



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**Caracterización de la colonización y promoción del crecimiento vegetal por
Burkholderia tropica en gramíneas**

Tesista

Lic. Pamela Romina Bernabeu

Directora

Dra. María Flavia Luna

Co-director

Dr. José Luis Boiardi

Año 2017

El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI – CONICET – CCT La Plata), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Flavia Luna y la co-dirección del Dr. José Luis Boiardi.

Mi reconocimiento

A la Universidad Nacional de Quilmes, por haberme formado académicamente.

A la Universidad Nacional de La Plata, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas, por mi formación de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca que me permitió dedicarme a este trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) y a la UNLP por la financiación que permitió llevar a cabo gran parte de esta Tesis.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y a todos sus integrantes, por permitirme realizar los trabajos necesarios para llevar a cabo esta Tesis.

Mi agradecimiento

A Flavia, por haberme guiado siempre, y por haber estado en cada paso de la realización de esta Tesis. Por haberme dado la posibilidad de desarrollarme en lo que amo hacer y abrirme las puertas del L4. Por siempre motivarme a dar más de mí y por pensar realmente que podía hacerlo. Por los consejos, tanto profesionales como personales, y por haberme entendido y acompañado en muchas de las cosas que me pasaron a lo largo de estos años.

A mis compañeros del L4, que estuvieron y me apoyaron durante toda la realización de este trabajo: a Galle y Mari, por su invaluable ayuda en la realización de los ensayos y por los lindos momentos compartidos; a Juli y Sole, por acompañarme siempre, por las charlas, y por haber pasado de ser compañeras de laboratorio a amigas; a los que estuvieron o están de paso en el lab (Ani, Emma, Estefi, Fran, Giuli, Sofi, Vicky...) por ser una parte tan linda de mi vida y por las experiencias que compartimos. Gracias por la buena predisposición siempre, por la compañía, por la ayuda, por ponerle siempre buena onda a todo, por los festejos de las cosas lindas y por el apoyo en los momentos difíciles.

A todos mis compañeros del CINDEFI que de alguna u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo, ya sea con ayuda experimental, con la resolución de dudas o con los momentos compartidos. Un agradecimiento especial a Tato, Ivana y su grupo, por la ayuda y la paciencia en lo referido a las mediciones enzimáticas. A Claudia por su colaboración en los ensayos del estudio de *biofilms*, y a Nati por la ayuda para utilizar los programas de procesamiento de imagen.

A Mariano Pistorio por su ayuda intentando hacerme entender temas de biología molecular, por resolver siempre mis dudas con buena predisposición, por la paciencia y por habernos permitido

obtener la secuencia del genoma de *B. tropica*. A Gonzalo Torres-Tejerizo por su colaboración en este trabajo. Al Dr. Lars Hansen, por la secuenciación del genoma que permitió la realización de parte de este trabajo.

A Pepe, por haberme permitido obtener la beca que me permitió la realización de este trabajo.

A los ingenieros agrónomos Natalia Carrasco, Pablo Angeletti y Mariano Caprara, por su ayuda invaluable en la realización de los ensayos a campo: por los diseños, la mano de obra y la predisposición a responder las dudas que nos iban surgiendo.

A las semilleras KWS, Nidera y Seminis, por proveerme de las semillas que permitieron llevar a cabo gran parte de los experimentos de esta Tesis.

Al Dr. Jesús Caballero-Mellado, por todos sus estudios realizados con *Burkholderia*, y por habernos cedido gentilmente la cepa con la que se llevó a cabo este trabajo. Gracias por habernos permitido crear esta línea de trabajo que nos apasiona.

A Ariel, por haber estado conmigo en cada paso de estos 5 años, por la paciencia en mis días de agotamiento y agobio, por aguantar mis ausencias (físicas o no), por esperarme y tratar de ayudarme siempre. Gran parte de este trabajo fue posible gracias a que estuviste siempre conmigo (no solo acompañándome, sino también literalmente, yéndome a buscar de noche al laboratorio, limpiando semillas, etc). Gracias por apoyarme y por bancarme siempre.

A mis padres, que me dieron la posibilidad de estudiar lo que quise ayudándome en todo para lograrlo y me inculcaron los valores que me hicieron la persona que soy hoy. A mi mamá: gracias por tu apoyo incondicional, por ser mi ejemplo y por motivarme siempre a ser mejor. Al recuerdo de mi papá, que lo llevo para siempre en mi corazón, y que estaba tan orgulloso de mí cuando empecé este doctorado: desearía que hoy estuvieras acá para verme terminar este camino que estabas tan feliz de haber empezado conmigo. Gracias a los dos por todo lo que siempre hicieron por mí.

A mis hermanos, Pablo y Lucas, por estar siempre presentes y por ser tan indispensables, y por acompañarme en este camino que elegí, siempre apoyándome a pesar de todo.

A mi abuela, por hacer fuerza siempre para que las cosas salgan bien, por acompañarme, por preocuparse, y por ser mi ejemplo.

Al resto de mi familia, por el apoyo incondicional.

A mis amigos, a quienes también considero familia, simplemente por estar siempre.

Índice general

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
1.1 LA FAMILIA DE LAS GRAMÍNEAS Y SU IMPORTANCIA	3
1.2 CULTIVO DE CEREALES EN ARGENTINA	4
1.3 REQUERIMIENTOS DE NITRÓGENO Y FÓSFORO DE LOS CEREALES	6
1.4 AGRICULTURA SUSTENTABLE: INTERACCIONES BENEFICIOSAS PLANTA-BACTERIA	8
1.5 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL	10
1.6 ECOLOGÍA MICROBIANA DE LA RAÍZ Y SU ENTORNO: LUGAR QUE OCUPAN LAS PGPB	12
1.7 PGPB ENDÓFITAS Y SUS BENEFICIOS	13
1.8 COLONIZACIÓN EFICIENTE: PGPB COMPETENTES	16
1.9 COLONIZACIÓN ENDOFÍTICA: PARTICULARIDADES	18
1.10 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PGPB COMPETENTES	22
1.11 LA IMPORTANCIA DE LA COLONIZACIÓN	23
1.12 METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE LAS PGPB INOCULADAS	25
1.13 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS PGPB	30
1.14 INTRODUCIENDO BACTERIAS A UN COMPLEJO SISTEMA DE INTERACCIONES: INOCULANTES MICROBIANOS	34
1.15 CARACTERÍSTICAS DE UN INOCULANTE A BASE DE PGPB	36
1.16 CARACTERÍSTICAS DEL SOPORTE	38
1.17 CARACTERÍSTICAS DEL PROTECTOR	39
1.18 CARACTERÍSTICAS DEL ENVASE	40
1.19 COMPATIBILIDAD CON EL CURASEMILLAS	41
1.20 INOCULACIÓN CON PGPB	41
1.21 CALIDAD DE LOS INOCULANTES	42
1.22 RESPUESTA A CAMPO A LA INOCULACIÓN CON PGPB	44
1.23 EL GÉNERO <i>BURKHOLDERIA</i>	47
1.24 <i>BURKHOLDERIA TROPICA</i>	55
1.25 INTERACCIÓN PGPB ENDÓFITA –GRAMÍNEAS: MODELOS DE ESTUDIO	58
OBJETIVO GENERAL	59
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
ANEXO 1	61
SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS	61
FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	68
FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	68
ESTRUCTURA DE LA PARED VEGETAL	70
ENZIMAS LÍTICAS DE LA PARED VEGETAL	73
CAPÍTULO 2: CARACTERÍSTICAS DE <i>B. TROPICA</i> RELACIONADAS CON LA RIZOCOMPETENCIA: FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS	77
2.1 RESUMEN	77
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	78
2.2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	78
2.2.2 CONSTRUCCIÓN DE <i>B. TROPICA-GFP</i> Y ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO	80
2.2.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN CULTIVOS <i>BATCH</i>	80
2.2.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	81
2.2.4 a - Caracterización cuantitativa del biofilm	82
2.2.4 b - Caracterización de la formación de biofilm por técnicas microscópicas	83
2.2.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS	84
2.2.5 a – Evaluación de la actividad de enzimas líticas en medios sólidos	85
2.2.5 b – Evaluación de la producción de enzimas líticas en medios líquidos	86
2.2.5 c – Evaluación de la producción de enzimas líticas en sistemas con plantas	88
2.3 RESULTADOS Y DISCUSION	91
2.3.2 CRECIMIENTO DE <i>B. TROPICA</i> EN MEDIOS LÍQUIDOS	91
2.3.1 CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO DE LAS VARIANTES ISOGÉNICAS DE <i>B. TROPICA</i>	94
2.3.3 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	95
2.3.3 a - Evaluación cuantitativa de la formación de biofilm	95
2.3.3 b - Evaluación de la formación de biofilm por microscopía	99

2.3.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LÍTICAS	103
2.3.4 a – Producción de enzimas líticas en medios sólidos	103
2.3.4 b – Producción de enzimas líticas en medios líquidos	104
2.3.4 c - Evaluación de la producción de enzimas líticas en sistemas con plantas	107
2.4 CONCLUSIONES	109
2.5 ANEXO 2	111
2.5.1 ESTABILIDAD DE <i>B. TROPICA</i> -GFP	111
2.5.2 CULTIVOS BATCH	111
2.5.3 PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE TIEMPO Y TEMPERATURA PARA LAS MEDIDAS DE ACTIVIDAD PECTINASA Y CELULASA POR EL MÉTODO SOMOGYI-NELSON	112
2.5.4 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LAS MEDIDAS DE ACTIVIDAD PECTINASA Y CELULASA	114

CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE COMPUESTOS INSOLUBLES DE FÓSFORO POR *BURKHOLDERIA TROPICA*, ROL DE LA RUTA PERIPLASMÁTICA DE OXIDACIÓN DE ALDOSAS

3.1 RESUMEN	119
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	120
3.2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	120
3.2.2 ENSAYOS CUALITATIVOS DE SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO EN MEDIO SÓLIDO	120
3.2.2 a – Evaluación de la solubilización de fosfato insoluble	120
3.2.2 b – Evaluación de la producción de ácidos orgánicos	121
3.2.3 ENSAYOS DE SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO EN MEDIO LÍQUIDO	121
3.2.3 a - Cultivos batch en erlenmeyer	121
3.2.3 b - Cultivos batch en biorreactores	122
3.2.3 c – Análisis de las muestras	122
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
3.3.1 ENSAYOS CUALITATIVOS DE SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO EN MEDIO SÓLIDO	126
3.3.1 a – Evaluación de la solubilización de fosfato insoluble	126
3.3.1 b – Evaluación de la producción de ácidos orgánicos	126
3.3.2 ENSAYOS DE SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO EN MEDIO LÍQUIDO	127
3.3.2 a - Cultivos batch en erlenmeyer	127
3.3.2 b - Cultivos batch en biorreactor	134
3.4 CONCLUSIÓN	136

CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE TRIGO Y SORGO POR *BURKHOLDERIA TROPICA*

4.1 RESUMEN	139
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	140
4.2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	140
4.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN SUPERFICIAL Y ENDOFÍTICA DE <i>B. TROPICA</i> EN TEJIDOS DE PLANTAS	140
4.2.3 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA VISUALIZAR LAS BACTERIAS INOCULADAS	143
4.2.3 a - Microscopía de campo claro	143
4.2.3 b - Microscopía de epi-fluorescencia	144
4.2.4 ENSAYO DE CONCENTRACIÓN DE INÓCULO	145
4.2.5 CUANTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN TEJIDOS DE PLANTAS EN TIERRA ESTÉRIL	145
4.2.6 CUANTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN RAÍCES DE TRIGO Y SORGO EN TIERRA NO ESTÉRIL	147
4.2.7 IDENTIFICACIÓN DE <i>B. TROPICA</i> POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	148
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
4.3.1 COLONIZACIÓN DEL RIZOPLANO Y ENDOFÍTICA EN TEJIDOS DE PLANTAS DE TRIGO Y SORGO	150
4.3.2 VISUALIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LA COLONIZACIÓN SUPERFICIAL, SITIOS DE INGRESO Y COLONIZACIÓN DE TEJIDOS INTERNOS	153
4.3.3 NÚMERO DE BACTERIAS POR SEMILLA NECESARIAS PARA UNA COLONIZACIÓN EFICIENTE	157
4.3.4 COLONIZACIÓN DE <i>B. TROPICA</i> EN RAÍCES DE PLANTAS DE TRIGO Y SORGO CRECIDAS EN TIERRA ESTÉRIL	160
4.3.5 COLONIZACIÓN DE <i>B. TROPICA</i> EN RAÍCES DE PLANTAS DE TRIGO Y SORGO CRECIDAS EN TIERRA NO ESTÉRIL	161
4.3.6 IDENTIFICACIÓN DE <i>B. TROPICA</i> POR TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	162
4.4 CONCLUSIONES	164

4.5 ANEXO 4	166
4.5.1 ENSAYO DE CO-INOCULACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE CON <i>B. TROPICA</i> Y SUS VARIANTES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS	166
4.5.2 PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN	167
CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN DE <i>BURKHOLDERIA TROPICA</i> COMO INOCULANTE PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DE CULTIVOS DE TRIGO Y SORGO	171
5.1 RESUMEN	171
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	172
5.2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	172
5.2.2 SUPERVIVENCIA EN FORMULACIONES LÍQUIDAS	172
5.2.3 SUPERVIVENCIA EN SEMILLA	173
5.2.4 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO A CAMPO	174
5.2.4 a - <i>Sitios experimentales y campañas</i>	174
5.2.4 b - <i>Tratamientos</i>	175
5.2.4 c - <i>Análisis microbiológico de las plantas</i>	176
5.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	178
5.3 RESULTADOS Y DISCUSION	179
5.3.1 SUPERVIVENCIA EN FORMULACIONES LÍQUIDAS	179
5.3.2 SUPERVIVENCIA EN SEMILLAS	182
5.3.3 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO A CAMPO	184
5.3.3 a - <i>Efectos de la inoculación en trigo</i>	185
5.3.3 b - <i>Efectos de la inoculación en sorgo</i>	187
5.3.3 c - <i>Análisis microbiológico de las plantas</i>	189
5.4 CONCLUSIONES	191
CAPÍTULO 6: GENES DE <i>B. TROPICA</i> RELACIONADOS CON LA COLONIZACIÓN Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL	195
6.1 GENES DE LAS PGPB INVOLUCRADOS CON LA INTERACCIÓN CON LAS PLANTAS	195
6.2 SECUENCIACIÓN, ENSAMBLE Y ANOTACIÓN DEL GENOMA DE <i>B. TROPICA</i> MTO-293	197
6.3 BÚSQUEDA DE GENES EN EL GENOMA DE <i>B. TROPICA</i> MTO-293	198
6.4 GENES RELACIONADOS CON LA RIZOCOMPETENCIA DE <i>B. TROPICA</i> MTO-293	199
6.4.1 <i>Genes de quimiotaxis y motilidad</i>	199
6.4.2 <i>Genes relacionados con la persistencia en la rizosfera y el rizoplano</i>	202
6.4.3 <i>Genes relacionados al Quorum Sensing</i>	203
6.4.4 <i>Genes relacionados con la producción de EPS y la formación de biofilm</i>	204
6.4.5 <i>Genes involucrados en la adhesión a semillas</i>	206
6.4.6 <i>Genes de enzimas líticas de la pared celular vegetal: pectinasas</i>	206
6.4.7 <i>Enzimas degradadoras de AHLs y DFS</i>	208
6.5 GENES RELACIONADOS CON LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO	209
6.5.1 <i>Genes de FBN</i>	209
6.5.2 <i>Genes relacionados con la solubilización de fosfatos</i>	211
6.5.3 <i>Genes relacionados con la producción de auxinas</i>	212
6.5.4 <i>Genes relacionados con la captación de hierro</i>	213
6.5.5 <i>Genes relacionados con la producción de cianuro de hidrógeno</i>	214
6.5.6 <i>Genes relacionados con la modulación de fitohormonas en la planta</i>	214
6.6 GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA	215
6.7 CONCLUSIONES	217
CAPÍTULO 7: CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS	225
CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	233

Capítulo 1

Introducción y objetivos

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1 La familia de las gramíneas y su importancia

La familia botánica de las gramíneas o poáceas (*Poaceae*) es una familia de plantas herbáceas, o muy raramente leñosas, perteneciente al orden Poales de las monocotiledóneas. A esta familia pertenecen más de 800 géneros y unas 12.000 especies, y es de una gran importancia económica global. La mayor parte de la dieta de los seres humanos proviene de las gramíneas, tanto en forma directa (granos de cereales y sus derivados, como harinas y aceites) o indirecta (carne, leche y huevos que provienen del ganado y las aves de corral que se alimentan de pastos, que son básicamente gramíneas). Es una familia cosmopolita, que ha conquistado la mayoría de los nichos ecológicos del planeta, desde las zonas desérticas hasta los ecosistemas de agua salada, y desde las zonas deprimidas y anegadizas hasta los sistemas montañosos más altos. Esta incomparable capacidad de adaptación está sustentada en una enorme diversidad morfológica, fisiológica y reproductiva, que convierten a las gramíneas en una familia de gran relevancia biológica. Se calcula que las gramíneas ocupan un 20% de la superficie vegetal del planeta (<http://sistematicavegetal.weebly.com/>). De acuerdo a sus aplicaciones se pueden describir diferentes gramíneas:

- Cereales: avena, cebada, centeno, maíz, arroz, sorgo y trigo, como semillas comestibles.
- Forrajeras: avena, cebadilla criolla, festuca, grama rhodes, falaris, pasto ovillo, ray grass, y los sorgos, entre otros.
- Industriales: fuente de azúcar (caña de azúcar), destilería (maíz, cereales), maltería (cebada cervecera), aceites comestibles (embriones de varias especies, especialmente de maíz), perfumería, biocombustibles.
- Construcciones (bambúceas), fijación de dunas (*Ammophila arenaria*), ornamentales (*Pennisetum* spp.) y medicinales (*Agropyron repens*).

Como cereales (de *Ceres*, el nombre en latín de la Diosa de la agricultura) se entiende a aquellas plantas de la familia de las gramíneas cultivadas por su grano (fruto o cariósido constituido por pericarpio y semilla). Aunque la forma y el tamaño de las semillas pueden ser diferentes, todos los granos de cereales tienen una estructura y valor nutritivo similar: 100 gramos de grano entero suministran aproximadamente 350 kcal, de 8 a 12 gramos de proteína y cantidades útiles de calcio, hierro y vitamina B. En su estado seco, los granos de cereales carecen completamente de vitamina C y excepto en el caso del maíz amarillo, no contienen caroteno (provitamina A).

La estructura de todos los granos de cereales (Figura 1.1) está compuesta por:

- la cáscara de celulosa, la cual no tiene valor nutritivo para los seres humanos, pero sí como fibra dietaria

- el pericarpio y testa, dos capas bastante fibrosas que contienen pocos nutrientes
- la capa de aleurona rica en proteínas, vitaminas y minerales
- el embrión o germen rico en nutrientes, consiste de la plúmula y la radícula unidas al grano por el cotiledón, contiene lípidos en proporción variable que permite la extracción de aceite vegetal de ciertos cereales
- el endosperma que comprende más de la mitad del grano y consiste principalmente en almidón, componente principal de los alimentos humanos.

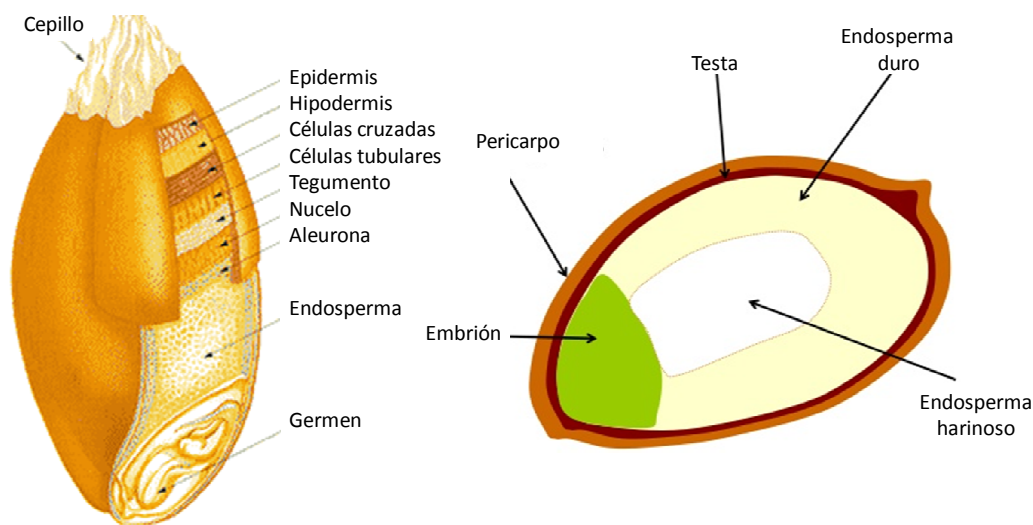


Figura 1.1 Dibujo de granos de trigo (izquierda) y sorgo (derecha) mostrando su estructura.

1.2 Cultivo de cereales en Argentina

Argentina tiene una superficie continental de alrededor de 2,8 millones de kilómetros cuadrados y cuenta con unas 34 millones de hectáreas con cultivos agrícolas. Los principales cultivos que ocupan esa superficie son: soja, trigo, maíz, girasol, sorgo y arroz. Para el cultivo de cereales la zona por excelencia es la pampa húmeda, con climas templados y una superficie total de alrededor de 210.000 km² concentra el 80% de la producción de cereales. La mayor parte de la producción está en la provincia de Buenos Aires, seguida por Santa Fe y Córdoba. En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, las tierras cultivadas con trigo como cultivo de invierno se alternan con girasol, papas y pastoreo de ganado. En el noreste de la provincia de Buenos Aires, en los cultivos de primavera-verano se rota el trigo con maíz, mijo y sorgo (<http://surdelsur.com/es/agricultura-argentina/>).

El trigo (*Triticum aestivum*) fue el cultivo fundador de la colonización agrícola de la región pampeana, siendo su historia en el país paralela a la de la agricultura argentina. La expansión del cultivo se inicia en 1870, cuando las colonias agrícolas comenzaron a extenderse por las provincias de Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos. La exportación de gran parte de su producción convirtió a la Argentina en “el granero del mundo” y contribuyó a ubicar al país en un lugar destacado en el

contexto mundial. En la última década, la superficie total sembrada osciló entre 5 y 7 millones de hectáreas, ocupando principalmente las provincias de Buenos Aires y Santa Fe. El rendimiento por hectárea se ha mantenido entre los 1.900 y 2.600 kilos, mientras que la producción total varió de 9 a 16 millones de toneladas anuales. En general, una parte de los granos se destina al consumo interno y el resto se exporta (www.centrodecorredores.com/el-trigo-en-argentina-y-el-mundo). El cultivo de trigo es el más importante a nivel mundial, tanto si se lo considera desde la superficie sembrada y la producción como en su significado en la alimentación humana. Aunque en los últimos años es un cultivo que ha perdido competitividad frente a otros, en especial la soja, la Argentina está en los primeros lugares en cuanto a la producción y exportación de este cereal. El desafío actual para productores y técnicos es tratar de recuperar el lugar que tuvo, sobre todo teniendo en cuenta su importancia estratégica dentro de una rotación balanceada como requiere la intensificación de la agricultura en la actualidad. Desde los 70 a la actualidad el área del cultivo ha disminuido en un 49% mientras que la producción se incrementó en un 59% gracias a los avances tecnológicos que permitieron un incremento en los rendimientos.

