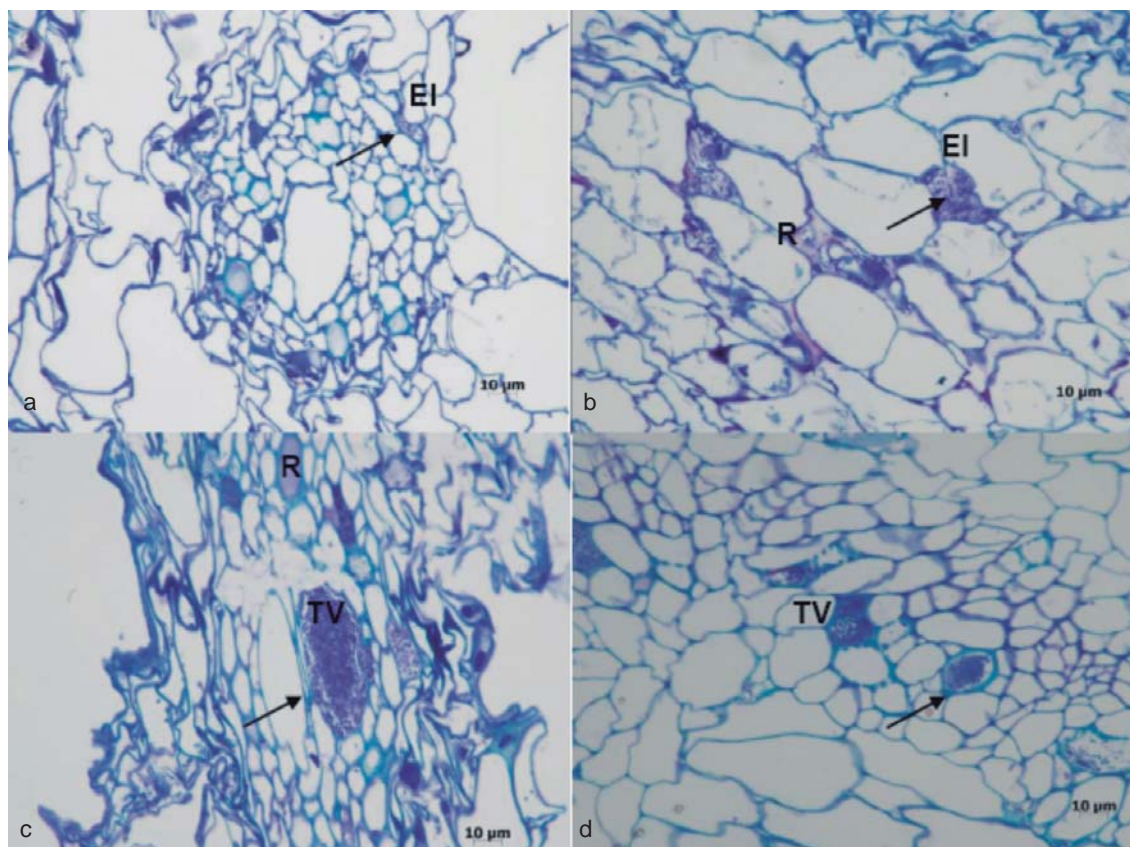


Figura 11. Micrografías ópticas mostrando la infección de plantas micropropagadas por *Enterobacter* sp. UYSO10. Seis horas pi: se observan bacterias en espacios intercelulares en **a**-raíz y **b**- base de tallo. **c**- 12 horas pi: se observan bacterias infectando los tejidos vasculares de raíces. **d**- 24 horas pi: se observa infección en tejidos vasculares de la base del tallo. Las escalas se muestran en las fotografías. **EI**: espacios intercelulares, **TV**: tejido vascular, **R**: reacción mucosa de la planta.