El sorgo (*Sorghum bicolor*) es una gramínea de origen tropical que ha sido adaptada, a través del mejoramiento genético, a una gran diversidad de ambientes, siendo considerado uno de los cultivos mundiales de seguridad alimentaria. Es por ello que en Argentina se adapta muy bien a la región pampeana de clima templado. El sorgo es un cultivo de una gran rusticidad, conocido por su tolerancia a factores de estrés como sequía, altas temperaturas y salinidad. Los sorgos del tipo granífero son utilizados para aportar energía en los sistemas de engorde intensivo, como suplemento estratégico. En el mundo, el grano de sorgo se destina en un 40% para alimentación humana, mientras que en América del Sur se utiliza principalmente para la alimentación del ganado y como insumo para la producción de biocombustibles. Los principales beneficios de la inclusión del sorgo en las rotaciones de cultivos son resultantes de la alta cantidad de rastrojo que deja y su lenta descomposición (relación carbono/nitrógeno alta). Esto permite por un lado contribuir al contenido de materia orgánica del suelo y por otra, mediante labranza conservacionista, es decir manteniendo rastrojos en superficie, disminuir las pérdidas de agua del suelo por evaporación mejorando la infiltración del agua de lluvia. Si bien el destino, localmente, ha sido la alimentación animal, en el mundo alrededor del 40% de la producción del sorgo granífero es destinado a la alimentación humana como participante en la producción de alimentos y bebidas para el ser humano. La superficie sembrada con este cultivo en la Argentina presenta una tendencia creciente en la última década (Carrasco *et al.*, 2011).

En la Figura 1.2 se muestra la distribución relativa del área sembrada y la producción de granos en Argentina en la campaña 2013/2014, que muestra que si bien la soja como leguminosa productora

de grano supera al resto, los cultivos de maíz y trigo, seguidos por el girasol, el sorgo y la cebada, son los de mayor importancia agronómica en nuestro país.

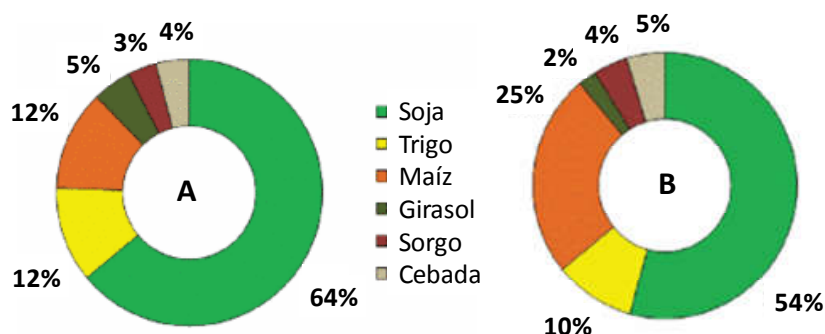


Figura 1.2 Distribución relativa del área sembrada (A) y de la producción de granos (B) en Argentina en la campaña 2013/2014 (Brihet, 2015).

1.3 Requerimientos de nitrógeno y fósforo de los cereales

Los suelos en general poseen deficiencias en la disponibilidad natural de dos macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas: el fósforo (P) y el nitrógeno (N). El P que posee el suelo proviene en su mayor parte de la meteorización de minerales, y se encuentra en formas orgánicas como inorgánicas. A diferencia del N y del azufre, que son otros elementos que se absorben en forma aniónica, el P es un elemento poco móvil (ver Anexo 1). Por su tendencia a reaccionar dando formas fosforadas no disponibles para las plantas es que debe ser considerado uno de los elementos más críticos. Si bien los cultivos absorben P durante todo el ciclo, el período crítico es al comienzo, entre los 5 y los 35 días posteriores a la emergencia, ya que si bien los requerimientos de P en el suelo cercano a la raíz no son los más altos, la temperatura del suelo aún es baja y la capacidad de exploración de las raíces es reducida, por lo tanto, la absorción se ve limitada a menos que el nivel de P sea muy satisfactorio. Es por esto que la práctica de fertilización con P se realiza habitualmente en el momento de la siembra.

El N en el suelo se encuentra principalmente en la materia orgánica (formando parte del humus), hallándose casi completamente bajo formas químicas que no pueden ser tomadas directamente por los cultivos. Por lo tanto, deben transformarse a través de la actividad biológica y microbiológica del suelo en formas biodisponibles como NO_3^- y NH_4^+ (<http://exa.unne.edu.ar/biologia/Asimilacion-del-nitrogeno.pdf>). El N es un elemento móvil y las pérdidas del mismo por lixiviación crecen a medida que aumenta el nivel de lluvias y de suelos arenosos. La mejor manera de prevenir la lixiviación excesiva es la aplicación de solo parte del fertilizante durante la siembra y el resto luego en el ciclo de crecimiento cuando el requerimiento es más alto (<https://2010/04/requerimientos-nutricionales-y-calculo-de-fertilizantes1.pdf>).

El N y el P son indudablemente los nutrientes más importantes y necesarios para la correcta nutrición vegetal. Basta con señalar que se requieren alrededor de 30 kg y 5 kg de N y P, respectivamente, como elementos para producir 1000 kilogramos de trigo (Tabla 1.1), para justificar su importancia a nivel productivo.

Cultivo	N		P	
	Req	Extrac	Req	Extrac
Trigo	30	21	5	4
Colza	60	38	15	11
Soja	75	55	7	6
Girasol	40	24	11	7
Maíz	22	15	4	3
Sorgo	30	20	4	4

Tabla 1.1 Requerimientos (Req) y extracción (Extrac) de nitrógeno (N) y fósforo (P) para los principales cultivos de la zona bonaerense expresados en kg de nutriente por tonelada (1000 kg) de grano (Carrasco *et al.*, 2011).

En base a los requerimientos de nutrientes calculados según el rendimiento objetivo (o esperado) y el que es aportado por el suelo, se pueden conocer los nutrientes limitantes de cada cultivo. Por estos motivos, el N y el P son los principales fertilizantes químicos aplicados a los cultivos para poder satisfacer las necesidades y mejorar el rendimiento de los mismos, tal como muestra la Figura 1.3.

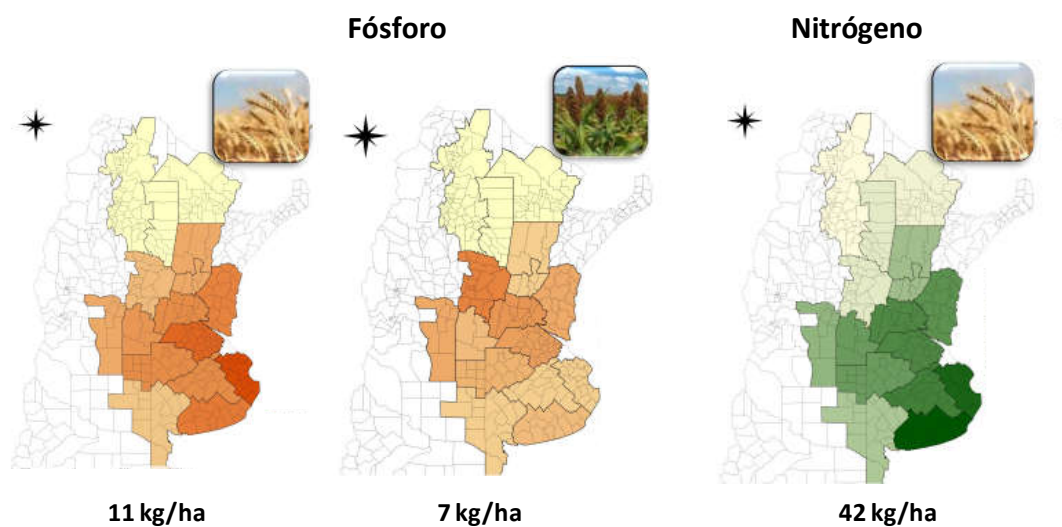


Figura 1.3 Dosis medias zonales de aplicación de P y N como fertilizantes en cultivos de trigo y sorgo en la campaña 2012/2013, y sus respectivos promedios. Los colores más intensos corresponden a mayores dosis de fertilizante (Brihet, 2015).

Tradicionalmente en las prácticas agrícolas se han suplido las deficiencias de P del suelo con el agregado de fertilizantes inorgánicos (KH_2PO_4), Pero como se detalló anteriormente, sólo una fracción del P adicionado eventualmente es asimilada por las plantas, el resto queda no disponible.

Generalmente, unos días después de la fertilización los niveles de P alcanzan valores similares a los de antes de la aplicación del fertilizante y es por eso que aplicar fertilizantes en exceso es una práctica común que conduce a problemas ambientales como la eutrofización o la acumulación de elementos tóxicos presentes en los fertilizantes (Yamazaki y Geraldo, 2003). Con respecto a la fertilización nitrogenada, en la práctica es común la aplicación de fertilizantes como la urea y al igual que el P, con dosis en exceso con el fin de asegurar una máxima producción, trayendo serias consecuencias relacionadas con la lixiviación de nitratos a las aguas subterráneas (Díez López, 1999). Además, el uso excesivo de fertilizantes produce degradación del suelo y pérdida de biodiversidad. Por otro lado, en la actualidad el costo de los fertilizantes nitrogenados está aumentando considerablemente como consecuencia del aumento de los precios de la energía y la cantidad de fósforo disponible es limitada. Por lo tanto, es muy importante buscar alternativas que atenúen estos problemas y que aseguren la sustentabilidad de este importante sector. Como agricultura sustentable se puede definir al sistema de producción agropecuaria que permite obtener producciones estables de forma económicamente viable y socialmente aceptable, en armonía con el medio ambiente y sin comprometer las potencialidades presentes y futuras del recurso suelo. De esta forma, continuamente se busca proveer soluciones amigables con el medio ambiente como una alternativa a la agricultura tradicional, con el fin de reducir la dependencia a la aplicación de fertilizantes químicos utilizados para mantener la productividad de los cultivos, así como también de pesticidas y otros productos agroquímicos que tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente (Sanghi y Singh, 2012). En este contexto, las interacciones beneficiosas entre plantas y microorganismos, que puedan contribuir al aumento de disponibilidad de estos nutrientes para las plantas, han adquirido una gran relevancia y continúan siendo una alternativa prometedora para mejorar la producción agrícola actual y futura.

1.4 Agricultura sustentable: interacciones beneficiosas planta-bacteria

El nitrógeno está presente en diferentes formas en la biosfera. La atmósfera contiene aproximadamente un 79% de nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, la mayor parte de este gran reservorio de nitrógeno no está directamente disponible para los organismos superiores. La adquisición del nitrógeno de la atmósfera requiere la ruptura del enlace triple covalente entre dos átomos de nitrógeno ($N \equiv N$) para producir amonio. Estas reacciones de fijación del nitrógeno, pueden ser procesos naturales (fijación atmosférica de N_2 a NO_3^- o fijación biológica de N_2 a NH_4^+) o industriales (fijación de N_2 a NH_4^+). La mayor parte del nitrógeno fijado en la naturaleza procede de la simbiosis mutualista que existe entre las bacterias que forman nódulos con las plantas leguminosas, con una contribución estimada de más de 45 millones de toneladas métricas de Nitrógeno por año a los ecosistemas terrestres (Vance, 2001). Estas bacterias diazótroficas que llevan a cabo el proceso de

Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) se agrupan genéricamente como rizobios (Sprent, 2009; Olivares *et al.*, 2013). Se caracterizan por su exclusiva capacidad de formar estructuras particulares denominadas nódulos en plantas leguminosas (y como excepción en la no leguminosa *Parasponia* (Markmann y Parniske, 2009)) con las que establecen una simbiosis, es decir, una estrecha relación entre ambos individuos de distintas especies (Anton de Bary en 1873). Ambos simbiosntes pueden vivir de forma independiente, pero cuando se asocian ambos se ven favorecidos, siendo entonces una simbiosis mutualista. La taxonomía de estas bacterias incluye más de 90 especies (Weir, 2011) pertenecientes a la subclase α de Proteobacterias de los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* (los más conocidos y estudiados), así como varias β -proteobacterias dentro de los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Sprent, 2009; Gyaneshwar *et al.*, 2011). Los rizobios y sus interacciones más estudiadas son *Rhizobium leguminosarum* con plantas de porotos y arvejas (Dar *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2003), *Bradyrhizobium japonicum* con plantas de soja (Lodeiro y Favelukes, 1999), entre otros. Existen otras bacterias que fijan nitrógeno formando nódulos en especies de plantas llamadas actinorrícicas que pertenecen al género *Frankia*, y también tienen una gran importancia ecológica (Normand *et al.*, 2007). Además de estos simbiosntes, existen también otras bacterias heterótrofas fijadoras de N_2 (diazótrofas) que no forman estructuras particulares y tienen la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre bajo determinadas condiciones, estableciendo o no una interacción con las plantas no leguminosas. Si bien estas bacterias que no forman estructuras particulares se encuadran dentro de aquellos microorganismos que pueden hacer una simbiosis con algunas plantas, no es común que este término se emplee al referirse a las mismas dejando el mismo para la muy bien estudiada y aceptada simbiosis rizobio-leguminosa. A este grupo de bacterias pertenecen los géneros: *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerincka*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus* y *Stenotrophomonas* (Dobbelaere *et al.*, 2003). *Klebsiella pneumoniae* y *Azospirillum* son bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que en su gran mayoría colonizan la rizosfera de las plantas (Bashan *et al.*, 2004), pero existen otras bacterias diazótrofas capaces de ingresar a los tejidos vegetales y establecerse como endófitas. Hurek y colaboradores (2002) han demostrado que la bacteria diazótrofa endófito *Azoarcus* sp. es capaz de ejercer efectos beneficiosos sobre *Kallar grass* que están asociados directamente a su habilidad de fijar nitrógeno, al igual que *Gluconacetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar (Sevilla *et al.*, 2001). *Azospirillum* fue el primer género estudiado como modelo de FBN con bacterias de vida libre en gramíneas, pero estudios posteriores han demostrado que esta propiedad contribuye en menor medida a la promoción del crecimiento vegetal en estas plantas (Cassán y Díaz-Zorita, 2016). Además de su capacidad de fijar nitrógeno, estos microorganismos poseen también otras características que los hacen promotores

del crecimiento vegetal y que conducen a un aumento del rendimiento, reducción de la infección por patógenos, disminución de *stress* biótico y abiótico, etc. (Compant *et al.*, 2010).

1.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Tal como se mencionó en el párrafo anterior, existen bacterias que pueden beneficiar a las plantas no sólo por la posibilidad de suministrarles compuestos de Nitrógeno fijado a través del proceso de FBN sino también debido a otros mecanismos directos o indirectos, dentro de estos mecanismos se encuentran la producción de reguladores del crecimiento como las auxinas, citoquininas y giberelinas, y algunas propiedades como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales, la protección contra fitopatógenos mediante la inducción de mecanismos de defensa de las plantas, producción de sustancias antagonicas de patógeno o mediante la competencia por los sitios de colonización y nutrientes tal como se resume en la Figura 1.4 (posteriormente en este capítulo se describen algunos de ellos en forma particular de acuerdo a la relevancia que tienen en este trabajo).

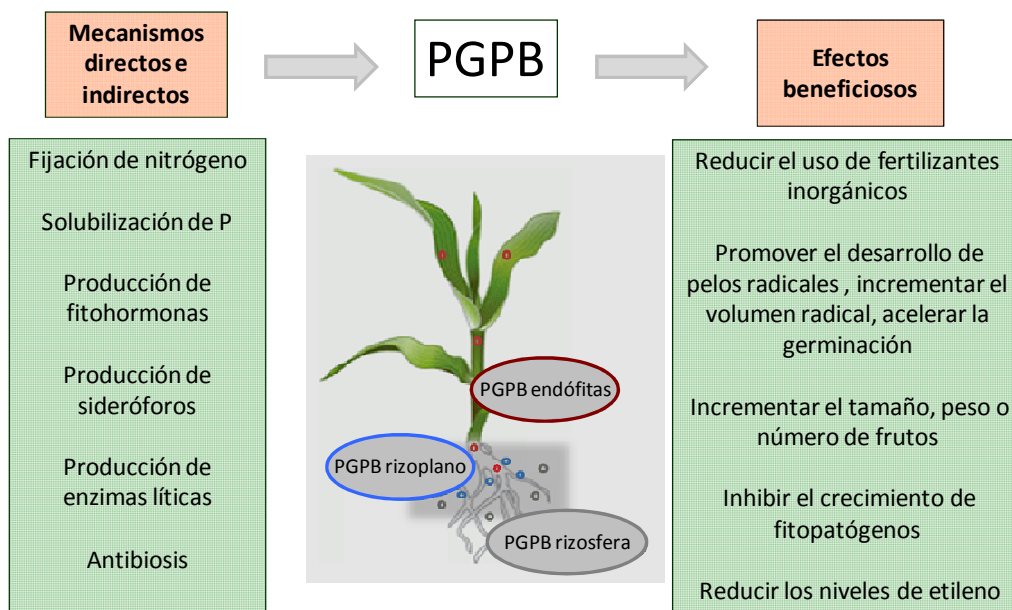


Figura 1.4 Esquema general de mecanismos de acción y efectos beneficiosos de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB.

De acuerdo al tipo de asociación establecida entre la planta y la bacteria, estas bacterias benéficas se podrían clasificar en simbióticas (*Bradyrhizobium*-soja; *Sinorhizobium*-alfalfa) o asimbióticas (*Pseudomonas*-maíz; *Azospirillum*-trigo). No obstante, de acuerdo a su hábitat, interacción con las plantas y funcionalidad fueron adoptando diferentes nombres. En la década del 70 fueron descritas por Kloepper y Schroth (1978) como un grupo heterogéneo de bacterias presentes en la rizosfera que resultaban beneficiosas para las plantas a las que nombró *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* o

PGPR de sus siglas en inglés. La rizosfera puede definirse como la porción del suelo que se encuentra bajo la influencia de los exudados de las raíces de las plantas (Bais *et al.*, 2006; Hirsch y Mauchline, 2012). Debido a la influencia de estos exudados de distinta composición química y a la pérdida de materia orgánica generada a partir del crecimiento de la raíz, la rizosfera es el hábitat de una gran diversidad de microorganismos (Whipps, 2000). En 1989, Kloepper y colaboradores hicieron una restricción a la definición, aclarando que las PGPR eran bacterias de vida libre, para separar a los rizobios de este grupo. Sin embargo, Antoun y colaboradores (1998) han reportado que muchos rizobios presentaron además la capacidad de colonizar plantas no leguminosas, llegando incluso a colonizar los tejidos internos de las plantas sin formar estructuras particulares y promoviendo el crecimiento vegetal a través de otros mecanismos diferentes a la FBN (Yanni *et al.*, 1997; Chabot *et al.*, 1996), aunque no tan eficientemente como en la asociación rizobio-leguminosa. El término PGPR incluía en principio a todas las bacterias benéficas para las plantas, independientemente del mecanismo por el cual promovieran el crecimiento. Kloepper y colaboradores (1989) propusieron la división de las PGPR en dos categorías según el efecto benéfico que ejercían sobre las plantas: promoción del crecimiento y control biológico. Los mecanismos de promoción del crecimiento hasta ese momento no estaban completamente definidos, mientras que el control biológico implicaba la reducción de los daños causados por patógenos. A partir de esa división, diversos términos fueron utilizados para referirse a estos dos grupos, aunque ninguno fue apropiadamente definido (Bashan y Holguín, 1998). En 1998, Bashan y Holguín propusieron una división de las PGPR en dos grupos: uno que incluía las bacterias que podían suprimir el desarrollo de patógenos (Biocontrol-PGPB) y otro, denominado solo PGPB, en el que se incluían las bacterias promotoras del crecimiento que generan este efecto mediante otros mecanismos. El cambio de la palabra “rizobacteria” por “bacteria” es debido a que se fueron descubriendo muchas bacterias promotoras del crecimiento que no se encontraban en la rizosfera, siendo esta nueva denominación la más utilizada. Posteriormente, Sgroy y colaboradores (2009), consideraron la inclusión de un tercer grupo de bacterias promotoras, capaces de regular la respuesta de la planta en condiciones de *stress*, a las que denominaron PSHR (del inglés, *Plant Stress-Homeoregulating Rhizobacteria*), cuyos mecanismos incluyen la producción de compuestos osmocompatibles (trehalosa, prolina, etc.), la regulación de la síntesis de compuestos desencadenantes de *stress* en plantas (etileno, ácido abscísico, etc.) y la inmovilización de compuestos generadores de estrés en el ambiente (sales, metales pesados, etc.). Glick (2012) planteó una nueva definición, aún más amplia que las reportadas anteriormente: las PGPB son bacterias que pueden ejercer efectos promotores del crecimiento vegetal, que incluyen a las que forman simbiosis específicas con las plantas (rizobios), a las de vida libre, a las que pueden colonizar tanto el rizoplano como el interior de los tejidos vegetales (endófitas) y a las cianobacterias, independientemente del mecanismo de acción que utilicen para beneficiar a las plantas. Si bien los

rizobios forman parte de las PGPB, en este trabajo se utilizará de forma general al término PGPB para mencionar a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que interaccionan de forma directa o indirecta con las plantas sin formar estructuras particulares, debido a una mayor sencillez en la redacción y lectura, y porque hay gran cantidad de estudios y aplicaciones ya muy bien definidas de la interacción rizobio-leguminosa, y no así para el resto de las PGPB.

1.6 Ecología microbiana de la raíz y su entorno: lugar que ocupan las PGPB

Tal como se mencionó previamente, las plantas son suministradoras de sustratos para el crecimiento de microorganismos tanto en el entorno rizosférico como en sus tejidos internos, y viven en estrecha asociación con microorganismos que constituyen la microbiota, pudiendo ser éstos benéficos, patógenos, o no causar ningún efecto en las plantas que colonizan. En la Figura 1.5 se muestra un modelo de microbioma de la raíz que muestra los sitios donde se ubican los microorganismos asociados a ella. El microbioma del suelo es el mayor reservorio de diversidad biológica, incluyendo bacterias, hongos, actinobacterias, protozoos y algas. Las bacterias son una parte muy importante de los microorganismos que habitan este nicho ecológico (alrededor del 95% del total) (Glick et al, 2012). En comparación con el *bulk* del suelo, la abundancia de bacterias en la rizósfera es varios órdenes de magnitud más alta (10^{10} – 10^{12} microorganismos/gr de suelo versus $<10^8$ en el *bulk* del suelo) (Schrey *et al.*, 2015). No obstante, solo el 1% de los microorganismos (bacterias) del *bulk* de suelo, y el 10% de aquellos que habitan en la rizósfera, son capaces de crecer en los medios de cultivo estándares, mientras que el resto es no cultivable pero detectable por métodos moleculares (Bacterias Viables No Cultivables o BVNC) (Barret *et al.*, 2011). El suelo es considerado la principal fuente ambiental de las comunidades bacterianas asociadas a plantas, siendo las raíces el órgano de la planta más colonizado (Hardoim *et al.*, 2015). Sin embargo, de esta gran cantidad de rizobacterias, solo del 2 al 5% se considera que son PGPB (Antoun, 2013). Las PGPB se encuentran también colonizando la superficie radical o rizoplano y algunas de ellas tienen la capacidad de colonizar el interior de las raíces (Compant *et al.*, 2005a; Galippe, 1887). Durante mucho tiempo, una planta saludable era aquella libre de microorganismos, pero en las últimas décadas una inmensa cantidad de investigaciones han demostrado que las plantas son colonizadas por un amplio rango de endófitos que en su mayoría provienen de la rizósfera (Compant *et al.*, 2010). Se ha reportado que existe también una transmisión vertical, desde la semilla, y que las plantas pueden ser selectivas para permitir la entrada sólo de microorganismos del suelo que hayan estado presentes durante su evolución y adaptación a las condiciones ambientales. En términos generales las plantas albergan poblaciones endofíticas naturales que se encuentran en el orden de $1 \cdot 10^2$ a $1 \cdot 10^6$ UFC/gramo de raíz (Kobayashi y Palumbo, 2000). En general, los niveles de colonización de las PGPB endofíticas son menores que los de las bacterias patógenas, que pueden llegar a valores del orden de

1.10^7 a 1.10^{10} UFC/gramo de peso fresco. En algunos casos, después de colonizar los tejidos internos de la raíz, las bacterias pueden dispersarse sistémicamente por la planta y colonizar tallo, hojas, flores y frutos (Compant *et al.*, 2005b, 2008a; James *et al.*, 2002).

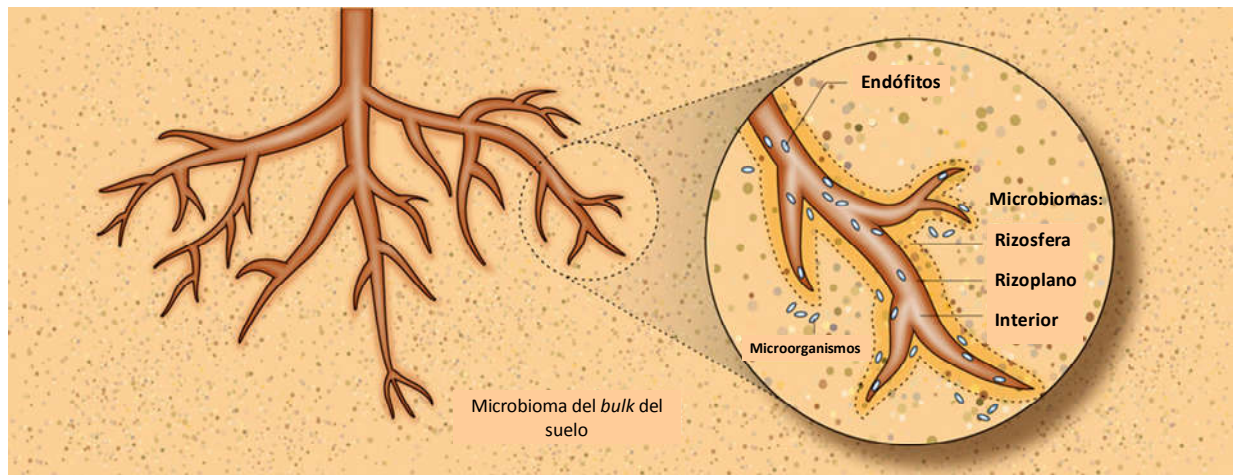


Figura 1.5 Modelo de microbioma de la raíz, donde se observan los sitios donde se ubican los microorganismos. Adaptado de Gaiero *et al.*, 2013.

Dentro de estas comunidades bacterianas, existe una amplia variedad de géneros y especies entre las que se pueden citar *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* entre otros (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006), cuya abundancia, densidad y cantidad difiere de acuerdo a la zona de la planta, a la especie, los eventos de estrés, etc. Por ejemplo, *Azospirillum lipoferum* y *Azotobacter* spp. viven en estrecha asociación con la superficie de la raíz, particularmente en el pelo radical y la zona de elongación de la raíz lateral (James, 2000; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006), endófitos tales como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp., y algunas cepas de *Azospirillum brasilense* (James, 2000; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006) colonizan la corteza y la estela o cilindro central de la raíz en los espacios intercelulares y vasos del xilema.

1.7 PGPB endófitas y sus beneficios

En forma simplificada, el término “endófito” hace referencia a la ubicación de este tipo de microorganismos: “endo” significa dentro y “phyto” significa planta. Sin embargo, la definición de los microorganismos endófitos es más significativa que detenerse solo en el sitio de colonización. En 1995, Wilson definió a los microorganismos endófitos (bacterias u hongos) como microorganismos que en alguna parte o en todo su ciclo vida puede vivir en el interior de las plantas sin causar síntomas de enfermedad. De esta forma, no solo se describió su ubicación sino también se distinguieron de aquellos microorganismos que, si bien pueden colonizar tejidos internos de las plantas, son patógenos. En relación específicamente a bacterias endófitas, la definición más

empleada del término fue derivada de la descripción práctica dada por Hallmann y colaboradores (1997) quienes las definieron como bacterias que pueden ser aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o extraídas de su interior y que no causan un daño visible en las plantas que colonizan. Esta definición abarca tanto a microorganismos benéficos como neutrales, y los autores remarcan que la importancia de esta definición radica en que implica procedimientos prácticos que pueden ser realizados en laboratorio. Posteriormente, Reinhold-Hurek y Hurek (1998) restringieron aun más la definición de endófitos, propusieron como criterio para que un microorganismo endófito sea considerado un endófito verdadero, que no solo es necesario que cumpla los requisitos postulados por Hallmann y colaboradores (1997), sino que además debe poder ser visualizado por técnicas microscópicas en el interior de los tejidos vegetales. Para poder lograrlo, es necesaria la utilización de sondas específicas marcadas o de cepas marcadas con genes reporteros (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011) y en sistemas de cultivo donde se inoculan las bacterias en condiciones gnotobióticas (ver más adelante). No obstante, en la mayoría de los casos de estudio este último criterio no siempre se cumple, quedando el uso del término endófitos putativos como recomendado para aquellos que no se han validado microscópicamente (Carvalho *et al.*, 2014). Esta definición ha sido utilizada en todo el mundo en las últimas décadas para especies cultivables pero, desde el advenimiento de las técnicas moleculares, esta definición parece ser menos adecuada para las especies no cultivables. Hardoim y colaboradores (2015) simplificaron la definición de endófitos como los microorganismos que pasan toda o parte de su ciclo de vida colonizando los tejidos internos de las plantas sin causarles enfermedad, definición que incluye a las PGPB endófitas, las que se caracterizan además por presentar capacidades de promover el crecimiento de las plantas que colonizan.

A diferencia de endosimbiontes tales como rizobios y hongos micorrízico-arbusculares, las bacterias endofitas no se encuentran rodeadas por membranas que las separen físicamente de los tejidos del hospedante y no residen intracelularmente. Sin embargo, las plantas hospedantes en general no desarrollan respuestas de defensa intensas en respuesta a la colonización por bacterias endófitas (Carvalho *et al.*, 2014). El nicho endofítico constituye un ambiente protegido en comparación con el suelo, confiriendo una ventaja ecológica a las bacterias capaces de colonizarlo (Hallmann *et al.*, 1997) debido a que:

- no compiten por los nutrientes con la gran diversidad de microorganismos que viven en la rizosfera
- están protegidas de cambios ambientales y en un ambiente que propicia la fijación biológica de nitrógeno (Cocking, 2003; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006)

Además, establecen una interacción más directa con la planta, teniendo la posibilidad de una mejor transferencia de los efectos beneficiosos (James, 2000). Como el nicho ecológico colonizado es similar al ocupado por los patógenos se ha señalado que son indicadas como agentes de biocontrol

(Ryan *et al.*, 2008). Además, este nicho ha sido indicado como un sitio ideal para la transferencia horizontal de genes (Ryan *et al.*, 2008) y la adquisición de nuevas características por parte de las bacterias. No obstante, las PGPB endófitas pueden también ejercer sus efectos promotores del crecimiento vegetal durante el proceso de colonización de las raíces y en la rizósfera (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

En relación a la reacción de las plantas frente a estos colonizadores, se han encontrado diversos genes con funciones desconocidas que son diferencialmente expresadas durante la asociación planta-endófito (Hardoim *et al.*, 2008). Esto indica que los pasos iniciales de la colonización de los endófitos son activamente monitoreados y, posiblemente, mejorados o disminuidos por la planta hospedante (Fouts *et al.*, 2008; Hardoim *et al.*, 2008). Para explicar esta colonización asintomática por las PGPB endófitas (a diferencia de la infección por bacterias patógenas) se ha postulado que existe un balance entre las reacciones de posible “virulencia” de las bacterias y las respuestas de defensa de la planta (Schulz y Boyle, 2005). También se ha reportado que, en general, las poblaciones de bacterias endófitas ocurren en más bajas densidades que las de patógenos y que en muchas de estas interacciones no hay respuesta de hipersensibilidad por parte de la planta (Schulz y Boyle, 2005). Éstas son algunas de las características que han hecho que el estudio de las PGPB endófitas haya tomado importancia en las últimas décadas.

Han sido reportadas numerosas especies de PGPB capaces de colonizar endofíticamente una gran variedad de plantas (Lodewyckx *et al.*, 2002; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006), tales como las que se muestran en la Tabla 1.2. Entre las PGPB endófitas con capacidad de fijar nitrógeno en vida libre se encuentran *Azoarcus* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp y *Bacillus* sp., entre otros (Ahmad *et al.*, 2008). Estas PGPB han sido aisladas de tejidos desinfectados de diferentes plantas.

PGPB endófitas	Plantas hospedantes
<i>Azospirillum brasilense</i>	Banana
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Caña de azúcar, café
<i>Azoarcus</i> sp.	Arroz, pasto forrajero Kallar
<i>Herbaspirillum seropidicae</i>	Caña de azúcar, arroz, maíz
<i>Bacillus</i> sp.	Maíz, soja, cebada
<i>Burkholderia</i> sp.	Banana, café, arroz
<i>Klebsiella</i> sp.	Arroz, papa
<i>Pseudomonas putida</i>	Zanahoria
<i>Citrobacter</i> sp.	Banana
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zanahoria
<i>Serratia</i> sp.	Arroz

Tabla 1.2 PGPB endófitas y plantas huésped. Adaptado de Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006.

1.8 Colonización eficiente: PGPB competentes

La competencia de las PGPB para ocupar un determinado nicho ecológico está asociada con la eficiencia de colonización. Las PGPB pueden colonizar la superficie exterior de las plantas, tanto de las partes aéreas (fitoplano) como de la raíz (rizoplano) y ser epifíticas, así como los tejidos internos del vegetal, siendo éstas endófitas. La capacidad de colonizar estos diferentes nichos ecológicos es debido a que poseen ciertas características que los hacen competentes. Cuando estos microorganismos se encuentran en el suelo o en las semillas deben ser rizocompetentes para ser eficientes colonizadores. En este proceso interactivo de colonización, la comunicación entre la planta y la bacteria (y viceversa) juega un papel muy importante, siendo un proceso dinámico cuyo éxito depende de un ambiente adecuado y de factores genéticos de ambos organismos (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Debido a la complejidad de estas interacciones planta-microorganismo, es difícil entender los mecanismos implicados en los procesos de selección y colonización, y mucho se trata de extrapolar de la muy bien estudiada interacción *Rhizobium*-leguminosa la cual es un sistema altamente evolucionado de comunicación de especies específica (Bais *et al.*, 2006). En la interacción PGPB-planta esta involucrado el reconocimiento inicial de señales moleculares, seguido del movimiento de la bacteria en dirección de la planta hospedera, su adhesión a la superficie de la raíz, la colonización de la superficie y posteriormente el ingreso en el interior de la misma cuando se trata de PGPB endófitas (Reis y Olivares, 2006).

Para lograr una eficiente colonización de las raíces, el primer requisito es la aproximación de las bacterias a las mismas: los mecanismos de acercamiento espacial pueden ser pasivos, si la bacteria se encuentra en la semilla o en la yema de propagación vegetativa, o activos a través del movimiento por atracción quimiotáctica o electrostática desde la rizósfera hacia la superficie de la raíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Si bien la deposición de los microorganismos sobre los tejidos de las plantas puede ser mediada por el agua presente en el suelo (pasiva), la presencia de flagelos para la motilidad hacia los exudados de las plantas les confieren una alta competitividad con respecto a otros microorganismos presentes en la rizosfera (Bais *et al.*, 2006; Scharf *et al.*, 2016; Turnbull *et al.*, 2001). Un factor que contribuye fuertemente a la competitividad es la movilidad direccional de la respuesta quimiotáctica a los exudados de la raíz (de Weert *et al.*, 2002). Entre los quimioatrayentes más comunes de las raíces se encuentran los ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos (Hardoim *et al.*, 2008). Esta respuesta varía entre las PGPB: los ácidos orgánicos exudados de la raíz son los principales quimioatrayentes en la interacción *P. fluorescens*-tomate (de Weert *et al.*, 2002), mientras que los carbohidratos y aminoácidos atraen a *Corynebacterium flavesces* y *Bacillus pumilus* en su interacción con arroz (Bacilio-Jimenez *et al.*, 2003). La aparente especificidad en estas interacciones probablemente se relaciona con las necesidades nutricionales bacterianas y, en cada uno de estos casos, podría determinar la especificidad de la interacción. Se ha

reportado que cepas promotoras del crecimiento mutantes en los genes responsables de la quimiotaxis o de los genes de formación de flagelos fueron incapaces de colonizar eficientemente el rizoplano (de Weert *et al.*, 2002; Oku *et al.*, 2012). Las asociaciones de *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasilense* y *Serratia* spp. con trigo y arroz (Balachandar *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 1998) implican compuestos señales muy específicos, y se estima que los flavonoides pueden ser importantes en estas interacciones. Esta intensa comunicación en los alrededores de las raíces provee un amplio rango de interacciones microbianas generando un ambiente altamente competitivo.

La adhesión a la raíz es un proceso que consta en general de dos etapas: una reversible, en la que las bacterias interactúan con la pared celular vegetal a través de uniones electrostáticas débiles, rápidas, inespecíficas y reversibles, y otra irreversible, en la que el microorganismo comienza a colonizar la superficie de la raíz. Este proceso ha sido muy estudiado en la interacción *A. brasilense* y trigo, en el que la primera fase se denominó de adsorción y una segunda fase de anclaje que tiene lugar a las 8-16 h después de la inoculación (ver luego) y es irreversible y fuerte, probablemente debido a la formación de una matriz de exopolisacárido (EPS) extracelular (Benizri *et al.*, 2001).

En la adhesión irreversible, considerada como el comienzo del proceso de colonización, la interacción es más específica involucrando estructuras bacterianas para la ligación como fimbrias, pilis y modificaciones de la pared celular vegetal. Se ha reportado que el establecimiento en los sitios de adhesión puede ser en forma de monocapa, en agregados bacterianos y/o formando películas bacterianas. Particularmente se considera que las películas bacterianas de tipo *biofilm* (Ver Anexo 1), compuestas principalmente de EPS, constituyen un microambiente óptimo para la transferencia horizontal de genes así como para las señales de *quorum sensing* (QS), adjudicándole la función de barrera de difusión de dichas moléculas (Olivares, 1997). La adhesión junto con el desarrollo de una población bacteriana se considera una ventaja selectiva para la bacteria, aumentando la probabilidad de ingresar al tejido.

El universo de las PGPB es muy amplio y si bien debido a esto aún no hay un consenso general sobre respuestas comunes a los diferentes compuestos secretados por la inmensidad de plantas entre la gigantesca combinación de interacciones PGPB-planta, existen numerosos reportes que muestran que las PGPB responden a los exudados de las plantas a través de la modulación de la expresión de diversos genes, tales como aquellos asociados con la síntesis de EPS y la formación de *biofilm* (Beauregard *et al.*, 2013; Meneses *et al.*, 2011; Rudrappa *et al.*, 2008). En el *biofilm* formado sobre la superficie de las raíces las comunidades microbianas típicamente embebidas por una matriz producida por ellas mismas, se encuentran protegidas de factores adversos del medio ambiente (Fuqua y Greenberg, 2002). Por ejemplo, *B. subtilis* es atraído por ácido L-málico secretado por *A. thaliana*, y la formación de *biofilm* es selectivamente activada por este compuesto en un proceso

dependiente de los mismos genes requeridos para la formación de *biofilm in vitro* (Beauregard *et al.*, 2013; Rudrappa *et al.*, 2008). La síntesis de EPS también es requerida para la formación de *biofilm* y para la colonización de la PGPB endófito *G. diazotrophicus*. Un mutante de *G. diazotrophicus* PAL5 deficiente para la producción de EPS no pudo adherirse sobre la superficie ni colonizar endofíticamente raíces de arroz (Meneses *et al.*, 2011). *Azospirillum brasilense*, una PGPB que normalmente coloniza y promueve el crecimiento de gramíneas como el trigo y el maíz, tiene la capacidad de colonizar el rizoplano formando *biofilms* (Assmus *et al.*, 1995; Ramey *et al.*, 2004). Timmusk y colaboradores (2005) han reportado la formación de *biofilm* en raíces de *Arabidopsis thaliana* y cebada por parte de *Paenibacillus polymyxa*, demostrando mediante la utilización de una cepa marcada con la proteína GFP y técnicas microscópicas el patrón de colonización generado por esta PGPB.

La comunicación entre las células bacterianas vía *quorum sensing* (QS) involucra mecanismos de señales intercelulares que coordinan el comportamiento en comunidad monitoreando densidad poblacional, también regula la colonización de las raíces (Danhorn y Fuqua, 2007; Schenk *et al.*, 2012). Las PGPB frecuentemente emplean este mecanismo de señales moduladas por compuestos como acil homoserina lactonas (AHLs) entre las proteobacterias y oligopéptidos entre las Gram positivas (Danhorn y Fuqua, 2007). *G. diazotrophicus* PAL5 coloniza un amplio rango de plantas hospedantes y presentando QS produciendo ocho moléculas de la familia de la AHL (Bertini *et al.*, 2014). Genes asociados a la respuesta al *stress* también participan en la interacción PGPB-planta. Las enzimas bacterianas superóxido dismutasa y glutatión reductasa fueron cruciales para la colonización endofítica de raíces de arroz por *G. diazotrophicus* PAL5 (Alquères *et al.*, 2013). En *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, genes involucrados en la quimiotaxis y movilidad fueron inducidos por exudados de plantas de maíz deficientes en fósforo, mientras que bajo deficiencia de N activaron una respuesta general al *stress* (Kierul *et al.*, 2015). *A. lipoferum* durante la interacción con diferentes cultivares de arroz involucró genes asociados a especies reactivas al oxígeno (Droque *et al.*, 2014).

La colonización no es uniforme a lo largo de la raíz debido a diferentes factores como la producción diferencial de exudados (la zona de pelos radicales tiene una mayor cantidad de exudados que en la zona apical (Grayston *et al.*, 1996)), efectos de QS, entre otros.

1.9 Colonización endofítica: particularidades

Como se mencionó anteriormente la mayor parte de los endófitos se originan del ambiente rizosférico (Compant *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2013), por lo tanto, deben ser eficientes colonizadores de la rizosfera y/o rizoplano. Una colonización endofítica exitosa involucra un huésped compatible. Se postula además que los endófitos representan a miembros especializados de los colonizadores del rizoplano: existe una selección por parte de la planta de las bacterias más

adaptadas a la vida endófitas siendo éstas reclutadas de un gran *pool* de bacterias rizosféricas (Hardoim *et al.*, 2008) y que eventos estocásticos, ambientales y factores que dependen de las bacterias conducen a que éstas puedan colonizar los tejidos internos.

En general, la adhesión bacteriana se puede dar en cualquier parte de la superficie de la raíz, en donde las bacterias puedan crecer a partir de los exudados radicales, y formar microcolonias, *biofilm*, agregados, etc. Para el caso de las endófitas, se ha reportado que el ingreso de las bacterias endófitas desde el rizoplasma hacia el tejido cortical de la raíz puede implicar tanto mecanismos pasivos como activos (Compant *et al.*, 2010) y diferentes vías de ingreso (Hallmann *et al.*, 2001; James *et al.*, 2002). No obstante, todas las bacterias que colonizan el rizoplasma tienen la posibilidad de ingresar de esta forma (Hardoim *et al.*, 2008). En la Figura 1.6 se muestran dibujos esquemáticos de la raíz y sus zonas, de las células de la epidermis y sus diferentes membranas, y la zona de unión entre las células (sin espacios intercelulares) por donde puede ocurrir la internalización bacteriana. El ingreso pasivo puede tener lugar por grietas naturales presentes en las zonas de emergencia de las raíces laterales (a través de la lamina media de la epidermis), como así también por la base de los pelos radicales y en la zona de crecimiento del ápice de la raíz (Carvalho *et al.*, 2014; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998) (Figura 1.6) o las generadas por microorganismos o por roturas mecánicas sobre la rizodermis.