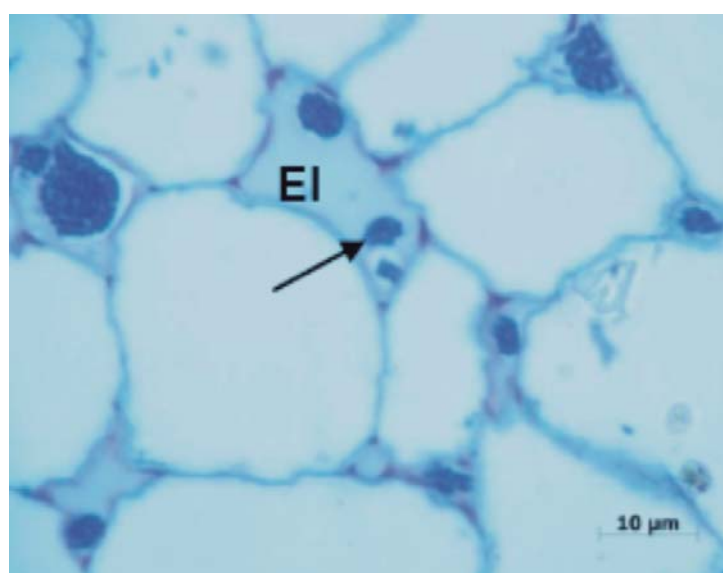


Figura 12. Micrografía óptica mostrando la apertura de los espacios intercelulares (EI) en plantas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10.

Cuadro 10. Modelos de infección de bacterias endófitas-diazótrofas en comparación con el propuesto para *Enterobacter* UYSO10

Etapas	Bacteria			
	<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	<i>G. diazotrophicus</i>
Adhesión radicular	Individuales de forma apolar. Agregados	Monocapa, apolar, raramente en forma de agregados	Monocapa, apolar, raramente en forma de agregados	Monocapa, polar, raramente en forma de agregados
Sitios de infección en las raíces	Zona de emergencia de las raíces secundarias	Zona de emergencia de las raíces secundarias y heridas de la epidermis	Zona de emergencia de las raíces secundarias y heridas de la epidermis	Zona de emergencia de las raíces secundarias, heridas de la epidermis y zona meristemática
Colonización del interior de las raíces	Intercelular	Intercelular	Intercelular	Intercelular
Colonización de los vasos de xilema	Si	Monocamada o agregados discretos	Monocamada o agregados discretos	Monocamada o pequeños agregados
Colonización de la base del tallo	Tejido vascular y parénquima	Vasos de xilema y parénquima	Vasos de xilema y parénquima	Espacios intercelulares de células del cortex

de *G. diazotrophicus* también se observó infección en la zona meristemática. En cuanto a la colonización del interior radicular por las mismas, se observó su presencia en los espacios intercelulares y en los vasos de xilema, mostrándose además en el caso de las especies de *Herbaspirillum* la inducción de mucus por parte de la planta. En cuanto a la base del tallo, se observó la presencia de las cepas de *Herbaspirillum* en los vasos del xilema así como en el parénquima, mientras que *G. diazotrophicus* solamente fue observada en los espacios intercelulares del cortex (31,32,50). Por su parte la infección de otras cepas del género *Enterobacter* han sido estudiadas en las siguientes interacciones planta-bacteria: i) *Enterobacter gergoviae* 57-7 -maíz. Esta cepa fue descrita como un endófito facultativo de maíz, colonizando las raíces los tejidos del parénquima y los vasos del xilema (1). ii) *Enterobacter*

asburiae JM22 -algodón. Para ésta cepa se observó la colonización radicular del cortex y del tejido vascular, proponiéndose una colonización sistémica debido a su presencia en tallos, pecíolo, cotiledones, hojas y meristema apical (56, 57). iii) *Enterobacter* sp. 638 -*Populus trichocarpa*. Esta cepa fue descrita como endófito debido a su visualización en el interior de los tejidos de *Populus trichocarpa* (79).

Finalmente, con los resultados obtenidos en esta parte del proyecto, podemos postular que el aislamiento *Enterobacter* sp. UYSO10 es una bacteria endófito de plantas de caña de azúcar, constituyendo el primer reporte de un aislamiento de éste género como endófito asociado a este cultivo. En el presente estudio se evaluó la interacción planta-bacteria en un modelo experimental, sirviendo los resultados generados para sentar las bases de futuros ensayos en

plantas no micropropagadas. Cabe destacar que en estudios comparativos de la inoculación de *P. solanacearum* en plantas de tomate micropropagadas y en condiciones de cultivo se ha observado patrones de infección similares (88).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1- Se comprobó que las diferentes variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay son capaces de adquirir parte de su N nutricional a partir de la fijación biológica del N₂ en campo y en condiciones controladas, siendo la primera vez que se realiza este tipo de estudio en Uruguay.