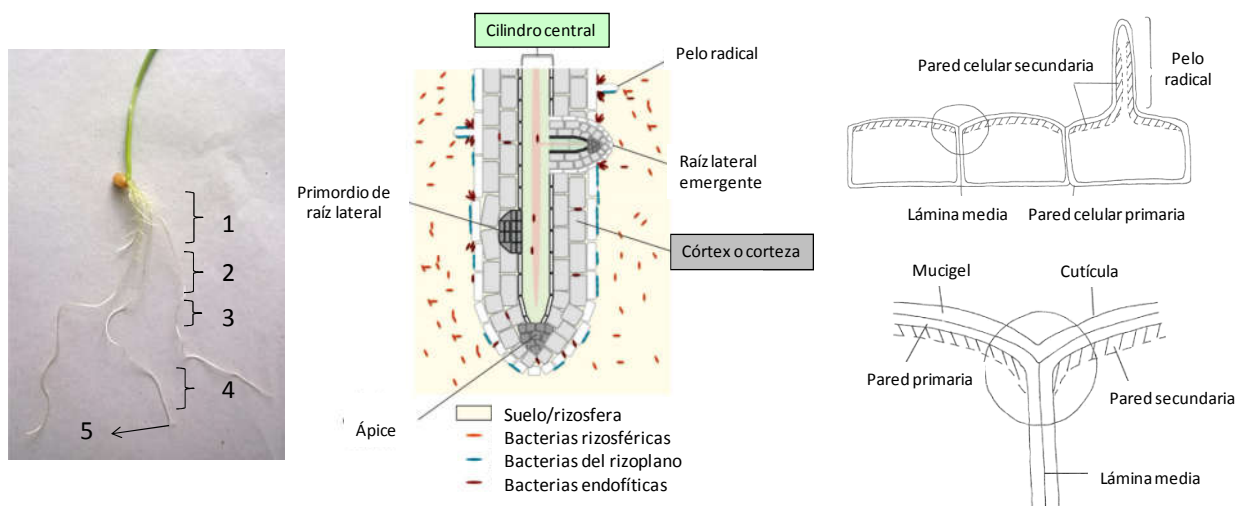


Figura 1.6 Izquierda: Zonas de la raíz de una planta de trigo de 7 días: 1: zona de raíces secundarias; 2: zona de pelos radicales maduros; 3: zona de pelos radicales jóvenes; 4: zona de elongación; 5: ápice. Derecha: Dibujos esquemáticos de los posibles sitios de colonización de las PGPB. Adaptación de Baldani *et al.*, 1987 y Carvalho *et al.*, 2014.

Mercado-Blanco y Prieto (2012) sugieren como sitio de entrada de las bacterias endófitas la colonización vía los pelos radicales. Prieto y colaboradores (2011) reportaron que la colonización endofítica de raíces de olivo por de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* ocurre por los

pelos radicales. Además, debido a la capacidad de absorción de nutrientes por esta zona de la raíz, el ambiente que rodea a los pelos radicales es propicio para la vida de los microorganismos.

Los mecanismos activos que presentan las bacterias endófitas para ingresar a los tejidos de las plantas implican la expresión de enzimas líticas que degradan la pared celular vegetal, como lo son las pectinasas y celulasas (Compant *et al.*, 2010; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006) (más adelante se describe en profundidad), y los utilizan para fabricarse sus propias grietas en los tejidos de la rizodermis y dentro los tejidos internos de las plantas.

Posteriormente al ingreso a la raíz, ya sea pasivo o activo, las PGPB endófitas responden a las señales de la planta para permitir la inducción de los procesos celulares necesarios para permitir la colonización endofítica en tejidos de la corteza radical en el apoplasto, básicamente en los espacios intercelulares. En las poáceas, tal como el trigo y el sorgo, las células corticales están regularmente dispuestas, con espacios intercelulares triangulares y la médula no presenta espacios intercelulares (Figura 1.7). Luego, algunos endófitos competentes logran atravesar la barrera de la endodermis. Para las bacterias que pueden pasar la barrera de la endodermis, el sistema vascular del xilema es la principal vía de transporte para la colonización sistémica de compartimentos internos de plantas (James *et al.*, 2002). Se ha demostrado que las bacterias pueden colonizar los vasos del xilema, y que los orificios de las placas entre los elementos del xilema son suficientemente grandes para permitir el paso bacteriano (Compant *et al.*, 2005a; Compant *et al.*, 2010; James *et al.*, 2002). Sin embargo, la propagación vertical de las bacterias a través de las plantas puede tomar varias semanas (Compant *et al.*, 2008b), y no está claro por qué las endófitas bacterianas avanzan tan lentamente en el sistema vascular. No existen muchos reportes pero el tamaño de la población endofítica depende del estado de desarrollo de la planta (Hardoim *et al.*, 2015).

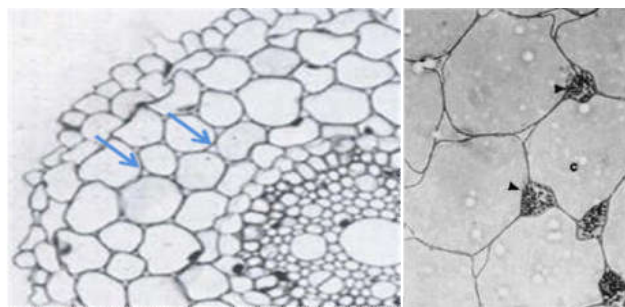


Figura 1.7 Corte transversal de una gramínea o poácea mostrando los espacios intercelulares triangulares (izquierda) y colonizados por bacterias endófitas (derecha) (http://www.biologia.edu.ar/botanica-tema_20).

Como se detalló previamente, los mecanismos activos que presentan las bacterias endófitas implican la expresión de enzimas líticas que degradan la pared celular vegetal, como lo son las pectinasas y celulasas, que solas o combinadas, y aún en baja concentración, pueden degradar la pared celular vegetal para dar paso a la colonización de las PGPB (Ver Anexo 1). Por ejemplo, la

endoglucanasa (EG), clasificada como celulasa, puede hidrolizar las uniones internas de la cadena de celulosa, mientras que la endopolimetilgalacturonasa (EPMG), clasificada como pectinasa, está involucrada en la degradación de la pectina. Las PGPB endófitas pueden pasar a través de la endodermis mediante la secreción de enzimas que degradan las paredes celulares para luego continuar la colonización en el interior de los tejidos vegetales (James *et al.*, 2002). La capacidad de degradar pectinas, el mayor constituyente de la pared primaria de las células vegetales y de la lámina media, es una característica de muchas bacterias asociadas a plantas, especialmente bacterias patógenas de las mismas. La celulasas y las pectinasas son a menudo producidas por bacterias fitopatógenas tales como *Pseudomonas solanacearum* y *Erwinia chrysanthemi*, pero a diferencia de las PGPB, estos microorganismos producen lesiones graves en los tejidos de las plantas que colonizan. La lámina media que conecta a las células vegetales unas con otras, consiste principalmente de pectina que funciona como sustancia cementante, mientras que las paredes primarias y secundarias (en células maduras) poseen un 30 a 70% de celulosa respectivamente. Así es como la colonización intercelular de las bacterias estaría mediada por la secreción de enzimas pécticas que permitirían la ocupación de los espacios intercelulares a través de la ruptura de la lámina media de la pared tal como se ha propuesto para algunas PGPB endófitas. También se sugiere la producción de enzimas celulolíticas que facilitarían la digestión de la pared celular para que sea posible una diseminación vertical, como es el caso de *Azoarcus* sp. BH72 (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993). Esta bacteria no utilizaría las celulasas para crecer ya que no se registra crecimiento con carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono y energía (FCE) y se postula que su rol sería asistir a los microorganismos durante la invasión de los tejidos en el proceso de colonización de la raíz. Esta PGPB no secreta sus enzimas celulolíticas, sino que éstas están asociadas a la superficie celular de *Azoarcus* y se postula que de esta manera podrían mediar una digestión más localizada de la pared celular de las plantas y menos agresiva en comparación con los organismos fitopatógenos. La mayor parte de estas celulasas parecen estar reguladas por mecanismos de inducción-represión dependiendo de la FCE del medio, no obstante en algunas bacterias del rumen como *Pseudomona ruimicola* éstas se expresan constitutivamente. Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a plantas la actividad celulolítica se ha encontrado en *Frankia* sp. (Safo-Sampah y Torrey, 1988) y también en *Rhizobium* sp. (Mateos *et al.*, 1992; Morales *et al.*, 1984). Ha sido reportado que *Azospirillum irakense*, aislado del interior de tejidos desinfectados superficialmente, fue capaz de crecer en un medio con pectina como única FCE. Estas enzimas fueron también encontradas en raíces de plantas de sorgo inoculadas con la PGPB endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Adriano-Anaya *et al.* 2006). La biosíntesis de pectinasas y celulasas ha sido extensamente estudiada en microorganismos patógenos, pero es muy poca la información disponible sobre la síntesis y la regulación de estas enzimas en bacterias no patógenas. Por ejemplo, una endoglucanasa funcional

bacteriana fue importante para la colonización endofítica por *Azoarcus* sp. BH72 y *Burkholderia* sp. PsJN (Compant *et al.*, 2005b; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006). Se ha propuesto que los niveles de degradación de la pared celular por enzimas producidas por bacterias colonizadoras de las raíces se diferencian: los endófitos bacterianos producen niveles bajos de degradación, mientras que las bacterias fitopatógenas presentan niveles deletéreos altos (Elbeltagy *et al.*, 2000). Hurek y colaboradores (1994) reportaron que *Azoarcus* sp. tiene la capacidad de ingresar a los espacios intercelulares de raíces de gramíneas y, una vez allí, aumentar la densidad celular y moverse entre los tejidos vasculares centrales de las plantas hasta llegar a los tejidos aéreos, como lo son los tallos y las hojas. De esta forma, tiene la posibilidad de manipular el metabolismo de las plantas que coloniza y mantener un armonioso balance entre ambos.

En general, no se conoce si las PGPB endófitas necesitan alcanzar un tejido u órgano específico para el desempeño adecuado de sus funciones. En cuanto a la localización en la planta, si bien generalmente el mayor número de bacterias endófitas se encuentra en las raíces, también se ha reportado colonización en tallos, semillas, hojas, frutos, tubérculos, órganos reproductivos y en el interior de nódulos (Benhizia *et al.* 2004; Compant *et al.*, 2011; Hallmann *et al.* 1997; Sturz *et al.* 1997).

Las bacterias endófitas, propagadas verticalmente a partir de las semillas, también pueden ser epífitas del filoplano (microambiente en la superficie de las hojas). El tallo y las superficies foliares también producen exudados que atraen microorganismos (Compant *et al.*, 2010; Hardoim *et al.*, 2015). Sin embargo, la luz UV, la falta de nutrientes y la desecación generalmente reducen la colonización de las superficies y las bacterias más adaptadas pueden sobrevivir e ingresar a la planta a través de estomas y heridas (Hallmann *et al.*, 2001).

El avance reciente en la secuenciación de diversos genomas bacterianos sugiere que los mecanismos de modulación de las respuestas de defensa del hospedante usados por bacterias endófitas son diferentes de los más frecuentemente encontrados en bacterias simbiotes mutualistas y patógenas (Hardoim *et al.*, 2015).

1.10 Características generales de las PGPB competentes

En resumen, ciertas características de las PGPB son importantes para que las bacterias aumenten en número y puedan tener lugar la colonización superficial eficiente de las raíces (rizocompetencia) y de los tejidos internos en el caso de las PGPB endófitas (Compant *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2004; Whipps, 2001). La composición de los polisacáridos de la pared celular bacteriana, así como la producción localizada y controlada de enzimas degradadoras de la pared celular del hospedante y la movilidad de tipo *twitching* asociada a la presencia de *pili* de tipo IV, son factores que son necesarios

en la colonización endofítica por algunas bacterias. Algunas de estas características se detallan en forma resumida en la Tabla 1.3.

Colonización de rizosfera y rizoplano	Colonización de tejidos internos
Quimiotaxis	Flagelos
Metabolizar rápidamente compuestos exudados de la raíz	Enzimas degradadoras de pared celular
Versatilidad metabólica	Mecanismos de detoxificación
<i>Quorum sensing</i>	Pili tipo IV
Síntesis de aminoácidos y vitamina B1	Motilidad
NADH deshidrogenasa	LPS
LPS	
EPS	
Flagelos	
Fimbrias	
Proteínas de membrana	
Aglutinina	
Pili tipo IV	
Secreción de antibióticos	
Producción de sideróforos	
Recombinasa sitio-específica	
Tolerancia al <i>stress</i>	

Tabla 1.3 Características conocidas requeridas para la competencia en la rizosfera, el rizoplano y los tejidos internos de PGPB. Adaptado de Compant *et al.*, 2010.

1.11 La importancia de la colonización

Tanto en los ecosistemas naturales como en los sistemas agrícolas, las PGPB desempeñan un papel muy importante en mantener y/o mejorar la salud y el crecimiento de las plantas. Con el fin de utilizar las PGPB en la agricultura, se formulan inoculantes (ver luego) que deben cumplir con ciertos requisitos para poder conferir el efecto beneficioso en las plantas donde son aplicados. Después de la inoculación de las PGPB, normalmente en la semilla en el caso de las gramíneas, éstas deben ser capaces de sobrevivir y multiplicarse en el ambiente de las plantas que colonizan, al menos por el tiempo necesario para expresar los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal. Por lo tanto, antes de conferir cualquier efecto beneficioso las PGPB inoculadas necesitan ser rizosfera y/o rizoplano competentes (Compant *et al.*, 2005a). Para lograrlo, es necesario que puedan adaptarse a factores abióticos, como lo son el tipo de suelo, su composición, pH y temperatura (Benizri *et al.*, 2001), y factores bióticos, como la microbiota del ambiente que deben colonizar. Además, como se detalla más adelante en este capítulo, una vez inoculadas sobre las semillas, primero las PGPB se enfrentan a condiciones adversas del medio por las que normalmente pierden viabilidad, tales como desecación, altas temperaturas y/o sustancias tóxicas presentes en los exudados de las semillas. Luego, la dispersión de las PGPB desde la superficie de la semilla hacia la zona de desarrollo de la raíz

está controlada por dos mecanismos fundamentales: la motilidad activa de las bacterias; y el movimiento pasivo en el agua de filtración o por vectores (Benizri *et al.*, 2001). Kloepper y colaboradores (1989) esquematizaron la colonización de una raíz post-inoculación (PI) de las semillas con PGPB tal como se muestra en la Figura 1.8.

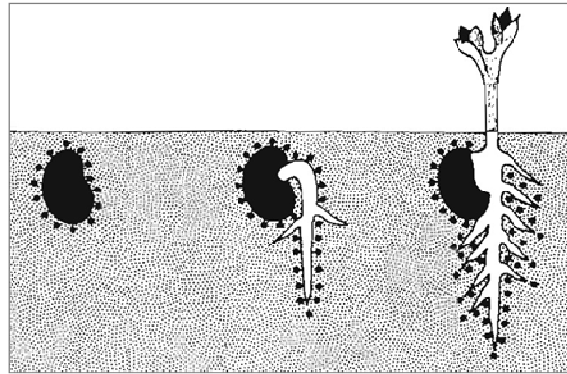


Figura 1.8 Colonización hipotética de una PGPB post-inoculación de la semilla (Kloepper *et al.*, 1989).

No obstante, hoy es aceptado que tanto en sistemas gnotobióticos (ver luego) como en suelos naturales, si bien las PGPB se distribuyen longitudinalmente, el sistema radical no está colonizado de una manera uniforme. Se han registrado diferentes densidades de población, en diversas zonas de las raíces, debido por ejemplo a la diferente composición o cantidad de exudados producidos por las mismas (Benizri *et al.*, 2001).

Por lo anteriormente expuesto, uno de los desafíos relacionados a la aplicación de inoculantes es la necesidad de establecer una elevada población de la bacteria introducida para que pueda ejercer su efecto benéfico en un ambiente donde existe una intensa competencia por nutrientes y una multiplicidad de factores adversos que afectan su viabilidad. No obstante, a menudo la falta de respuesta en los ensayos a campo es atribuida a una ineficiente colonización (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Por lo tanto, la comprensión de los procesos de colonización es importante para predecir mejor cómo las bacterias interactúan con las plantas y si es posible que se establezcan en el entorno de la planta para su uso como inoculantes aplicados en el campo.

En resumen, la colonización de las raíces por las PGPB es un proceso complejo bajo la influencia de muchos factores como las características de la bacteria inoculada, del hospedante, y de efectos abióticos y bióticos del suelo. La profundización del conocimiento de los complejos mecanismos que regulan la colonización de plantas por las PGPB representa un interesante desafío científico. Además de contribuir al conocimiento de aspectos básicos de las interacciones entre plantas y microorganismos, la elucidación de tales mecanismos permitirá en el futuro mejorar la eficiencia de los productos biológicos formulados sobre la base de estas bacterias.

1.12 Metodologías de estudio de las PGPB inoculadas

Tanto para caracterizar la interacción PGPB-planta así como persiguiendo el objetivo final de la aplicación de las PGPB como inoculantes en cultivos de importancia agronómica, surge la necesidad de estudiar la colonización y supervivencia de las PGPB en las plantas inoculadas. Para llevar a cabo estos estudios de la colonización de una PGPB en la planta inoculada es necesario poder distinguir y visualizar dicha bacteria. En el sistema suelo-planta(semilla) inoculada, la complejidad de la interacción es inmensa, por lo que un sistema de estudio menos complejo y reproducible es aquél en el que se desinfectan las semillas (para eliminar la población microbiana nativa superficial), luego se inoculan con el microorganismo en estudio y posteriormente se ponen a germinar y crecer en cámara de cultivo en un soporte estéril (Simons *et al.*, 1996), donde la bacteria en estudio crece sin competencia con otros microorganismos (Lifshitz *et al.*, 1987). El crecimiento de las plantas en estas condiciones puede realizarse en sustratos sólidos, semi-sólidos o líquidos (Kloepper y Schroth, 1981; Rouws *et al.*, 2010; Simons *et al.*, 1996). A este tipo de sistema se lo denomina sistema de crecimiento en condiciones gnotobióticas y es muy utilizado para evaluar la capacidad de colonización de las PGPB y la influencia de factores bióticos o abióticos sobre ésta. El desarrollo de estos sistemas con condiciones gnotobióticas ha sido clave para el estudio de este tipo de interacción. La desinfección de las semillas puede realizarse mediante diversos protocolos previamente descritos (Bashan *et al.*, 1986; Hurek *et al.*, 1994), aunque debido a que la población microbiana de las semillas es variable, suele ser necesaria una puesta a punto de la desinfección para que ésta sea efectiva. Con estos estudios se pretende:

- monitorear las PGPB inoculadas: caracterizar los patrones de colonización, localización y distribución bacteriana en la planta inoculada, cuantificar las poblaciones de la bacteria inoculada (del rizoplano y endofítica) y su persistencia en el tiempo, entre otros (Gamalero *et al.*, 2003).
- elucidar las bases moleculares de la interacción PGPB-planta, buscando rasgos bacterianos que puedan estar involucrados en la colonización, principalmente a través de la construcción de mutantes defectivos de genes potencialmente implicados en la colonización y posterior análisis de la habilidad de colonización estos mutantes en competición con la cepa salvaje.

Existen diversos métodos que se pueden aplicar para monitorear a las PGPB inoculadas y se pueden dividir en dos grupos: a- los métodos dependientes de cultivo, que corresponden a las clásicas metodologías basadas en el cultivo y aislamiento de las PGPB, y b- aquellos independientes de cultivo, que pueden ser inmunológicos y moleculares, con los que se puede detectar también a los microorganismos viables pero no cultivables (Ahmad *et al.*, 2008). Cada metodología tiene sus ventajas y limitaciones. Algunas de estas metodologías son para cuantificar la población bacteriana en las zonas colonizadas y otras para caracterizar la distribución y localización de los microorganismos.

a- Métodos dependientes de cultivo. Es la metodología más usada por ser simple y de fácil aplicación, permite la cuantificación de bacterias viables pero no se pueden detectar aquellas que se tornaron no cultivables, por lo tanto pueden subestimar el número de bacterias presentes en la muestra. Está basada en la suspensión de muestras de suelo o de tejidos de las plantas (raíces, tallos) y la siembra en un medio de crecimiento adecuado previa dilución (ver luego).

Luego del crecimiento en condiciones gnotobióticas, se pueden cuantificar las poblaciones de la bacteria inoculada tanto del rizoplasma (o filoplasma) y del interior de los tejidos previa desinfección superficial (endofítica). Esta desinfección puede llevarse a cabo de varias formas, desde la utilización de sustancias como hipoclorito de sodio o cloramina (Gyaneshwar *et al.*, 2001; Hallmann *et al.*, 2001; Ladha *et al.*, 1997; McInroy y Kloepper, 1994), o hasta incluyendo procesos mecánicos para despegar a los microorganismos (Okon *et al.*, 1977). Es necesaria la realización de controles de desinfección de los tejidos, con el fin de asegurar que los microorganismos hallados mediante este método se encuentran ubicados efectivamente en el interior de los tejidos vegetales (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011). Una vez desinfectada la superficie de los tejidos, se realiza el macerado de los mismos y la siembra en un medio de cultivo adecuado para su evaluación. El método más utilizado es el de recuento en placa previa dilución (ver capítulo 2). La población del rizoplasma se calcula como la diferencia entre la población total del tejido sin desinfectar y la población endofítica (Gyaneshwar *et al.*, 2001). En este tipo de estudios, si bien son en condiciones gnotobióticas, los controles de tejidos no inoculados muchas veces presentan el crecimiento de microorganismos debido principalmente a la flora nativa endofítica de la semilla. Por lo tanto, en general, y también cuando se trata de estudios de competición o llevados a cabo en condiciones no gnotobióticas, se utiliza la resistencia a algún antibiótico, se introducen genes reporteros o se hibridan con sondas específicas las colonias aisladas para la identificación del microorganismo inoculado (por ejemplo, por amplificación del gen ARNr 16S).

En los ensayos en condiciones gnotobióticas se pueden encontrar en promedio a los 15 días PI alrededor de 10^6 y 10^9 UFC de bacterias inoculadas en el rizoplasma por gramo de peso fresco de tejido (Bernabeu *et al.*, 2015; Compant *et al.*, 2005b; Gyaneshwar *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2010). Las PGPB han sido visualizadas como células simples pegadas a la superficie radicular y subsecuentemente en parejas en la rizodermis formando filas de bacterias (Hansen *et al.*, 1997). La colonización puede ocurrir también en toda la superficie radical y pueden establecerse formando microcolonias o *biofilms* (Benizri *et al.*, 2001). Con posterioridad a una exitosa colonización del rizoplasma algunos microorganismos pueden internalizarse en los tejidos radiculares y establecer poblaciones endofíticas que se encuentran a los 15 días PI en el rango de 10^4 a 10^6 UFC/g de peso fresco de tejido (Compant *et al.*, 2005b; Hallmann *et al.*, 2001; Zinniel *et al.*, 2002). Además de permitir la cuantificación de las poblaciones del rizoplasma y endofítica, el crecimiento en condiciones

gnotobióticas es ampliamente utilizado para la observación de los patrones de colonización mediante técnicas microscópicas. Teniendo en cuenta la complejidad del proceso de colonización de las PGPB, la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos en condiciones gnotobióticas a los ensayos realizados en condiciones de campo, es realmente ambicioso. Ensayos en el laboratorio con sustratos no estériles se pueden llevar a cabo como una aproximación a dichas condiciones. No obstante, existen pocos reportes en relación a la cuantificación de PGPB inoculadas en condiciones no gnotobióticas, por ejemplo en suelo no estéril, y los ensayos difieren en general en la forma de inoculación, en el sustrato utilizado, etc. Inoculando tierra no estéril con distintas concentraciones de inóculo y creciendo en medios selectivos con antibióticos, Compant y colaboradores (2008b) encontraron colonización superficial de *B. phytophirmans* del orden de 1.10^5 UFC/gramo de raíz y poblaciones endofíticas del orden de 1.10^2 UFC/gramo de raíz, valores mucho menores a los encontradas en condiciones gnotobióticas para este microorganismo (Compant *et al.*, 2005b). Shishido y Chanway (2000) estudiaron la interacción de varias PGPB con plantas de píceas crecidas en diferentes sustratos. También encontraron poblaciones del rizoplasma del orden de 1.10^4 - 1.10^5 UFC/gramo de peso fresco pero aunque el valor de estas poblaciones fue similar para todas las PGPB, sólo dos de ellas fueron capaces de colonizar endofíticamente los tejidos vegetales, alcanzando valores de 1.10^2 - 1.10^4 UFC/gramo de raíz.

La presencia de PGPB y su cuantificación en muestras de plantas inoculadas en condiciones de campo también es estudiada mediante metodologías dependientes de cultivo que involucran el aislamiento bacteriano y la evaluación tradicional por técnicas de cultivo como el recuento en placa. Estas metodologías presentan la desventaja de la necesidad de conocer un medio de crecimiento selectivo para el organismo de interés en el que también es posible recuperar otros aislamientos que no son de interés, ya que en este caso no se inocula con cepas marcadas como en los ensayos de laboratorio, donde se emplea el marcaje con antibióticos.

Por otro lado, las PGPB pueden tornarse no cultivables (BVNC) y detectables solo por técnicas microscópicas y moleculares (Garbeva *et al.*, 2001).

b- Métodos independientes de cultivo que pueden resumirse en:

- métodos serológicos: la inmunolocalización, basada en el uso de moléculas señal fluorescentes conjugadas a un anticuerpo específico de un antígeno bacteriano que luego se observa al microscopio de fluorescencia. Esta fue una de las primeras herramientas utilizadas en estudios de microbiología ambiental, como la técnica de ELISA, basada en el método *sandwich* directo o indirecto.
- métodos con las bacterias marcadas con marcadores cromogénicos: pioneros en los estudios de colonización, principalmente el gen reportero *gus* que codifica para la enzima β -glucuronidasa y en presencia de un sustrato específico produce un pigmento de color azul (Jefferson *et al.*, 1986). Esta

técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar la localización de bacterias en los tejidos vegetales (Hurek *et al.*, 1994; Mitra *et al.*, 2016; Rouws *et al.*, 2010; Van de Broek *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1995). La localización de las bacterias marcadas con los genes reporteros *gusA* o *lacZ* en los tejidos de las plantas inoculadas a menudo conduce a la difusión del color a lugares que pueden no ser los sitios de colonización bacteriana (Sessitsch *et al.*, 1998). No obstante, construcciones estables con estos marcadores se continúan empleando para estudiar la colonización superficial y los posibles sitios de entrada de los microorganismos en las plantas que colonizan haciendo uso de microscopía de campo claro.

- métodos con las bacterias marcadas con marcadores fluorescentes: en la actualidad, el empleo de proteínas fluorescentes es una herramienta clave para el estudio de estos procesos (Figura 1.9). Una de ellas es la proteína verde fluorescente o GFP (de las siglas en inglés de *Green Fluorescence Protein*), con la que las células bacterianas pueden ser identificadas por microscopía de fluorescencia (Gamalero *et al.*, 2003). Las bacterias marcadas con GFP pueden ser enumeradas *in situ* y las muestras no necesitan ser manipuladas para fijarlas, lavarlas, hibridizarlas o teñirlas (Tombolini y Jansson, 1998). En este tipo de estudios es necesaria la utilización de técnicas microscópicas que permitan la excitación de la proteína expresada y la detección de la emisión que ésta genera. Esta ampliamente distribuida la utilización de la microscopía de epi-fluorescencia (MEF) para realizar este tipo de observaciones (Bernabeu *et al.*, 2015; Compant *et al.*, 2005b; Compant *et al.*, 2008b; De Souza *et al.*, 2016; Gamalero *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2008; Rouws *et al.*, 2010). Esta técnica permite la selección de la longitud de onda de excitación y de emisión de la proteína GFP, permitiendo la determinación de la presencia y ubicación de la bacteria en estudio en las raíces. Por otro lado, la microscopía de escaneo láser confocal (MELC) también es muy utilizada en estos casos. Su principal ventaja es que permite obtener imágenes de mayor calidad mediante técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz que proviene de planos fuera de foco. El microscopio confocal permite capturar planos ópticos de la muestra de forma que luego se pueda hacer una reconstrucción tridimensional de la misma. Se pueden obtener secciones ópticas de 0,5 a 1,5 μm de muestras de un espesor de aproximadamente 50 μm o más. Las imágenes obtenidas son de alto contraste y definición de un punto en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco, por lo que puede decirse que hay una importante mejora en la relación entre la señal y el ruido de la imagen. Debido a las ventajas que presenta, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la interacción entre microorganismos y plantas (Compant *et al.*, 2008b; Dietel *et al.*, 2013) y específicamente la colonización de tejidos internos por microorganismos endófitos, sin necesidad de realizar cortes histológicos. Como la señal de la proteína GFP no difunde, el sitio de expresión puede ser inequívocamente localizado usando este tipo de microscopías. No obstante, cuando se pretende localizar un microorganismo marcado

colonizando tejidos internos del vegetal es necesario desinfectar las muestras superficialmente para no arrastrar microorganismos de la superficie. También se puede realizar la cuantificación de la marca de la bacteria inoculada mediante la utilización de los programas adecuados. Tal como se observa en la Figura 1.9, las bacterias se ubican en la unión de las células epidérmicas en donde la rugosidad de la superficie de la raíz podría ser un factor que desempeña un papel en la agregación de las bacterias y también debido a los exudados que produce (Benizri *et al.*, 2001).

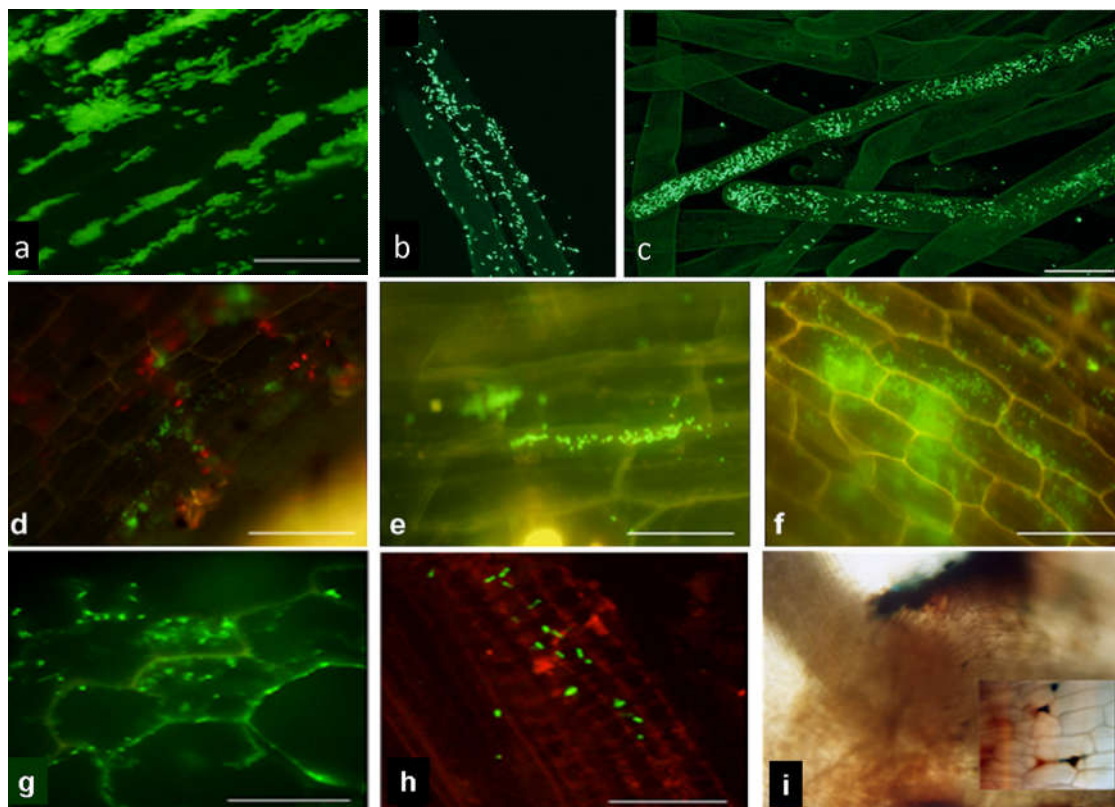


Figura 1.9 Colonización en condiciones gnotobióticas del rizoplaneo (A, D, E, F, G, H) y de los pelos radicales (B y C) por PGPB marcadas con el gen reportero *gfp*, y colonización de los espacios intercelulares de PGPB marcada con el gen reportero *gus* (I). Adaptado de Compant *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2010 y Prieto *et al.*, 2011.

- métodos de hibridación *in situ* con marcadores fluorescentes o FISH, requiere el uso de sondas de oligonucleótidos marcadas, construidas en base a la secuencia del 16S ARNr (Figura 1.9 G).
- métodos de biología molecular: la detección de ácidos nucleicos extraídos de la rizósfera o del propio tejido vegetal ofrece la posibilidad de un monitoreo específico del genotipo bacteriano. Se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) para confirmar la presencia de una secuencia específica de ADN. También se puede realizar la cuantificación de la bacteria inoculada por la técnica de PCR en tiempo real o qPCR (Barea, 2015; Ruppel *et al.*, 2006). Para llevar a cabo estas técnicas, es necesaria la utilización de métodos de extracción de ADN que permitan obtener ADN apto para ser amplificado. Normalmente, son

necesarias 10^3 copias del ADN que se desea analizar para que sea posible la amplificación (Gamalero *et al.*, 2003). El análisis de un microorganismo o de una población mediante estas técnicas presenta dificultades en la preparación de las muestras, ya que existen sustancias en los suelos o en las plantas que pueden interferir con la reacción de la ADN polimerasa y además, para detectar las bacterias endófitas es necesario obtener una gran cantidad de muestra de tejido vegetal debido a la menor población en comparación con la del rizoplano o rizosfera.

Como se mencionó anteriormente, la generación de mutantes es una herramienta muy importante para el estudio de las interacciones planta-bacteria y también para determinar las capacidades de promoción del crecimiento vegetal que los microorganismos pueden estar expresando *in vivo*. Han sido reportados diversos estudios en los que, a partir de la generación de una mutación en algún gen de interés (Böhm *et al.*, 2006; Buschart *et al.*, 2012) se ha logrado estudiar la forma en que ese gen afecta algún proceso en particular. Para la generación de dichos mutantes, existen diversas estrategias, que dependen de la información sobre el microorganismo en estudio (ver Capítulo 6).

Para llevar a cabo el estudio de las rutas metabólicas que se activan durante la colonización de las plantas utilizando un enfoque genómico, se utiliza una tecnología denominada IVET (por las siglas en inglés de *In Vivo Expression Technology*) que permite identificar la expresión génica involucrada con los distintos pasos de la colonización, tanto en la planta como en la PGPB (Angelichio y Camilli, 2002; Podile y Kishore, 2007). Mediante la utilización de este tipo de tecnología, Wang y colaboradores (2005) pudieron determinar que en la colonización de *Arabidopsis thaliana* por *Pseudomonas fluorescens*, se expresan genes relacionados con la respuesta al *stress*, la producción de auxinas y la modulación de etileno en la planta. Por otro lado, Preston y colaboradores (2001) estudiaron a esta misma PGPB, pudiendo determinar ciertos genes que se activan en respuesta al proceso de colonización. Este tipo de estudios, distintos a los de la capacidad de colonización por las PGPB, brindan información importante que permite dilucidar los fundamentos genéticos de tan compleja interacción.

1.13 Mecanismos de acción de las PGPB

Una vez que las PGPB colonizan un determinado nicho ecológico, pueden ejercer sus efectos promotores del crecimiento a través de diversos mecanismos que han sido estudiados y descritos para una gran cantidad de géneros y especies (Babalola, 2010). Entre los géneros más estudiados se encuentran: *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, entre otros (Baldani *et al.*, 1986; Compant *et al.*, 2005b; James *et al.*, 2001; Okon, 1985; Vessey, 2003).

Los mecanismos de acción de estos microorganismos pueden ser directos o indirectos (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999; Glick, 2012). Los mecanismos directos son aquellos que implican la síntesis de compuestos que son liberados a la rizosfera y tomados por la planta para su metabolismo o que

facilitan la captura por parte de la planta de ciertos nutrientes. Estos incluyen provisión de fósforo biodisponible para la planta, fijación de nitrógeno atmosférico, captación de hierro por medio de sideróforos, producción de factores de crecimiento (vitaminas) y de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas), así como otros compuestos reguladores del crecimiento vegetal (poliaminas, jasmonatos, etc.), reducción de los niveles de etileno en la planta, entre otros. En cambio, los mecanismos indirectos son aquellos mediante los cuales las PGPB disminuyen o previenen los efectos de microorganismos patógenos e incluyen la protección antibiótica contra bacterias patógenas, síntesis de enzimas líticas la pared celular fúngica, competencia con organismos patógenos por los sitios de colonización de la planta y por los nutrientes e inducción de resistencia sistémica en la planta (Bhattacharyya y Jha, 2012; de Souza *et al.*, 2016; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Ryu *et al.*, 2004).

Entre los efectos beneficiosos se encuentran:

- Aumento en la velocidad de germinación
- Aumento del crecimiento de las raíces
- Aumento en el rendimiento incluyendo tamaño de grano, área foliar, número de frutos
- Aumento de los contenidos de clorofila, magnesio, nitrógeno y proteínas
- Tolerancia a la sequía y baja temperatura
- Senescencia retardada de la hoja
- Resistencia a enfermedades

Algunos ejemplos de PGPB diazótrofes y los posibles mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vivo* se muestran en la Tabla 1.4. (Ahmad *et al.*, 2008).

Mecanismo	Organismos	Efecto en la planta
Promoción del crecimiento		
Auxinas	<i>Azotobacter; Azospirillum; Acetobacter; Herbaspirillum; Bacillus; Paenibacillus; Burkholderia; Bradyrhizobium; Rhizobium</i>	Aumento de la longitud de la raíz, del número de raíces laterales y del peso de las raíces y de los brotes
Giberelinas	<i>Azotobacter; Azospirillum; Acetobacter; Herbaspirillum; Bacillus; Rhizobium</i>	Aumento del crecimiento de los brotes
Citocininas	<i>Azotobacter; Azospirillum; Paenibacillus; Rhizobium</i>	Afecta la morfología
Solubilización de fosfatos	<i>Bacillus; Paenibacillus; Azotobacter; Rhizobium</i>	Mejora el crecimiento y rendimiento
Mayor captación de nutrientes	<i>Azospirillum sp.</i>	La actividad pectinolítica puede aumentar la captación de minerales por la hidrólisis de las laminillas intermedias de las raíces, también causar una mayor absorción de AIA por las raíces. La enzima nitrato reductasa bacteriana aumentó el nitrógeno reducido en las raíces y el peso total y seco
Biocontrol		
Sideróforos	<i>Azospirillum; Acetobacter; Paenibacillus; Rhizobium</i>	Reduce la disponibilidad de hierro, no estando así disponible para los fitopatógenos. Pueden actuar como fuente de hierro para plantas superiores en suelos alcalinos y calcáreos
Enzimas líticas	<i>Paenibacillus</i>	Quitinasa y actividad antifúngica, celulasas y mananasas
Antibióticos	<i>Azotobacter; Azospirillum, Paenibacillus; Bacillus</i>	Compuestos fungicidas, bacteriocinas

Tabla 1.4 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de bacterias diazótrofes. Adaptado de Ahmad *et al.*, 2008.

Los mecanismos relacionados con la solubilización de P y la FBN se explican más detalladamente en el Anexo 1 de este capítulo debido a la relevancia que tienen en este trabajo.

En la Tabla 1.5 se muestran algunos ejemplos de PGPB testeadas en varios cultivos y los resultados de su inoculación (Ahmad *et al.*, 2008).

PGPB	Planta	Condición	Resultados de la inoculación
<i>Azospirillum</i> sp.	Maíz, trigo	Campo	En los cultivares de trigo durante siete campañas, aumenta el rendimiento del 15 al 30% y un 50 a 60% cuando se fertiliza. Durante seis campañas, el rendimiento de maíz aumentó 15 a 25% y hasta 40% con fertilización
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 2E3, O6	Trigo	Laboratorio	Aumento de la emergencia de plántulas en un 8-6%. Fuerte inhibición de <i>Fusarium culmorum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Mungbean, trigo	Invernadero	Elongación de la raíz y del tallo
<i>Pseudomonas putida</i> , resistente a Pb y Cd	Mungbean	Invernadero	Elongación de la raíz y del tallo en presencia de CdCl ₂ y (CH ₃ COO) ₂
<i>Azospirillum brasilense</i>	Mijo, sorgo	Campo	Aumento promedio del 15% del rendimiento en mijo y del 19% en sorgo
<i>Bacillus amyliquefaciens</i> IN937; <i>Bacillus subtilis</i> GB03; <i>Bacillus cereus</i> C4	Tomate, pimiento	Campo	Aumentos en el crecimiento de las plantas en diámetro del tallo, área del tallo, área superficial foliar, peso de las raíces y brotes y número de hojas. Mejora en el vigor del trasplante y el rendimiento de la fruta
<i>Pseudomonas putida</i> R104; <i>Pseudomonas cepacia</i> R85; <i>Pseudomonas fluorescens</i> R104 y R105	Trigo de invierno	Macetas en cámara de crecimiento	Incremento del 46-75% en el rendimiento en grano
<i>Pseudomonas putida</i> R111	<i>Amaranthus paniculatus</i>	Campo	Promoción del crecimiento e incremento en la cantidad de nitrógeno

Tabla 1.5 Ejemplos de PGPB estudiadas en distintos cultivos y sus efectos. Adaptado de Ahmad *et al.*, 2008.

La Tabla 1.5 muestra solo una fracción de la cantidad de ensayos en invernadero y a campo que han sido realizados en todo el mundo con PGPB. Existe un consenso general en apoyar a la utilización de estos microorganismos como inoculantes en pos de una agricultura sustentable, y se promueven las investigaciones básicas y aplicadas en torno a estas temáticas. Estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal han sido incluidos junto con otros productos biotecnológicos del sector agroindustrial como temas estratégicos del plan Argentina Innovadora 2020, debido a su potencialidad para incrementar la producción de los cultivos permitiendo un manejo sustentable del medio ambiente.

Los mecanismos de acción de las PGPB han sido investigados y dilucidados utilizando una cepa individual y una planta huésped. Pero las PGPB pueden presentar más de un efecto beneficioso (hipótesis aditiva) y además no están actuando individualmente, sino más bien como parte de comunidades bacterianas, de la rizósfera, del rizoplano, del interior de los tejidos, en las que las señales de comunicación celular pueden coordinar las actividades de todos los individuos,

interactuando con una misma planta huésped. Cuando se analizan los efectos promotores del crecimiento de las plantas, por lo tanto, es importante considerar la complejidad de estas interacciones sumadas al efecto de varios otros factores bióticos o abióticos que pueden influir en la respuesta global de la planta de una manera impredecible (Figura 1.10). El bajo pH del suelo, la alta temperatura media y/o la baja, las precipitaciones y otras condiciones indeseables conducen a una baja colonización de las raíces por las PGPB que se traduce en una falta de respuesta a la inoculación. Diversos estudios han mostrado que los efectos de promoción del crecimiento se observan tempranamente en el desarrollo de las plantas y que posteriormente se traducen en mayores rendimientos.

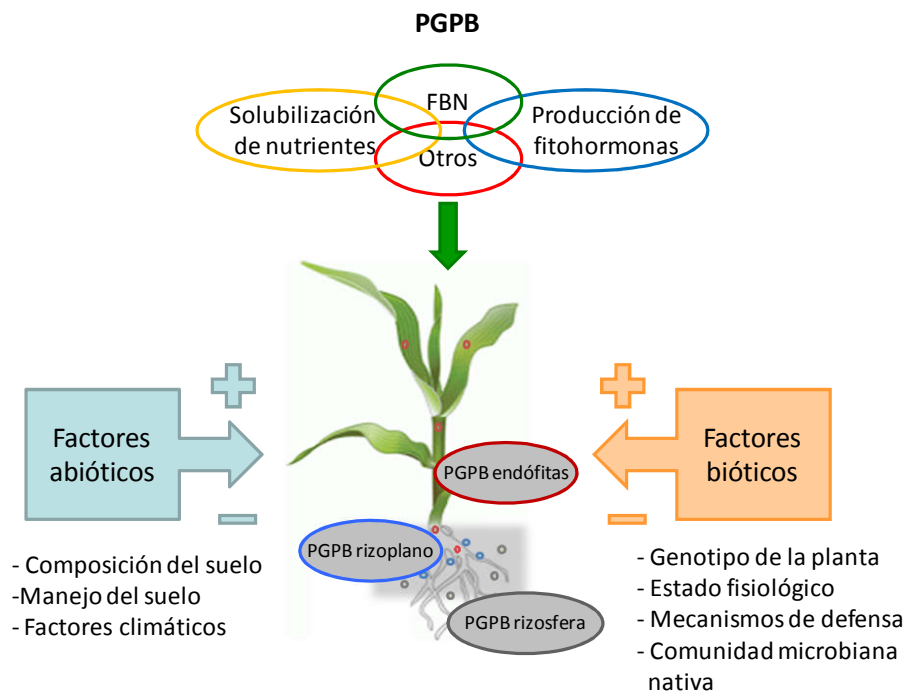


Figura 1.10 Esquema general con los posibles mecanismos beneficiosos que pueden ejercer las PGPB *in vivo* y los factores positivos o negativos que condicionan su efecto.

1.14 Introduciendo bacterias a un complejo sistema de interacciones: inoculantes microbianos

Diversos géneros bacterianos han sido aislados de diferentes ambientes, estudiados e inoculados en los cultivos con el objetivo de promover el crecimiento vegetal, siendo introducidos en un ecosistema donde tienen lugar complejas interacciones.