2- Se dispone actualmente de una colección caracterizada a nivel bioquímico, fisiológico y molecular, de probables endófitos nativos asociados a variedades de caña de azúcar, cultivadas en Uruguay.

3- Probables endófitos diazótrofos fueron identificados en la colección siendo la primera vez que se reporta un aislamiento perteneciente al género *Shinella* como probable endófito. Se comprobó, en un grupo de aislamientos seleccionados, la capacidad de promover el crecimiento vegetal en ensayos de invernáculo, cuando fueron inoculadas a plantas micropropagadas o a esquejes de plantas de caña de azúcar.

4- Por primera vez en el Uruguay se inocularon plantas de cañas de azúcar con endófitos-diazótrofos nativos, estudiándose su respuesta en condiciones de campo.

5- Mediante técnicas de microscopía (óptica y electrónica), se pudo comprobar que el aislamiento *Enterobacter* sp. UYSO10 es un endófito de plantas de caña de azúcar siendo la primera vez en reportarse.

6- En su conjunto los resultados obtenidos justifican continuar tanto en la profundización de la parte aplicada de pruebas de inoculación en invernáculo y campo, así como en la investigación básica de la interacción planta-microorganismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **AN, Q., Y. DONG, W. WANG, Y. LI. and J. LI.** 2007. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph. *Journal of Applied Microbiology* **103**:613–620.
2. **BALDANI, J. I. I. and V. L. L. BALDANI.** 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **77**:549–579.
3. **BERGE, O., T. HEULIN and W. ACHOUAK.** 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Canadian Journal of Microbiology* **37**:195–203.
4. **BHATTACHARJEE, R. B., A. SINGH and S. N. MUKHOPADHYAY.** 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**:199–209.
5. **Biggs, I. M., G. R. Stewart, J. R. Wilson and C. Critchley.** 2002. ¹⁵N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. *Plant and Soil* **238**:21–30.
6. **BODDEY, R. M., J. C. POLIDORO, A. S. RESENDE, B. J. R. ALVES and S. URQUIAGA.** 2001. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**:889–895.
7. **BODDEY, R., O. OLIVEIRA, S. URQUIAGA, V. REIS, F. OLIVARES and V. L. D. BALDANI.** 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil* **174**:195–209.
8. **BODDEY, R. M., J. DOBEREINER, E. CENTRO, N. D. PESQUISA and R. DE.** 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research* **42**:241–250.
9. **CALVO, J., V. CALVENTE, M. E. DE ORELLANO, D. BENUZZI and M. I. SANZ DE TOSETTI.** 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by

- Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. International Journal of Food Microbiology **113**:251–7.
10. **COMPANT, S., C. CLÉMENT and A. SESSITSCH.** 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry **42**:669–678.
 11. **COMPANT, S., B. DUFFY, J. NOWAK, C. CLÉMENT, E. AIT BARKA and C. CLE.** 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology **71**:4951–4959.
 12. **DESANTIS, T. Z. Z., P. HUGENHOLTZ, K. KELLER, E. L. L. BRODIE, N. LARSEN, Y. M. M. PICENO, R. PHAN and G. L. L. ANDERSEN.** 2006. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. Nucleic Acids Research. **34**:394–399.
 13. **DOBBELAERE, S., J. VANDERLEYDEN and Y. OKON.** 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences **22**:107–149.
 14. **DOBEREINER, J.** 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biology and Biochemistry **29**:771–774.
 15. **DOTY, S. L. S. S. L., B. OAKLEY, G. XIN, J. W. KANG, G. SINGLETON, Z. KHAN, A. VAJZOVIC, J. T. STALEY and T. S. JAMES.** 2009. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. Symbiosis **47**:23–33.
 16. **ENDOPHYTES: W., B. SCHULZ, C. BOYLE, J. HALLMANN and G. BERG.** 2011. Photochemical & photobiological sciences. Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology **10**:3–12.
 17. **FAHRAEUS, G.** 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. Journal of General Microbiology **16**:374–381.
 18. **FRIONI, L.** 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Primera. Orientación Grafica Editorial, Buenos Aires.
 19. **GAMALERO, E., M. G. MARTINOTTI, A. TROTTA, P. LEMANCEAU and G. BERTA.** 2002. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. New Phytologist **155**:293–300.
 20. **GARABET, S., J. RYAN and M. WOOD.** 1998. Nitrogen and water effects on wheat yield in a Mediterranean-type climate. II. Fertilizer-use efficiency with labeled nitrogen. Crop Research **58**:213–221.
 21. **GOVINDARAJAN, M., J. BALANDREAU, R. MUTHUKUMARASAMY, G. REVATHI and C. LAKSHMINARASIMHAN.** 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. Plant and Soil **280**:239–252.
 22. **GYANESHWAR, P., E. K. E. K. JAMES, N. MATHAN, P. M. P. M. REDDY, B. REINHOLD-HUREK and J. K. J. K. LADHA.** 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. American Society of Microbiology **183**:2634–2645.
 23. **HALLMANN, J., W. F. QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, J. . W. KLOEPPER, A. QUADT-HALLMANN and W. F. MAHAFFEE.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology **43**:895–914.
 24. **HARDOIM, P. R., L. S. VAN OVERBEEK and J. D. V. ELSAS.** 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology **16**:463–471.
 25. **Hardy, R. W., R. D. Holsten, E. K. Jackson and R. C. Burns.** 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiology **43**:1185–1207.
 26. **HOEFSLOOT, G., A. TERMORSHUIZEN, D. WATT and M. CRAMER.** 2005. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown south African sugarcane cultivar. Plant and Soil **277**:85–96.
 27. **HULTON, C. J. S., C. F. HIGGINS and P. M. SHARP.** 1991. Eric sequences: a

- novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* **5**:825–834.
28. **IDRIS, A., N. LABUSCHAGNE and L. KORSTEN.** 2009. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *Journal of Agricultural Science* **147**:17–30.
29. **INFOSTAT (2008).** InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
30. **JAMES, E.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* **65**:197–209.
31. **JAMES, E. K., F. L. OLIVARES, A. L. DE OLIVEIRA, F. B. DOS REIS, L. G. DA SILVA and V. M. REIS.** 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany* **52**:747–760.
32. **JAMES, E. K., V. M. REIS, F. L. OLIVARES, J. I. BALDANI and J. DOBEREINER.** 1994. Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* **45**:757–766.
33. **JAMES, E. K. and F. L. OLIVARES.** 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**:77–119.
34. **KANVINDE, L. and G. R. SASTRY.** 1990. *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:2087–92.
35. **KEYEO, F., O. NOOR, AI'SHAH and H. G. AMIR.** 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedling. *Biotechnology* **10**:267–273.
36. **KUKLINSKY-SOBRAL, J., L. A. WELINGTON, R. MENDEZ, I. O. GERLADI, A. A. PIZZIRANI-KLEINER and J. L. AZEVEDO.** 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* **6**:1244–1251.
37. **Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing., p. 115–175. In E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York.
38. **LIMA, E., R. M. BODDEY and J. DOBEREINER.** 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry* **19**:165–170.
39. **LIN, D. X., E. T. WANG, H. TANG, T. X. HAN, Y. R. HE, S. H. GUAN and W. X. CHEN.** 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:1409–1413.
40. **LYNCH, D., J. O. BRIEN, T. WELCH, P. CLARKE, P. ÓCUI, J. H. CROSA, M. O. CONNELL and P. O. CUIV.** 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of Rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium melliloti*. *Journal of Bacteriology* **183**:2576–2585.
41. **MAGNANI, G., S. S., C. M. M. DIDONET, L. M. CRUZ, C. F. PICHETH, F. O. PEDROSA and E. M. SOUZA.** 2010. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research* **9**:250–258.
42. **MARKMANN, K. and M. PARNISKE.** 2009. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: How novel are nodules? *Trends in Plant Science* **14**:77–86.
43. **MASSON-BOIVIN, C., E. GIRAUD, X. PERRET and J. BATUT.** 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology* **17**:458–66.
44. **MEI, C. and B. S. FLINN.** 2010. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Patents on Biotechnology* **4**:81–95.
45. **MENDES, R., A. A. PIZZIRANI-KLEINER, W. L. ARAUJO, J. M. RAAIJMAKERS and R. MENDEZ.** 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:7259–7267.