La inoculación de las plantas para el mejoramiento de los cultivos es un concepto que tiene más de un siglo de antigüedad. Es una tecnología ya aprobada para los rizobios y un camino aún por construir para el resto de las PGPB y otros simbioses vegetales. Inicialmente, el concepto de inoculante era desconocido pero los agricultores sabían que mezclando suelos con historia de leguminosas en otros sin historia previa de este cultivo, mejoraba el rendimiento (Bashan, 1998). A fines del siglo XIX la inoculación de semillas con suelo “naturalmente inoculado” era una práctica

recomendable y en 1896 Nitragin presentó la primer patente de inoculantes a base de *Rhizobium* sp.. A fines de los '70 y comienzo de los '80 surge la actividad industrial de producción de inoculantes en Argentina, que se afianza en la década de los '90 siendo los pioneros en investigación y desarrollo el IMyZA del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) Castelar y el CINDEFI (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales). En la actualidad existen en la Argentina muchas empresas productoras de inoculantes para leguminosas, varias de ellas también producen inoculantes para no leguminosas a base de PGPB así como productos a base de hongos como, por ejemplo, *Trichoderma* sp.. Si bien la definición de inoculantes es cada día más amplia, podemos decir que los estos son productos tecnológicos cuyo principio activo es un microorganismo vivo (bacterias y/o hongos), de una o más cepas, estirpes o razas, no patógenos de humanos, animales o plantas, ni patógenos oportunistas del hombre, que favorecen directa o indirectamente a la nutrición y/o el desarrollo de las plantas, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente (Álvarez y Sanjuán, 2007). Los microorganismos en el inoculante se encuentran adsorbidos o suspendidos en diferentes soportes, que pueden ser de naturaleza sólida (por ejemplo a base de turba) o líquida y cuyo destino final pueden ser las semillas; las hojas (aplicación foliar) o el suelo (aplicación en surco). Así, los inoculantes se pueden clasificar de acuerdo al soporte sobre el que están formulados o de acuerdo a las características más representativas del microorganismo utilizado para su formulación. Los beneficios de los inoculantes microbianos en agricultura se extienden no sólo a su capacidad como fijadores de nitrógeno, y pueden clasificarse basándose en sus actividades funcionales como: i- biofertilizantes (aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas); ii- fitoestimuladores (que estimulan el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas); iii- rizoremediadores (degradan contaminantes orgánicos); iv- biopesticidas (controlando enfermedades mediante la producción de antibióticos y metabolitos fungicidas, entre otros) (Ahemad y Kibret, 2014; Antoun y Prévost, 2005).

A lo largo de este trabajo, por el enfoque particular de la temática del mismo, se considerarán y describirán en general características de inoculantes a base de PGPB.

El desarrollo, producción y aplicación de un inoculante bacteriano de alta calidad es un proceso complejo en el que se ven involucrados diversos especialistas que se ocupan de optimizar cada una de las etapas del mismo. El conocimiento de aspectos fisiológicos básicos de los microorganismos que puedan ser importantes tanto para su cultivo en biorreactores (producción de inoculantes) como en su interacción con las plantas (aplicación), constituye una etapa importante de este proceso.

Como se mencionó anteriormente, un problema que se encuentra a menudo en la mayoría de los experimentos a campo con PGPB es la inconsistencia de la respuesta de las plantas a la inoculación, siendo entonces poco probable garantizar el éxito de la inoculación. Esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Por lo tanto,

hay ciertas pautas que se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un inoculante para que los efectos benéficos que estos microorganismos nos aportan puedan ser logrados.

Un inoculante requiere la producción de biomasa a escala industrial y una formulación adecuada que permita su depósito, distribución, aplicación sencilla y persistencia, con la menor pérdida de actividad biológica posible (Montesinos, 2003). A continuación se muestra un esquema general de las etapas que se suceden en el desarrollo de un inoculante a base de PGPB (Figura 1.11).

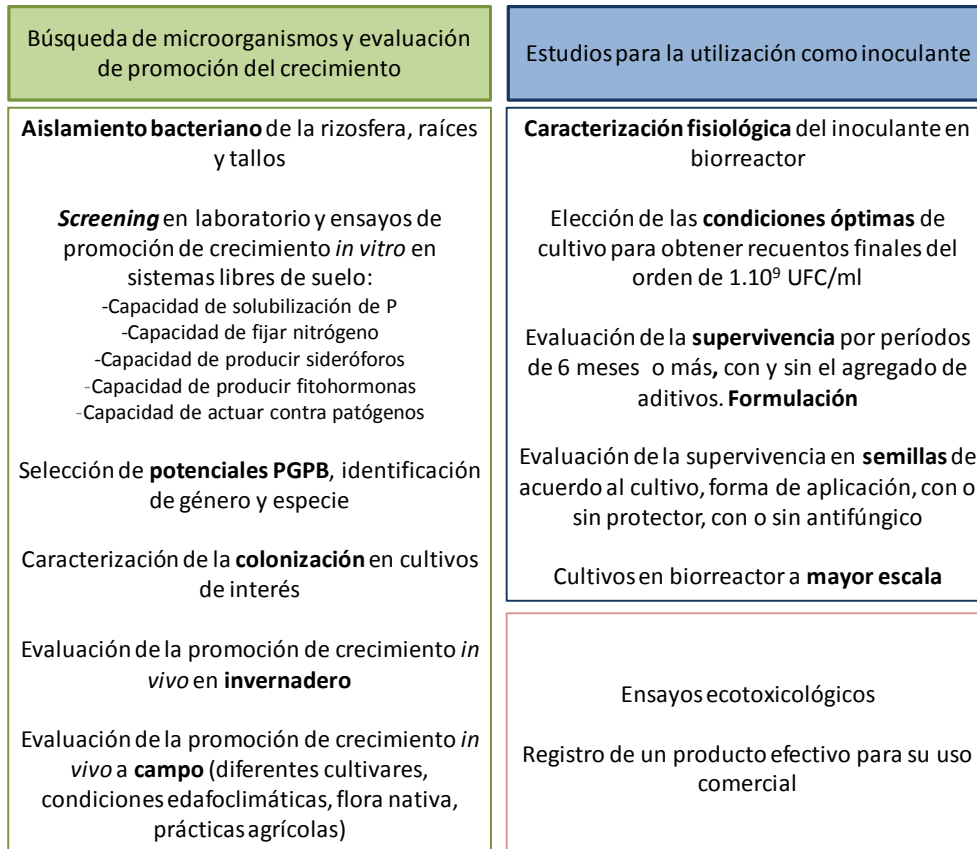


Figura 1.11 Esquema de desarrollo de un inoculante a base de PGPB. Adaptado de Tenuta (2006).

1.15 Características de un inoculante a base de PGPB

Independientemente de las diversas propiedades promotoras del crecimiento vegetal de muchas de las PGPB aisladas y estudiadas, su uso comercial como inoculantes es reducido, debido a diversas causas tales como la falta de formulaciones que aseguren una elevada viabilidad por períodos considerables de tiempo (Haas y Défago, 2005), así como el gran número de factores bióticos y abióticos que regulan la *performance* de las PGPB, y que hacen que excelentes resultados de laboratorio y experimentos en invernadero no resulten reproducibles a campo (Nelson, 2004).

En el desarrollo de todo inoculante se deben tener en cuenta que para que el mismo sea eficaz, debe reunir algunas condiciones mínimas de calidad para que los beneficios de la inoculación puedan

tener lugar. Como se mencionará luego, para el caso de las PGPB no hay aún un criterio de calidad aceptado. No obstante, de manera general se pueden aplicar algunas de las pautas establecidas para los inoculantes a base de rizobios, siendo las siguientes ciertas características esenciales:

1- ofrecer un medio de cultivo que permita el crecimiento de las PGPB en el que se alcance una concentración de bacterias viables suficiente, generalmente del orden de 10^9 - 10^{10} UFC/ml, para poder asegurar un número adecuado de las mismas al momento de la aplicación, lo cual está relacionado con los requerimientos nutricionales de cada microorganismo (incluidos los requerimientos de oxígeno), con la cantidad y calidad de los mismos, con el pH, con la temperatura, con el sistema de cultivo, entre otros.

2- mantener un número de células viables en un buen estado fisiológico por un tiempo aceptable, 6 meses o más, para asegurar que al momento de la aplicación haya un número umbral de bacterias viables en el formulado requeridas para encontrar respuesta a la inoculación. En el formulado usualmente se adicionan sustancias o aditivos con las que se persigue mantener el número de viables en el tiempo, aumentando la estabilidad, dispersando los microorganismos, dándoles un soporte, etc. (Bashan *et al.*, 2014), siendo formulado de forma tal que permita también que las bacterias sobrevivan sobre las semillas desde el momento de la inoculación hasta la siembra. La formulación determina gran parte de su eficacia y es donde se puede encontrar mayor variación entre los inoculantes y se genera la diferenciación de marcas comerciales.

3- proveer un valor aproximado de $1 \cdot 10^6$ bacterias por semilla. Si bien existen diferentes formas de aplicación para los rizobios, y algunas con mayor eficiencia que la aplicación sobre semillas, esta última es la que se utiliza mayormente para la aplicación de PGPB. En la aplicación de un inoculante se debe asegurar una cantidad por dosis de producto que sea suficiente para distribuirse uniformemente sobre las semillas. Por ejemplo, si se usa un inoculante cuya dosis recomendada sea de 50 cm³/50 kg de semillas, probablemente se pueda tener una concentración de bacterias que permita inocular más de $1 \cdot 10^6$ bacterias/semilla pero, con ese volumen, no se podrá distribuir el producto uniformemente. Entonces será necesario diluir convenientemente el inoculante, comúnmente con agua, para poder humectar todas las semillas. Es imprescindible ajustar el proceso de manera tal que todas las semillas reciban la misma cantidad de inoculante. Si bien una sola célula bacteriana podría ser capaz de colonizar la superficie de una raíz, es necesario inocular con cientos de miles de bacterias cada semilla ya que, como ha sido mencionado anteriormente, las mismas son muy sensibles a diferentes factores tanto bióticos como abióticos. Una vez agregados sobre las semillas, y hasta que éstas llegan al suelo y germinan (y aparecen las radículas), las bacterias se ven sometidas a diversas condiciones que pueden llevar a su muerte. Una de las principales causas de mortalidad de estas bacterias es la desecación. Estos organismos, cuando se someten a condiciones donde el agua que los rodea se evapora, pierden agua intracelular, aumenta la presión osmótica del

ambiente, la membrana celular colapsa y la célula muere. Esta es la razón principal que da lugar a la recomendación de “realizar la inoculación en ambientes frescos y a la sombra” que aparece en todos los marbetes de inoculantes. Otras causas importantes de muerte sobre las semillas son las temperaturas elevadas y las sustancias tóxicas presentes en los exudados de las semillas. Debido a esto, y también para aumentar el pegado sobre la semilla, es que junto con el inoculante es común agregar sustancias adhesivas o protectores a las semillas.

1.16 Características del soporte

El soporte o base del inoculante es el vehículo para transportar a los microorganismos vivos proveyendo los elementos imprescindibles para la vida de las bacterias (alimento, oxígeno y humedad) desde la industria que los produce hasta la planta en el campo, ya que en el envase las células encuentran una situación de estrés nutricional. El soporte es la mayor porción en volumen y peso, debe proteger a las PGPB en el envase y sobre la semilla. Debe ser fácil de aplicar y debe adherirse bien a la semilla. Debe proveer un medio adecuado para la supervivencia de las PGPB durante un tiempo de almacenaje prolongado (en general, para propósitos comerciales, un período de conservación seguro de seis meses es lo deseable) y favorecer la unión de las PGPB a las semillas o la dispersión del inoculante en el suelo (inoculación en surco), protegiendo a las PGPB especialmente cuando son expuestas a situaciones adversas como las altas temperaturas. Como características deseables se encuentran:

- provisión de compuestos orgánicos simples y oxígeno
- alta capacidad de retención de agua
- uniformidad física y química
- biodegradabilidad e inocuidad ambiental
- carencia de reactividad química y de toxicidad y carencia de reactividad biológica
- pH ajustable a la neutralidad
- capacidad para admitir suplementos de nutrientes y aditivos
- facilidad de manejo durante la fabricación del inoculante
- facilidad de manejo durante la inoculación
- adecuado y permanente suministro en el mercado y de bajo costo

Se encuentran diversos tipos de inoculantes según el soporte utilizado, pero los más comunes son los inoculantes sólidos, que presentan alta higroscopicidad, mucha superficie, y son complicados para manipular y esterilizar (por ejemplo: turba; perlas de alginato de calcio) y los inoculantes acuosos, con el agregado muy difundido en la actualidad de aditivos como goma xantano, gelatina, glicerol, polivinil pirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (APV), polietilenglicol (PEG) y otros para su formulación (Tittabutr *et al.*, 2007), con la finalidad de preservar la supervivencia de las bacterias por largos

periodos de tiempo. Después de entrar en la fase estacionaria, previo al envasado, la depleción de nutrientes puede causar una elevada reducción del número de viables en el inoculante líquido. La velocidad de disminución de células viables difiere entre los microorganismos y entre las diferentes formulaciones. La razón por la cual estos polímeros mantienen la concentración de viables más alta no se sabe con exactitud. Características de la formulación y el adecuado manejo del inoculante en el almacenamiento y aplicación son de vital importancia para los inoculantes. A diferencia de lo que ocurre con los fertilizantes o plaguicidas de síntesis (no biológicos), no se puede considerar a un inoculante formulado sobre la base de un microorganismo como un producto genérico o un *commodity*, sino que es el conjunto indisoluble del microorganismo y el soporte que lo contiene. De esta manera, en una formulación el soporte y los posibles aditivos utilizados son el punto en el que podemos encontrar mayor variación entre inoculantes y, en muchos casos, el aspecto que permite la diferenciación de marcas comerciales, constituyéndose sin duda alguna como un factor de calidad. La tecnología de la formulación es probablemente una de las áreas de desarrollo de agroinsumos que requiere mayor esfuerzo de investigación para aumentar la eficacia (Stockwell y Stack, 2007). Este punto constituye uno de los principales desafíos en el desarrollo de nuevos productos basados en PGPB. Una formulación apropiada debe estar libre de todo contaminante y ser inocua para el microorganismo y para quien lo va a manipular. En cuanto a sus características físicas, debería ser fácil de aplicar y dosificar, entre otras. El avance de la tecnología impulsa a la creación de nuevas formulaciones de inoculantes con diferentes microorganismos y soportes. La tecnología de la formulación es probablemente una de las áreas de desarrollo de agroinsumos que requiere mayor esfuerzo de investigación para aumentar la eficacia. Este punto constituye uno de los principales desafíos en el desarrollo de nuevos productos. La efectividad con que las PGPB se adhieren a las semillas depende del soporte utilizado y de las condiciones en que se realiza la inoculación.

1.17 Características del protector

Durante la inoculación pueden agregarse a su vez otros aditivos protectores que incrementen la capacidad de adhesión de las PGPB a las semillas y las protegen principalmente de la desecación. Están formulados con sustancias altamente higroscópicas y que presentan una elevada captación de moléculas de agua, y se incorporan en general en la parte externa de la membrana celular y mantienen (en ese ambiente) una adecuada actividad de agua que preserva la integridad de esta membrana (y por tanto la viabilidad de las bacterias). Esto ocurre a nivel celular, por lo que las semillas se muestran secas al tacto. Dentro de las formulaciones de inoculantes biológicos, se están estudiando el uso de biomateriales, para brindar mayor protección, estabilidad y conservación genética a las cepas (Cortés-Patiño y Bonilla, 2015). Los biomateriales más empleados son los polímeros, como PVP, APV, gelatina, goma arábiga, carragenina, alginato y PEG (Rivera *et al.* 2014;

Rojas-Tapias *et al.* 2013; Rojas-Tapias *et al.* 2015), que provienen del metabolismo de diversos microorganismos, paredes celulares de las algas marinas y resina de árboles. Existen varios requisitos para que estos polímeros sean componentes de inoculantes, tales como no ser tóxicos, proteger a los microorganismos inoculados de competidores de suelo y de factores ambientales y ser lentamente degradables en el suelo y contener suficiente agua para la supervivencia y movimiento de los microorganismos (Bashan *et al.* 2014; Covarrubias *et al.* 2012). La aplicación de protectores junto con el inoculante también mitiga la acción bactericida inespecífica de los fungicidas-curasemillas sobre las PGPB (Dayamani y Brahmprakash, 2014; Romero-Perdomo *et al.* 2015). Además, los protectores proveen, una vez sembradas las semillas inoculadas, nutrientes de fácil y rápida asimilación para iniciar la colonización de los suelos y radículas, y adhieren el inoculante a las semillas eficientemente logrando un excelente aprovechamiento del producto. Varios polímeros, así como soluciones de sacarosa o jarabes de otros azúcares, tienen propiedades adhesivas que ofrecen una consistencia pegajosa que puede mejorar la adherencia de las bacterias a la semilla y su viscosidad puede disminuir el proceso de desecación una vez aplicado sobre ésta. Algunos de ellos también funcionan como protectores frente a los productos tóxicos secretados por las semillas. Adicionalmente, como la concentración salina aumenta en el entorno celular a medida que se evapora el agua en el inoculante líquido aplicado, los polímeros estabilizantes como el APV podrían ser útiles para reducir la precipitación proteica o coagulación celular. El mantenimiento de la estructura macromolecular puede mantener la integridad biológica conduciendo a mejorar la supervivencia. Polímeros como la goma arábica, el alginato o la goma xantano tienen la habilidad de limitar la transferencia de calor y también tienen una alta actividad acuosa. Estas pueden ser las posibles causas por las que mejoran la sobrevivencia de los microorganismos inoculados sobre las semillas y le dan la posibilidad de colonizar eficientemente las raíces (Bashan, 1998).

1.18 Características del envase

El envase no es un aspecto menor en la calidad de un inoculante. Un producto puede ser muy bueno pero su envase no ser adecuado para permitir la vida de las bacterias. La condición imprescindible es que el envase permita el paso del O₂, pero que impida la entrada de contaminantes y la pérdida de humedad. Además, es recomendable que posean filtros para los rayos UV. Debido a todo esto, los envases no pueden ser de materiales plásticos comunes sino de algunos especiales que posean la porosidad adecuada para cumplir con estos requisitos (Peticari *et al.*, 1994).

1.19 Compatibilidad con el curasemillas

Es una práctica común que las semillas sean curadas previamente a la siembra con productos fungicidas para controlar el ataque de hongos patógenos en los delicados estadios iniciales de las plántulas. Todos los terapicos para semillas tienen algún grado de toxicidad sobre las PGPB (Ahemad y Khan, 2012). Si el proceso incluye el curado con fungicidas los tiempos entre la inoculación y la siembra se acortan y para los rizobios se recomienda no superar las cuatro horas. La aplicación de fungicida disminuye la viabilidad de las PGPB por lo que debe ajustarse debidamente su aplicación teniendo en cuenta la calidad, concentración, momento de aplicación y tiempo de contacto entre el inoculante y los terapicos. Para los rizobios se ha reportado que a las 2 horas de contacto entre ambos hay en general una disminución de la viabilidad bacteriana del 70% (Ferraris *et al.*, 2006). Por lo tanto, es necesario realizar pruebas de compatibilidad con los fungicidas de uso habitual para asegurar que no producen una disminución importante en la actividad microbiana. Uno de los más difundidos es Tiram más Carbendazim (de contacto y sistémico).

1.20 Inoculación con PGPB

Durante los últimos años en Argentina se ha incursionado en la aplicación de inoculantes a base de PGPB incorporados como tratamientos de semillas de gramíneas, principalmente en trigo y maíz (Ferraris y Faggioli, 2011; Ferraris, 2012) y si bien ha crecido vertiginosamente, existen controversias al momento de explicar la variabilidad de la respuesta a la inoculación observada en los ensayos a campo. Tal como se detalló previamente, esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización (Lugtenberg y Kamilova, 2009) ya sea porque el número de microorganismos viables y fisiológicamente aptos en el inoculante al momento de la aplicación no es el deseado, porque la forma de aplicación o la dosis no es la adecuada, porque el inoculante no es compatible con los fungicidas utilizados, o porque los microorganismos se mueren rápidamente después de la aplicación debido a factores bióticos o abióticos del ambiente. Una vez inoculadas estas PGPB deben colonizar eficientemente la zona radical vegetal, sobrevivir, multiplicarse y competir con el resto de la microbiota (Kloepper, 1994). La ventaja de una buena inoculación es proveer a cada semilla de una cantidad adecuada de bacterias en excelente estado fisiológico para lograr una efectiva colonización.

Se debe prestar atención a las pequeñas variantes que pueden afectar el efecto de la inoculación, tales como: momento de inoculación y dosis, entre otros. El proceso de inoculación preferiblemente debe realizarse a la sombra y a temperaturas moderadas, en lo posible inferiores a 30°C. Como una importante cantidad de bacterias muere al momento de inoculación es conveniente efectuar la siembra lo más rápido posible. El sistema que se utiliza para la inoculación de semillas de gramíneas no difiere del utilizado para la inoculación de semillas de leguminosas. Este sistema contempla la

aplicación del inoculante mediante diferentes equipamientos tratando de lograr una homogénea cobertura de todas las semillas, para lo cual la cantidad de agua utilizada es de suma importancia.

Las PGPB se pueden inocular directamente sobre la superficie de la semilla, en el suelo o sobre la hoja. Cada método tiene ventajas y desventajas, dependiendo de los requisitos para la inoculación específica, el tipo de semillas y cantidad de inoculante. Para cultivos de cereales es común la aplicación de las PGPB sobre las semillas. El ambiente que rodea a la semilla debe ser lo más amigable posible ya que ésta es la portadora de un organismo vivo.

En resumen, son diversas las causas de muerte de las PGPB una vez aplicadas a la semillas. Por lo tanto, es necesario agregar un gran número de bacterias en la inoculación para asegurarnos que lleguen viables y fisiológicamente activas una cantidad suficiente como para establecer una eficiente colonización. Por todas las razones expuestas anteriormente se recomienda realizar la inoculación inmediatamente antes de la siembra.

1.21 Calidad de los inoculantes

La garantía de calidad de un inoculante es un aspecto muy importante del mismo, cuya falta en muchos de los casos ha conducido a la no adopción de esta tecnología. Si bien en el mercado de los inoculantes no hay definido un estándar internacional de calidad (Bashan *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016) en la práctica, el control de calidad de los inoculantes se encuentra bajo las regulaciones gubernamentales de cada país tal como ocurre en India, Tailandia, China, Rusia, Canadá, Francia y Argentina, o bien, se procede a dejar la calidad del producto a discreción del productor de inoculantes y que el mercado decida la supervivencia del mismo, como ocurre en USA, Méjico e Inglaterra (Bashan *et al.*, 2014). En los 1980s-1990s esta ambigüedad condujo a la inadecuada *performance* de los inoculantes comerciales a base de PGPB y un subsecuente abandono de su uso a escala global (Catroux *et al.*, 2001; Stephens y Rask 2000). Los inoculantes tuvieron una fuerte aparición en el 2000, concentrada principalmente en América Latina (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009; Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005; Hartmann y Bashan, 2009) y en el sudeste de Asia, principalmente en la India (Reddy y Saravanan, 2013; Roy *et al.*, 2015; Selvamukilan *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente la obtención, comercialización y aplicación eficiente de un inoculante de alta calidad es un proceso largo y complejo en el que se ven involucrados muchos y muy diversos especialistas: microbiólogos, fisiólogos vegetales, ingenieros agrónomos, ingenieros industriales, técnicos extensionistas, economistas, agencias fiscalizadoras, legisladores, etc., incluidos los propios agricultores como usuarios finales del producto. La necesaria participación de todos ellos en una o varias etapas del proceso y las complejas interrelaciones que pueden llegar a establecerse son determinantes para el éxito o fracaso de un producto de esta naturaleza. Con el objetivo de

facilitar dichas interrelaciones y contribuir al mismo tiempo a la difusión de esta tecnología, se han creado diversas redes como la Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura (BIOFAG) en el año 2003, con actividades financiadas por todos los países iberoamericanos a través del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). A esta red están actualmente adscritos unos 60 grupos de investigación y empresas productoras de inoculantes, pertenecientes a 13 países (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Chile, Cuba, Ecuador, España, México, Perú, Portugal, Uruguay y Venezuela). La cantidad de instituciones y países involucrados da idea de la importancia de esta temática para la región. El concepto de calidad refiere a la totalidad de parámetros que debe reunir cualquier producto, incluidos los de origen biológico, para cumplir con el fin para el cual fue desarrollado. Bajo este concepto, en el año 2005 y en el marco de la Asociación Argentina de Microbiología, se constituyó la Red de Control de Calidad de Inoculantes o REDCAI, dentro de la División de Microbiología Agrícola y Ambiental. La REDCAI integrada por investigadores de trayectoria en el área de los biofertilizantes y biopesticidas, pertenecientes a laboratorios públicos y privados de empresas, universidades, INTA y su misión más importante ha sido “la creación de un espacio nacional de participación de profesionales que se desempeñan en el área de evaluación de bioinsumos”. Entre sus objetivos principales se consideró la “organización de una red de laboratorios de referencia, del ámbito público y privado para la estandarización y aplicación de metodologías de evaluación de productos biológicos de origen microbiano”. Por ello, en el año en 2006, se creó INTERLAB, un sistema de control de calidad interlaboratorios que en la actualidad cuenta con más de 30 laboratorios de servicio e investigación en el área de insumos biológicos para agricultura. Inicialmente, las actividades de la REDCAI y del sistema INTERLAB se centraron en la aplicación de herramientas de evaluación previamente estandarizadas, para la validación de métodos microbiológicos destinados al recuento de microorganismos en inoculantes formulados en principio con bacterias del Orden *Rhizobiales* y luego con los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas*. Este trabajo se plasmó en el desarrollo y publicación de un “Manual de protocolos microbiológicos para la evaluación de inoculantes”, editado por la AAM en 2014. En el año 2013 la REDCAI se re-estructuró a partir de su conformación inicial y en la actualidad cuenta con una estructura de 7 grupos de trabajo, tomando como parte del criterio de diferenciación, el microorganismo usado como principio activo para el desarrollo de los bioinsumos: *Rhizobiales*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, Bacterias ácido-lácticas (BAL), Bacterias de compostaje (BC) y Hongos no micorrízicos (HNM). Adicionalmente se conformaron grupos transversales a los primeros denominados: Inocuidad-Bioseguridad, Bioensayos, Normativa, Biología Molecular y Validación Agronómica (Cassán, 2016).

Por otro lado, en el ámbito de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA), por Resolución Nº 7/2013 se creó el Comité Asesor en Bioinsumos de Uso Agropecuario

(CABUA), el cual desarrolla funciones de gestión y concertación para promover el sector, y han incluido a los inoculantes dentro de los bioinsumos de uso agropecuario. Según el artículo 3 de dicha resolución es considerado bioinsumo “todo aquel producto biológico que consista o haya sido producido por microorganismos, artrópodos o extractos de plantas y que esté destinado a ser aplicado como insumo en la producción agroalimentaria, Agroindustrial y agroenergética conforme a una clasificación anexa”.

En el año 2011, el Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) aprueba la Resolución 264, la cual establece los requisitos técnicos que deben cumplir los productos que se inscriben en el Registro Nacional de Fertilizantes y Enmiendas para su aprobación (sujeto a los alcances de la Ley 20.466 que controla la elaboración, importación, exportación, tenencia, fraccionamiento y venta de fertilizantes y enmiendas en todo el territorio de la República Argentina). De acuerdo a la citada Resolución, se define a un Fertilizante Biológico como “aquel que contiene un microorganismo o varios, como principal componente, sobre un soporte. Se clasifica a los fertilizantes biológicos como bacterias fijadoras de nitrógeno (FBN), promotores de crecimiento (PGPR) y co-inoculados”. Cada uno de estos grupos deberá cumplir con requisitos comunes y otros propios para su inscripción. Dentro de los requisitos comunes, se solicita certificado de provisión de cepa, certificado de inocuidad del microorganismo y ensayos de eficacia a campo en determinados productos. Las cepas no tradicionales, deberán ser identificadas por la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa u otro método equivalente. Las bacterias fijadoras de nitrógeno al igual que los productos a base de *Azospirillum*, cuentan con requisitos específicos. En el primer caso, la concentración mínima para los productos formulados a base de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* es de 1.10^8 UFC/ml o g al vencimiento y el porcentaje mínimo de nodulación debe ser del 80%. Para productos formulados en base a *Azospirillum* la concentración mínima al vencimiento deberá ser de 1.10^7 UFC/ml o g.

La cantidad de instituciones involucradas en el impulso del uso de estos bioinsumos y la necesidad de su control de calidad da idea de la importancia de esta temática para la región.

1.22 Respuesta a campo a la inoculación con PGPB

En la actualidad, persiste una considerable brecha entre los rendimientos obtenidos a campo y los alcanzables cuando se optimiza el sistema productivo, debido a diversos factores relacionados con la nutrición, manejo y protección del cultivo que contribuyen a generarla. Los tratamientos de las semillas con PGPB permiten cerrar una fracción de esta brecha productiva, siendo una de las herramientas con mayor potencialidad para incrementar su importancia en un futuro cercano (Ferraris, 2016). Los tratamientos de semillas con inoculantes que poseen PGPB presentan un creciente interés en investigación y producción. Para acompañar este proceso, es relevante ajustar la metodología de evaluación y desarrollo, muchas veces diseñada para evaluar otras prácticas de gran

impacto y más sencilla comprobación experimental. Se deben desarrollar indicadores de diagnóstico y criterios de uso incluyendo ambiente, expectativa de respuesta, dosis y restricciones debidamente validados a campo, con la certeza de que ninguna práctica agronómica expresa respuestas positivas en la totalidad de los casos. El productor y asesor agronómico percibe a la tecnología como amigable, sustentable, inocua, pero con frecuencia duda sobre la magnitud y estabilidad de respuesta. Cuantificar y principalmente difundir información al respecto debe ser el objetivo de aquellos que desean validar esta tecnología. La adopción de la inoculación con insumos biológicos probablemente será proporcional al profesionalismo de quienes trabajan en esto, y al nivel de conocimiento que se genere y aplique. Uno de los desafíos es la selección de microorganismos con aportes validados a la producción de cultivos, con posibilidades de multiplicación en escala industrial y con una aplicación extensiva a diversos cultivos. Son crecientes el interés y la dedicación a la búsqueda de estas relaciones benéficas cuyo éxito parte del reconocimiento del valor del estudio integrado cultivos-microorganismos. En el desarrollo de los inoculantes, para su aplicación por ejemplo como tratamientos de semillas, hay que considerar las condiciones de utilización (momento y condiciones de aplicación). Los procesos de desarrollo consideran no solo el microorganismo (cepas, concentraciones, etc.) sino también su formulación (soporte, aditivos).

Un gran número de ensayos alrededor del mundo muestran un incremento significativo de los rendimientos por el uso adecuado de inoculantes de calidad. Existen muchos resultados de investigación desarrollados en laboratorio e invernadero que sustentan el uso de PGPB, no obstante, existe una gran variabilidad de la respuesta en ensayos a campo. Algunos autores atribuyen estos resultados a las diferentes fuentes de variabilidad inherentes a las diversas características del ambiente, edáficas y del cultivo así como también a las características propias del inoculante como son la formulación, cepa, número y estado fisiológico de las células bacterianas. Caballero Mellado (2006) afirma que las respuestas obtenidas están condicionadas al cumplimiento de requisitos que debe cumplir un inoculante bacteriano y que es necesario cuidar y regular con criterios estrictos las cepas, condiciones de propagación, producción de inoculantes y la calidad del producto terminado.

Existen numerosos géneros bacterianos que muestran potencialidad como inoculantes para ser aplicados en semillas de cereales, no obstante los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas* son los inoculantes bacterianos más aceptados (Bashan *et al.*, 1998). *Azospirillum* es el PGPB más estudiado en gramíneas, reportándose las primeras experiencias hace más de treinta años (Döbereiner *et al.* 1979). En la Argentina existen diversas empresas que muestran un creciente interés en los productos a base de PGPB e incluso comercializan este tipo de inoculante para gramíneas, respaldadas por estudios de investigación y evaluaciones a campo.

La inoculación de leguminosas con rizobios específicos conduce en muchos de los casos a prescindir de la fertilización nitrogenada debido a la tan lograda simbiosis mutualista entre ambos organismos,

éste no es el caso de los inoculantes a base de PGPB aplicados como biofertilizantes. Existe una gran cantidad de estudios de inoculación de cereales con PGPB bajo diferentes condiciones, sin fertilización de base tanto de N como de P y disminuyendo las dosis de los mismos a la mitad o a la tercera parte, encontrándose diferentes respuestas según el microorganismo, el cultivo y las condiciones edafoclimáticas, pero que confluyen en que se puede lograr una disminución del uso de fertilizantes pero no un reemplazo. En relación a la utilización de la inoculación con productos formulados con *Azospirillum brasilense*, ciertos autores (Okon y Labandera, 1994; Rodríguez Cáceres y Di Ciocco, 2003) indican que existe respuesta a la inoculación cuando el ambiente presenta limitaciones; mientras que otros investigadores (Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2008; González Montaner *et al.*, 2008) muestran que los aumentos en los rendimientos fueron más consistentes en ambientes con mejores condiciones de fertilidad. Creus (2016) sostiene que a pesar de ciertas inconsistencias observadas, los datos indican que en un 60-70% de los casos la inoculación con *Azospirillum* es exitosa produciendo un aumento del rendimiento que varía entre 5 y 35%, y que puede ser aún mayor en caso de suelos no fertilizados o bajo estrés abiótico. También ha reportado que el meta-análisis de los trabajos publicados en el período 1981-2009 acerca de la interacción *Azospirillum*-trigo, indica que la respuesta del rendimiento mostró un incremento medio de 9% y la materia seca aérea del 18%, pero que estos valores fueron afectados positivamente en prácticas sin fertilización nitrogenada. En el caso de la inoculación de trigo con *Pseudomonas*, los resultados más consistentes se encontraron cuando la inoculación fue acompañada con fertilización nitrogenada y fosforada, alcanzando incrementos en el rendimiento de hasta 8,4% en promedio. Por lo tanto, puede decirse que en los casos reportados hasta el momento en nuestro país se observó que la inoculación de trigo con PGPB incrementó el rendimiento de los cultivos y que la respuesta de la inoculación a la fertilización fue variable (Ferraris, 2012). Para el caso del sorgo, no hay tantos estudios de aplicación de PGPB. Zago y colaboradores (2006) analizaron la inoculación de sorgo con *A. brasilense* y co-inoculando con *B. japonicum*, y encontraron que en ambos casos hubo respuesta a la inoculación. Zamora y Carrasco (2014) analizaron la inoculación de sorgo con *Pseudomonas* sp. y encontraron un aumento del rendimiento con respecto al testigo no inoculado no fertilizado.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, las PGPB no sólo pueden contribuir a la mejora del cultivo como biofertilizantes sino también debido a otras características, y el aumento del rendimiento se puede apreciar en muchos casos aun aplicando fertilización de base. Los aumentos en el rendimiento en general se encuentran en el orden de 10-30% y en muchos casos con diferencias que no son significativas con respecto a los controles no inoculados. No obstante, la inoculación de semillas con PGPB muestra una consistente tendencia al aumento de los rendimientos representando una importante contribución para el productor. Un aumento de los rendimientos del orden del 10% promedio, logrado con un insumo de bajo costo como lo es un inoculante a base de

PGPB y fácil aplicación, redundando en definitiva en un incremento de la rentabilidad para el productor. Ferraris (2016) sostiene que los aumentos de rendimiento obtenidos tienen un impacto moderado en la producción, destacando más su estabilidad, 75 a 85% casos positivos (con $P < 0,10$), que su magnitud.

En resumen, la inoculación es una tecnología de bajo costo que está alineada con los principios de la agricultura sustentable, que preserva efectivamente la productividad de los suelos y es una de las herramientas más destacadas con las que cuenta el productor para potenciar los cultivos. Para que su empleo tenga mayor credibilidad en el sector productivo no deberían acelerarse los tiempos de desarrollo y de evaluación de los inoculantes elaborados con bacterias solas o combinadas (Ferraris, 2016). No obstante, la ausencia de una PGPB universal que se pueda utilizar como inoculante para cada cultivo de importancia agrícola, simplemente refleja la complejidad de las interacciones y de los intercambios de señales moleculares que tienen lugar en los ecosistemas suelo-planta-organismo (Antoun y Prévost, 2005).

Para alcanzar una agricultura sustentable es necesario un mayor conocimiento de las interacciones planta-microorganismos así como la implementación de prácticas de manejo de cultivos que las potencien, creando un nicho agroecológico tanto en el suelo como dentro de las plantas que dé lugar a esta gran complejidad de acciones y comunicaciones que llevarían a una mejor calidad de vida. Una de las posibilidades de ir hacia ese objetivo es el uso de inoculantes a base de PGPB, cuya mejora podría darse definiendo qué microorganismo utilizar, sobre qué cultivo aplicarlo y en qué ecorregiones se muestran sus efectos sobre el crecimiento de las plantas, y produciendo formulados comerciales más estables que aseguren una mejor viabilidad y compatibilidad con los agroquímicos de uso corriente, con el ideal de poder desplazarlos.

1.23 El género *Burkholderia*

Uno de los géneros que ha sido siempre relacionado con infecciones humanas pero al que pertenecen una gran cantidad de especies beneficiosas para las plantas es el género *Burkholderia*. En 1992 (Yabuuchi *et al.*, 1992), mediante análisis de secuencias de ARNr 16S, composición de ácidos grasos, lípidos celulares y características fenotípicas se ubicó a *Pseudomonas cepacia* y otras seis especies pertenecientes al grupo II de *Pseudomonas*, en un nuevo género denominado *Burkholderia*, en honor a Walter Burkholder quien la reportó por primera vez en 1942. Desde su descripción más de 100 especies diferentes de bacterias Gram negativas han sido reconocidas como miembros de este género (www.bacterio.cict.fr/). Se trata de β -proteobacterias que habitan un amplio rango de ambientes y hospedadores, hecho relacionado a su gran versatilidad metabólica y adaptabilidad fisiológica (Coenye y Vandamme, 2003; Estrada-de los Santos *et al.*, 2013). Poseen un genoma de gran tamaño y múltiples replicones (Mahenthalingam *et al.*, 2005; Martínez-Aguilar *et al.*, 2008). En

las especies de este género asociadas a plantas, se encontraron genomas multicromosómicos de gran tamaño (de aproximadamente 7 Mb) (Martínez-Aguilar *et al.*, 2008) que podrían explicar su capacidad de colonizar la rizofera, el rizoplasma y los tejidos internos de una gran variedad de hospedadores (Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Perin *et al.*, 2006).

Las bacterias pertenecientes a este género pueden ser patógenas de humanos, patógenas de plantas, o beneficiosas para las plantas. En su primera clasificación se las agrupó como bacterias pertenecientes al *Complejo Burkholderia cepacia* (conocido como BCC, por *Burkholderia cepacia complex*) y no pertenecientes a este grupo (Coenye *et al.*, 2001). El grupo de bacterias del BCC incluyó a las especies patógenas en humanos como *B. cepacia*, relacionadas con enfermedades pulmonares como la fibrosis quística (Govan y Deretic, 1996; Henry *et al.*, 1997; Reik *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 1997), aisladas tanto de muestras ambientales como de pacientes enfermos. El otro grupo de bacterias pertenecientes a este género no patógenas en humanos se denominó No-BCC e incluyó a las especies aisladas de muestras ambientales (muestras de suelo, agua o plantas) que tenían la capacidad de interactuar con plantas, formando asociaciones patógenas o benéficas (Suarez-Moreno *et al.*, 2008). Varias de estas bacterias que forman asociaciones benéficas tiene la capacidad de fijar nitrógeno y colonizar los tejidos externos e internos de las plantas (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Perin *et al.*, 2006) y algunas incluso tienen la capacidad de formar nódulos en leguminosas (Chen *et al.*, 2006). Debido a la cercana relación con las especies del mismo género patógenas, la utilización de especies de este género como promotoras del crecimiento vegetal ha sido controversial. Incluso hay especies patógenas de humanos que resultan ser beneficiosas para las plantas, tal es el caso de las especies *B. cepacia* y *B. vietnamiensis*, ambas patógenas oportunistas de humanos y con probadas características beneficiosas para las plantas (Eberl y Vandamme, 2016; Govindarajan *et al.*, 2006; Mahenthiralingam *et al.*, 2001; Miché y Balandreau, 2001). Es por este motivo que ha surgido la necesidad de dividir este género, aunque en algunos casos la asignación de algunas de las especies dentro de estos grupos no ha sido tan sencilla (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016). Suarez-Moreno y colaboradores (2012), en base en el análisis filogenético tanto del gen del ARNr 16S, de los genes *acdS*, *recA*, *gyrB*, *rpoB*, como en el análisis de secuencia multilocus, propusieron una nueva separación de las especies del género *Burkholderia*, muestran claramente la separación en dos grupos mayores: 1- el grupo BCC, representado por bacterias pertenecientes al grupo BCC anterior, las especies de *Burkholderia* del grupo *pseudomallei* y las especies patógenas para plantas, y 2- el grupo PBE (del inglés *Plant-associated beneficial and environmental*, o grupo ambiental y benéfico asociado a plantas), filogenéticamente distante del BCC, que incluyó a todas las especies benéficas, tanto las que pueden interactuar con plantas como las que pueden vivir en suelos y agua. De esta forma, todas las especies patógenas (tanto para humanos como para plantas) quedaron juntas en un mismo grupo. Posteriormente, Estrada-de los Santos y colaboradores (2013)

propusieron una nueva nomenclatura en la que se definen dos grupos como el grupo A, equivalente al grupo PBE de Suarez-Moreno y colaboradores (2012), que incluye a las especies no patogénicas asociadas a plantas y al ambiente, y el grupo B integrado por especies patógenas de humanos, plantas y animales, así como, patógenos-oportunistas (Figuras 1.12 y 1.13). Haciendo uso no solo de herramientas moleculares sino también analizando el genoma de diferentes especies de *Burkholderia* en búsqueda de determinantes de virulencia y empleando *test* funcionales de patogenicidad, se pretendió separar al género en dos géneros distintos. Angus y colaboradores (2014) estudiaron el potencial patogénico de varias especies beneficiosas mediante estudios bioinformáticos (con ARNr 16S y otros), que evidencian que ambos grupos pertenecen a diferentes linajes, y mediante la infección de *C. elegans* (un nematodo utilizado como modelo de estudio) y de células HeLa (línea de células humanas ampliamente utilizadas para estos análisis en laboratorio). Estos estudios demostraron que el riesgo de una infección oportunista por las cepas beneficiosas pertenecientes al Grupo A de este género es prácticamente nulo, a diferencia de lo que ocurre con los miembros del Bcc. A partir de análisis recientes (Sawana *et al.*, 2014) se propuso que las especies benéficas del género formaran parte de un nuevo género denominado *Paraburkholderia*. Varias especies descritas posteriormente a esta propuesta que cumplen con las características de este grupo fueron denominadas con esta nomenclatura (Kaur *et al.*, 2016). Finalmente, en honor al Dr. Jesús Caballero-Mellado, se ha propuesto la denominación *Caballeronia* para ciertas especies de este género que se encuentran cercanas filogenéticamente (Dobritsa *et al.*, 2016). No obstante, en la comunidad de investigadores no hay aún un consenso general en esta división de géneros. Aunque el análisis de secuencias de genes del ARNr 16S es un enfoque muy útil cuando el objetivo es describir las bacterias, el poder de resolución de esta técnica puede ser limitado tal como ocurre en este caso cuando se pretende realizar una división del género, encontrando también varias especies que pertenecen a grupos de transición (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016). Nuevas alternativas han sido desarrolladas para la descripción de nuevos microorganismos, tales como la comparación de la secuencia del genoma completo (Tindall *et al.*, 2010). Estrada-de los Santos y colaboradores (2016) proponen que se lleve a cabo un esfuerzo concertado para profundizar el estudio del género *Burkholderia* y determinar en forma definitiva la división taxonómica de este género, y aprender más sobre la potencial patogenicidad de las cepas de *Burkholderia* asociadas a las plantas, esfuerzos que requerirán tanto estudios de laboratorio como a campo y contribuirían seguramente a no limitar su uso.

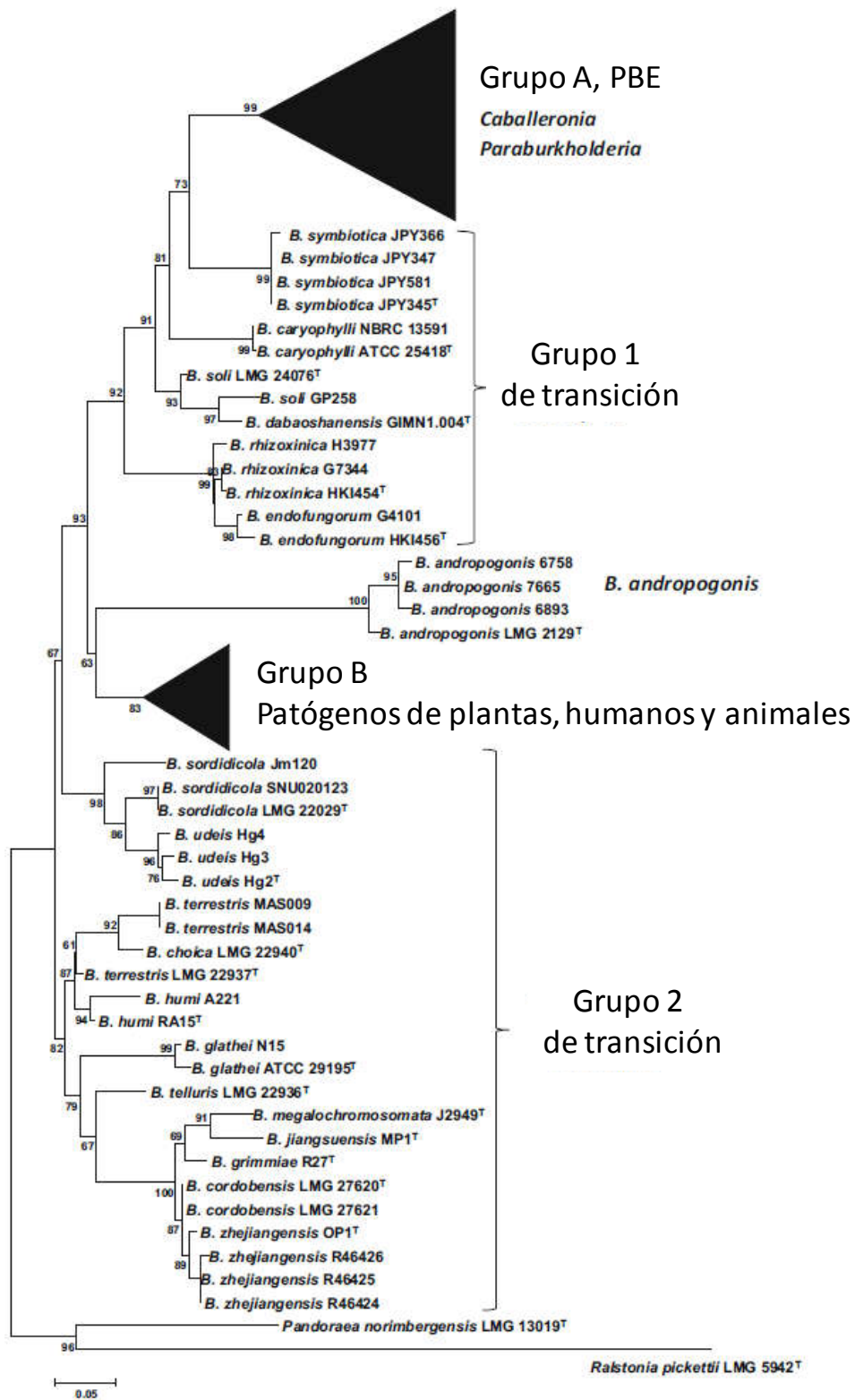


Figura 1.12 Relaciones filogenéticas entre especies del género *Burkholderia* basadas en las secuencias del gen ARNr 16S. (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016).