46. **MIRZA, M. S., W. AHMAD, F. LATIF, J. HAURAT, R. BALLY, K. A. MALIK and P. NORMAD.** 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane *in vitro*. *Plant and Soil* **237**:47–54.
47. **MONTAÑEZ, A., C. ABREU, P. R. GILL, G. HARDARSON and S. M.** 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils* **45**:253–263.
48. **MUTHUKUMARASAMY, R., M. GOVINDARAJAN, M. VADIVELU and G. REVATHI.** 2006. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological Research* **161**:238–245.
49. **OLIVARES, F. L.** 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.*
50. **OLIVARES, F. L., V. L. D. BALDANI, V. M. REIS, J. I. J. I. BALDANI, J. DÖBEREINER and J. DOBEREINER.** 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils* **21**:197–200.
51. **OLIVEIRA, A. L. M., S. URQUIAGA, J. DÖBEREINER and J. I. BALDANI.** 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil* **242**:205–215.
52. **OLIVEIRA, A. L. M., E. L. CANUTO, S. URQUIAGA, V. M. REIS and J. I. BALDANI.** 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil* **284**:23–32.
53. **OLSON, J. B., T. F. STEPPE, R. W. LITAKER and H. W. PAERL.** 1998. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology* **36**:231–238.
54. **PERIN, L., L. MARTÍNEZ-AGUILAR, G. PAREDES-VALDEZ, J. I. BALDANI, P. ESTRADA-DE LOS SANTOS, V. M. REIS, J. CABALLERO-MELLADO and J. PAREDES-VALDEZ.** 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**:1931–1937.
55. **QUADT-HALLMANN, A., J. HALLMANN and J. W. KLOEPPER.** 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **43**:254–259.
56. **QUADT-HALLMANN, A. and J. W. KLOEPPER.** 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology* **42**:1144–1154.
57. **RAMOS, C.** 1996. Effect of agricultural practices on the nitrogen losses to the environment. *Fertilizer Research*. **43**:183–189.
58. **RAMOS, P. L. P. L., S. VAN TRAPPEN, F. L. THOMPSON, R. C. S. S. ROCHA, H. R. BARBOSA, P. DEVOS, C. A. MOREIRA-FILHO and C. A. MOREIRA-HILFO.** 2010. Screening for endophytic nitrogen-fixating bacteria in Brazilian sugarcane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:926–931.
59. **REINHOLD-HUREK, B. and T. HUREK.** 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**:29–54.
60. **REIS JUNIOR, F., V. M. REIS, L. DA SILVA and J. DOBEREINER.** 2000. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genotipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **35**:985–994.
61. **REIS, V. M. M., F. L. L. OLIVARES, J. DOBEREINER and J. DÖBEREINER.** 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. **10**:101–104.
62. **REIS, V. M., F. L. OLIVARES, A. L. M. DE OLIVEIRA, F. B. DOS REIS JUNIOR, J. I. BALDANI and J. DOBEREINER.** 1999.

- Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. Plant and Soil **206**:205–211.
64. **RODRÍGUEZ, H. and R. FRAGA.** 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances **17**:319–39.
65. **ROSENBLUETH, M. and E. MARTÍNEZ-ROMERO.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant Microbe Interactions **19**:827–837.
66. **RYAN, R. P. R., K. GERMAINE, A. FRANKS, D. J. RYAN and D. N. DOWLING.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters **278**:1–9.
67. **SAITOU, N. and M. NEI.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution **4**:406–425.
68. **SARWAR, M. and R. J. J. KREMER.** 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. Letters in Applied Microbiology **20**:282–285.
69. **SCHULZ, B. J. E., C. J. C. BOYLE and T. N. SIEBER.** 2006. What are Endophytes?, p. 1–13. In B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber (eds.), Microbial Root Endophytes. Springer, Berlin.
70. **SCHWYN, B. and J. B. NEILANDS.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry **160**:47–56.
71. **SEVILLA, M., R. H. BURRIS, N. GUNAPALA and C. KENNEDY.** 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *Nif⁺* mutant strains. Molecular Plant Microbe Interactions **14**:358–366.
72. **SHOKRI, D. and G. EMTIAZI.** 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogenfixing bacteria and its optimization by Taguchi design. Current Microbiology **61**:217–225.
73. **SOLTIS, P. S. and D. E. SOLTIS.** 2003. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. Statistical Science **18**:256–267.
74. **SOTO, M. J., A. DOMÍNGUEZ-FERRERAS, D. PÉREZ-MENDOZA, J. SANJUÁN and J. OLIVARES.** 2009. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. Cellular Microbiology **11**:381–388.
75. **SPAEPEN, S. and J. VANDERLEYDEN.** 2011. Auxin and plant-microbe interactions. Perspectives in Biology **3**.
76. **Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, and J. Harper.** 2004. Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products **67**:257–268.
77. **SUMAN, A., A. K. K. SHASANY, M. SINGH, H. N. N. SHAHI, A. GAUR and S. P. S. P. S. KHANUJA.** 2001. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **17**:39–45.
78. **SYLVESTER-BRADLEY, R., N. ASAKAWA, S. L. A. TORRACA, F. M. M. M. M. MAGALHAES, L. L. A. A. OLIVEIRA, R. R. M. M. PEREIRA, N. ASKAWA, S. LATORRACA, F. MAGALHÃES and B. SYLVESTER BRADLEY.** 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amazônica Acta Amazô. **12**:15–22.
79. **TAGHAVI, S., C. GARAFOLA, S. MONCHY, L. NEWMAN, A. HOFFMAN, N. WEYENS, T. BARAC, J. VANGRONSVELD and D. VAN DER LELIE.** 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Applied and Environmental Microbiology **75**:748–757.
80. **Taghavi, S., D. van der Lelie, A. Hoffman, Y.-B. Zhang, M. D. Walla, J. Vangronsveld, L. Newman, and S. Monchy.** 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. PLoS genetics **6**:e1000943.
81. **82. TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR.** 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. **24**:1596–1599.
83. **TANAKA, K., T. SHIMIZU, M. ZAKRIA, J. NJOLOMA, Y. SAEKI, M. SAKAI, T.**

- YAMAKAWA, K. MINAMISAWA and S. AKAO.** 2006. Incorporation of a DNA sequence encoding green fluorescent protein (GFP) into endophytic diazotroph from sugarcane and sweet potato and the colonizing ability of these Bacteria in *Brassica oleracea*. *Microbes and Environments* **21**:122–128.
84. **TAULÉ, C., C. MAREQUE, C. BARLOCCO, F. HACKEMBRUCH, V. M. REIS, M. SICARDI and F. BATTISTONI.** 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 and Soil* **356**:35–49.
85. **ULRICH, K., A. ULRICH and D. EWALD.** 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* **63**:169–180.
86. **URQUIAGA, S., K. CRUZ and R. BODDEY.** 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: ¹⁵N and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal* **56**:105–114.
88. **VASSE, J., P. FREY and A. TRIGALET.** 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **8**:241–251.
89. **VASSILEV, N., M. VASSILEVA and I. NIKOLAEVA.** 2006. Simultaneous P solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**:137–144.
90. **VERMA, S. C., A. SINGH, S. P. CHOWDHURY and A. K. Tripathi.** 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters* **23**:425–429.
91. **VIDEIRA, S. S.** 2007. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas mão-leguminosas. EMBRAPA, Documentos 234.
92. **WAKELIN, S. A., R. A. WARREN, P. R. HARVEY and M. H. RYDER.** 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* **40**:36–43.
93. **WILSON, D.** 1995. The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**:274–276.
94. **YONEYAMA, T., T. MURAOKA, T. H. H. KIM, E. V. V. DACANAY and Y. NAKANISHI.** 1997. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil* **189**:239–244.
95. **VAN LOON, L. C., P. A. BAKKER and C. M. PIETERSE.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**:453–483.