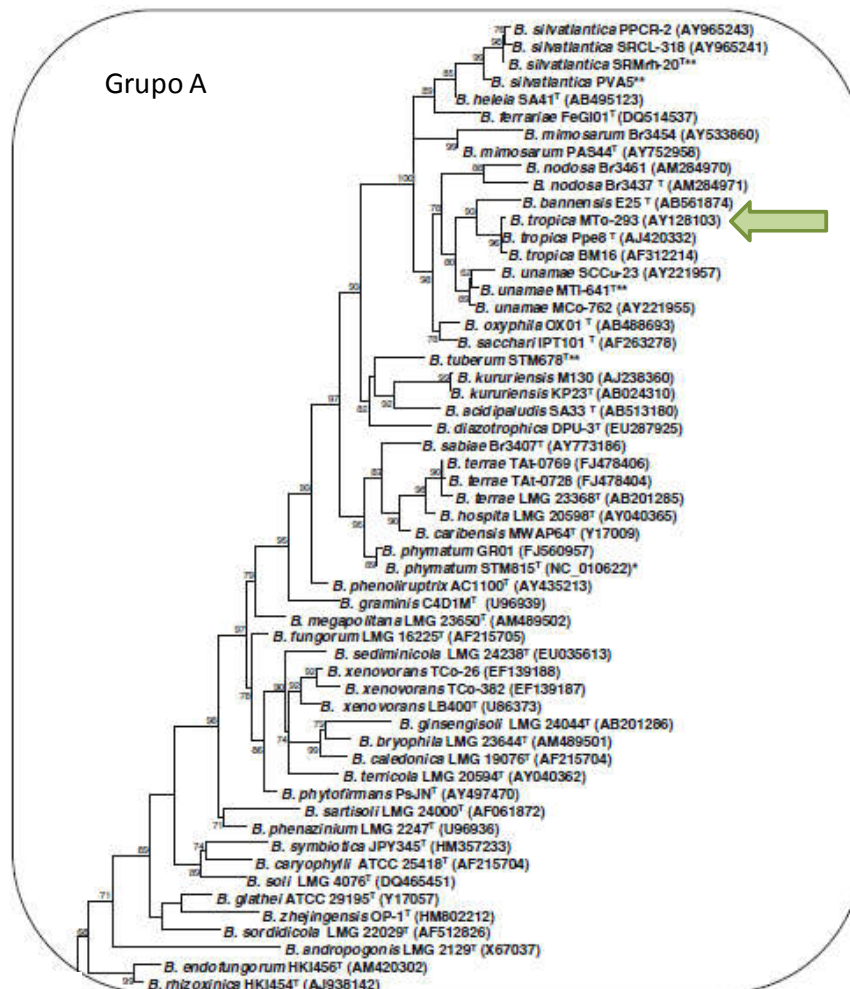


Figura 1.13 Relaciones filogenéticas entre especies del género *Burkholderia* del grupo A basadas en las secuencias del gen ARNr 16S (Estrada-de los Santos *et al.*, 2013).

El grupo A del género *Burkholderia*, cuyo número de integrantes continúa creciendo (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016), ha sido descrito como un grupo rico en especies fijadoras de nitrógeno que están asociadas a plantas, tanto como bacterias rizosféricas y/o endófitas (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Estrada-de los Santos *et al.*, 2001; Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2014; Perin *et al.*, 2006), incluyendo a *B. tropica* (Reis *et al.*, 2004). Muchos de ellos han sido y están siendo evaluados para su uso potencial como biofertilizantes y para el control biológico, mientras que otros son considerados con un alto potencial para la rizoremediación (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016). Estas propiedades han suscitado gran interés en la caracterización de un número considerable de especies de *Burkholderia*. En la Tabla 1.6 se detallan algunas de estas especies benéficas, así como el lugar del que fueron aisladas inicialmente.

Microorganismo	Aislado	Cita
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	Cebolla	Sessitsch <i>et al.</i> , 2005
<i>Burkholderia unamae</i>	Maíz	Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Caña de azúcar y maíz	Perin <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia xenovorans</i>	Suelos	Goris <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia kururiensis</i>	Suelos	Zhang <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia caribensis</i>	Suelos	Achouak <i>et al.</i> , 1999
<i>Burkholderia acidipaludis</i>	Plantas acuáticas	Aizawa <i>et al.</i> , 2010
<i>Burkholderia mimosarum</i>	Mimosa	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia diazotrophica</i>	Mimosa	Sheu <i>et al.</i> , 2013
<i>Burkholderia bannensis</i>	Gramíneas	Aizawa <i>et al.</i> , 2011
<i>Burkholderia tropica</i>	Maíz, caña de azúcar y teosinte	Reis <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia tuberum</i>	Leguminosas	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Burkholderia phymatum</i>	Leguminosas	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Burkholderia graminis</i>	Rizosfera de gramíneas	Viallard <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1.6 Algunas especies benéficas del género *Burkholderia* aisladas de distintas especies vegetales y suelos.

Muchas de las especies detalladas en la Tabla 1.6 han sido aisladas de la superficie desinfectada de plantas entre las que se encuentran *B. tropica*, *B. kururiensis*, *B. unamae*, *B. silvatlantica*, *B. phytofirmans*, y *B. acidipaludis*, siendo la mayoría consideradas endófitas putativas ya que no han sido estudiadas posteriormente en relación a su capacidad de colonización de los tejidos de las plantas (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016). El aislamiento de algunas de estas especies se realizó en por enriquecimiento en medios libres de nitrógeno (Castro-González *et al.*, 2011). *B. diazotrophica*, *B. mimosarum*, *B. phymatum* y *B. tuberum* (Chen *et al.*, 2006; Sheu *et al.*, 2013; Vandamme *et al.*, 2002) tienen la capacidad de formar nódulos en las raíces de plantas leguminosas. Estas especies son capaces de exhibir actividades relacionadas a la biorremediación, promoción del crecimiento vegetal y control biológico (Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Tenorio-Salgado *et al.*, 2013). Compant y colaboradores (2008a) reportaron algunas de las propiedades que presentan generalmente las especies benéficas de este género (Tabla 1.7).

Propiedades benéficas de especies de <i>Burkholderia</i> no patógenas		
Biocontrol	Resistencia de la planta al stress abiótico	Promoción del crecimiento vegetal
- Secreción de sideróforos - Secreción de antibióticos - Elicitores de defensa de la planta	- ISR y otros mecanismos	- FBN - Captación de hierro - Solubilización de fosfatos - Actividad ACC deaminasa - Producción de fitohormonas

Tabla 1.7 Propiedades benéficas de especies del género *Burkholderia*. Adaptado de Compant *et al.*, 2008a.

En general, las especies de este género tienen la capacidad de producir EPS y han sido identificados los genes responsables de su producción (Ferreira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011). Diferentes especies del Grupo A han sido caracterizadas en su capacidad de sintetizar exopolisacáridos o EPS, y entre ellas se encuentran *B. brasiliensis*, *B. caribensis*, y *B. tropica* (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016). Como se detallo previamente, el EPS puede participar en la colonización de los tejidos vegetales, en la formación de *biofilm*, en la protección en diversos ambientes y en el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno los EPS pueden actuar disminuyendo la difusión de oxígeno al interior de la bacteria evitando con ello la inactivación de la nitrogenasa (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016).

No se han reportado especies de este grupo que puedan causar efectos perjudiciales en plantas o animales (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016), sólo ha sido reportado un caso de un paciente neonatal muy inmunocomprometido en el que se aisló, entre bacterias que se determinaron como patógenas, una bacteria identificada como *B. tropica* por secuenciación del ARNr 16S, y no se pudo recuperar de ninguna de las muestras analizadas intrahospitalarias presumiendo que fue transmitida de madre a hijo y, por lo tanto, no considerado como colonizador oportunista (Deris *et al.*, 2010).

Varias de estas especies del género *Burkholderia* han sido hasta el momento estudiadas para su aplicación en la agricultura (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016). Experimentos de colonización de diferentes especies de plantas con estas especies bacterianas, han mostrado resultados prometedores, tales como la mejora pronunciada del sistema de raíces, una mayor área foliar, mejora de la eficiencia del uso del agua, así como la inducción de la resistencia a fitopatógenos, confiriéndoles un gran potencial para su uso como biofertilizantes y biocontroladores. *B. cepacia* y *B. vietnamiensis* fueron las primeras especies de este género evaluadas por su capacidad de promover el crecimiento vegetal (Bevivino *et al.*, 1994; Bevivino *et al.*, 2000; Chiarini *et al.*, 1998) produciendo un incremento en el rendimiento en cultivos de arroz, maíz, frutilla, entre otros (Govindarajan *et al.*, 2006; Govindarajan *et al.*, 2008; Lovaisa *et al.*, 2015). No obstante, el uso de éstas y de otras especies pertenecientes al Grupo B del género *Burkholderia* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016) es controversial. El uso

biotecnológico de las especies del BCC fue restringido en 2003 por la Ley de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). No obstante, la transmisibilidad y los impactos clínicos de las diferentes especies del BCC difieren ampliamente de una especie a otra y se ha sugerido que la prohibición debería levantarse en algunas cepas pertenecientes a distintas especies del BCC (Estrada-de los Santos *et al.*, 2016). Por otro lado, una de las especies del Grupo A más estudiadas en relación a la colonización de diferentes plantas y la promoción del crecimiento vegetal es *B. phytofirmans* (Compant *et al.*, 2005b; Compant *et al.*, 2008b), aislada inicialmente del interior de tejidos de cebolla. Zúñiga y colaboradores (2003) estudiaron la promoción del crecimiento de esta especie en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento en el peso fresco, en la longitud de las raíces y en el número de pelos radicales al ser comparadas con las no inoculadas. Barka y colaboradores (2006) analizaron la interacción entre esta especie y plantas de vid, encontrando que la inoculación llevó a un aumento de 6 veces en la biomasa aérea de las plantas, y de 12 veces en la biomasa radical. Este incremento en la biomasa de las raíces también fue observado por Sun y colaboradores (2009) en plantas de canola. Kim y colaboradores (2012) reportaron un incremento del 46,3% de peso fresco y 54,1% de peso seco en plantas de pasto varilla (*Panicum virgatum*) tanto en cámara de cultivo como en invernadero. Divan Baldani y colaboradores (2000) reportaron que en plantas de arroz inoculadas con *B. brasiliensis* se observó un incremento del 20% en la cantidad de nitrógeno presente en los tejidos con respecto a las plantas no inoculadas, y relacionaron esto con la FBN llevada a cabo por el microorganismo. Por otro lado, Jiang y colaboradores (2008) analizaron la interacción entre *Burkholderia* sp. J62 y plantas de maíz, mostaza y tomate en invernadero y observaron que los resultados fueron variables en las tres especies vegetales: mientras que en maíz y tomate hubo promoción del crecimiento, en mostaza no se registraron diferencias con respecto a los controles no inoculados, indicando que la respuesta a la inoculación fue dependiente de la especie vegetal. Estudios en invernadero en condiciones de producción de plantas de tomate inoculadas con *B. tropica* demostraron un incremento en el rendimiento en frutos (Bernabeu *et al.*, 2015). Además, algunas cepas de *B. unamae* y *B. tropica* resultaron beneficiosas para el crecimiento de plantas de maíz, aumentando hasta un 30% del peso seco (Castro-González *et al.*, 2011). Por lo expuesto en el párrafo anterior, y a pesar de ser realmente interesante el estudio de las especies benéficas de este género, no son muchos los datos recopilados hasta el momento de ensayos a campo con estas bacterias. Los ensayos a campo son los que finalmente ponen en evidencia la capacidad promotora del crecimiento en circunstancias en las que el microorganismo en estudio tiene que enfrentarse a condiciones bióticas y abióticas naturales.

Wong-Villarreal y Caballero-Mellado (2010) han diseñado y encontrado cebadores específicos del gen ARNr 16S para diversas especies del género *Burkholderia* del grupo A siendo posible

identificarlas por amplificación de dicho gen mediante la técnica PCR, tanto en muestras provenientes de aislamientos naturales como de plantas inoculadas en condiciones gnotobióticas.

1.24 *Burkholderia tropica*

En el año 2004, Reis y colaboradores describieron una especie de *Burkholderia* aislada de la rizosfera y tejidos internos de caña de azúcar, maíz y teosinte en diferentes regiones de Brasil, México y Sudáfrica, y propusieron el nombre de *Burkholderia tropica*. En la Figura 1.14 se muestran las diferentes cepas de *B. tropica* que se caracterizaron según el análisis de restricción de la amplificación del gen ARNr 16S (ARDRA) (Reis *et al.*, 2004).

Cepa	Fuente	pH suelo	País	Localidad	Clima	Referencia
ARDRA profile 16						
MCh-1054	Maize roots*	6-76	Mexico	Chilpancingo, Guerrero	1	
MCh-1057	Maize rhizoplane	6-76	Mexico	Chilpancingo, Guerrero	1	
MCo-7712	Maize roots*	6-69	Mexico	Coatepec, Veracruz	2	
MOc-255	Maize rhizosphere	6-40	Mexico	Ocototec, Morelos	3	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001)
MOc-332	Maize rhizosphere	6-22	Mexico	Ocototec, Morelos	3	
MOc-725	Maize rhizoplane	6-35	Mexico	Ocototec, Morelos	3	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001)
MOc-3412	Maize roots*	6-55	Mexico	Ocototec, Morelos	3	
MTe-73523	Maize roots*	5-04	Mexico	Tepoztlan, Morelos	1	
MTe-7363	Maize rhizoplane	5-04	Mexico	Tepoztlan, Morelos	1	
MTI-5681	Maize roots*	4-56	Mexico	Tlayacapan, Morelos	1	
MTI-582	Maize rhizosphere	4-84	Mexico	Tlayacapan, Morelos	1	
TTe-225	Teosinte rhizosphere	7-10	Mexico	Tepoztlan, Morelos	1	
ARDRA profile 17						
MCa-9022	Maize rhizosphere	5-15	Mexico	Cacaohatan, Chiapas	4	
MCo-7931	Maize rhizosphere	6-89	Mexico	Coatepec, Veracruz	2	
MCu-831	Maize rhizoplane	7-07	Mexico	Cuernavaca, Morelos	1	
MMi-786	Maize rhizoplane	ND	Mexico	Miacatlán, Morelos	3	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001)
MSj-805	Maize rhizosphere	6-20	Mexico	San J. Atenco, Puebla	5	
MTI-6311	Maize rhizoplane	4-87	Mexico	Tlayacapan, Morelos	1	
MTo-432	Maize rhizoplane	ND	Mexico	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001)
MTo-672	Maize stem*	ND	Mexico	Totontepec, Oaxaca	2	
MXo-435	Maize rhizoplane	7-15	Mexico	Xoxocotla, Morelos	3	
MXo-437	Maize rhizosphere	7-15	Mexico	Xoxocotla, Morelos	3	
TSj-832	Teosinte rhizosphere	6-29	Mexico	San J. Atenco, Puebla	5	
TTe-1910	Teosinte stem*	7-03	Mexico	Tepoztlan, Morelos	1	
ARDRA profile 19						
Ppe8 ^T	Sugarcane stem	ND	Brazil	Pernambuco State	4	
BM-16	Maize stem*	ND	Mexico	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada <i>et al.</i> (2002)
BM-273	Maize roots*	ND	Mexico	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada <i>et al.</i> (2002)
MCo-761	Maize roots*	6-79	Mexico	Coatepec, Veracruz	2	
MCo-8562	Maize rhizoplane	6-62	Mexico	Coatepec, Veracruz	2	
MCu-82	Maize rhizosphere	7-07	Mexico	Cuernavaca, Morelos	1	
MCu-833	Maize roots*	7-07	Mexico	Cuernavaca, Morelos	1	
MCu-842	Maize rhizoplane	7-07	Mexico	Cuernavaca, Morelos	1	
MSj-8432	Maize rhizosphere	6-29	Mexico	San J. Atenco, Puebla	5	
MTo-16	Maize rhizosphere	ND	Mexico	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001)
MTo-293	Maize stem*	ND	Mexico	Totontepec, Oaxaca	2	Estrada-de los Santos <i>et al.</i> (2001)
ARDRA profile 19a						
LM1-376.8	Sugarcane roots	4-30	South Africa	Tongaat, KwaZulu-Natal	1	
LM2-376.3	Sugarcane roots	4-98	South Africa	Tongaat, KwaZulu-Natal	1	
RASC	Activated sludge	-	USA	Oregon State	-	Suwa <i>et al.</i> (1996)
Not profiled						
Ppe5	Sugarcane stem	ND	Brazil	Pernambuco State	4	
Ppe6	Sugarcane stem	ND	Brazil	Pernambuco State	4	
Ppe7	Sugarcane stem	ND	Brazil	Pernambuco State	4	

* Desinfectado superficialmente

Figura 1.14 Cepas de *B. tropica*, fuente y localización (Reis *et al.*, 2004). 1: semi caliente subhúmedo. 2: semi caliente húmedo. 3: caliente subhúmedo. 4: caliente húmedo. 5: templado subhúmedo. ND: no determinado. Las cepas sin referencia corresponden a aislamientos realizados originalmente por Reis y colaboradores, 2004.

Las bacterias pertenecientes a la especie *B. tropica* son bacilos Gram negativos aerobios estrictos, con una medida de 0,7 - 0,8 x 1,5 - 1,6 μm . Se ha reportado que esta bacteria posee *in vitro* diversas características que la hacen promotora del crecimiento vegetal (Caballero-Mellado *et al.*, 2007) convirtiéndola en un candidato promisorio para aplicaciones agrobiotecnológicas. Algunas de sus características se detallan en la Tabla 1.8 (Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2004). Presenta una elevada motilidad debido a la presencia de varios flagelos polares (Figura 1.15), y puede crecer utilizando diversas fuentes de carbono, incluyendo azúcares y ácidos orgánicos (Reis *et al.*, 2004). Como se mencionó anteriormente, las especies de *Burkholderia* asociadas a plantas poseen genomas de tamaños muy grandes y en el caso de *B. tropica*, fueron analizadas tres cepas que presentaron cinco replicones con un rango de tamaño de $3,24 \pm 0,06$ Mb para el más grande y de $0,53 \pm 0,08$ Mb para el más pequeño (Martínez-Aguilar *et al.*, 2008).

Característica	<i>B. tropica</i>
Reducción de C_2H_2 (Fijación de N_2)	+
Crece en medio BAc	+
Crece en medio MacConkey a 29°C	+
Crece en medio MacConkey a 37°C	-
Crece en medio BCSA	-
Crece en medio BSE a 42°C	-
Crece con compuestos aromáticos como FCE	-
Ureasa	+
Gelatinasa	-
Solubiliza fosfatos	+
Reduce nitrito a nitrato	+
Oxidasa	+
Catalasa	+
Producción de sideróforos	+
Producción de EPS	+
Producción de fungicidas	+
Flagelos	+
Rango de pH de crecimiento	4,50-7,00
Temperatura óptima	30°C
Contenido de GC (%) en el ADN	63,5

Tabla 1.8 Características relevantes de *B. tropica*. Adaptado de Reis *et al.*, 2004.

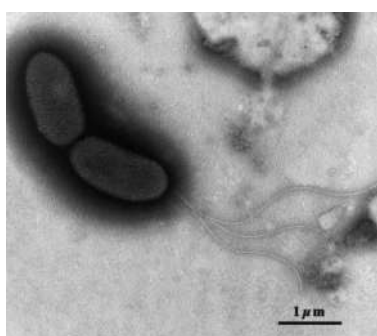


Figura 1.15 Imagen obtenida con un microscopio de transmisión electrónica de una célula de *B. tropica* sp. Nov. BM273, donde se observan los flagelos polares (Reis *et al.*, 2004).

La capacidad de fijar nitrógeno de *B. tropica* fue determinada por Reis *et al.* (2004) mediante cultivos en medios mínimos libres de nitrógeno y a través de la prueba de reducción del acetileno, estableciendo también el nitrato y el amonio inhiben la fijación de nitrógeno pero la adición de pequeñas cantidades de extracto de levadura a estos medios estimula la actividad de la nitrogenasa en este microorganismo. Esta capacidad diazotrófica se expresó en condiciones microaerófilas, como ocurre en general para otros microorganismos fijadores de nitrógeno, a pesar de presentar un metabolismo netamente aeróbico. Caballero-Mellado y colaboradores (2007) determinaron su capacidad de fijar nitrógeno mediante la prueba de reducción de acetileno y la detección de los genes *nifH*, confirmando la capacidad diazotrófica de *B. tropica*.

Adicionalmente a la fijación de nitrógeno, *Burkholderia tropica* presenta ciertas características tales como capacidad de producir sideróforos, solubilizar fosfatos, producción de EPS y ejercer biocontrol, que la convierten en una bacteria prometedora para su aplicación en la agricultura.

Burkholderia tropica produce una gran cantidad de un EPS ácido que está conformado por glucosa, ramnosa y ácido glucurónico en un rango molar de 2:2:1 respectivamente, creciendo en un medio de cultivo con manitol como fuente de carbono y glutamato como fuente de nitrógeno (Serrato *et al.*, 2006). Posteriormente, Serrato y colaboradores (2008) describieron la estructura del EPS de *B. tropica*, y determinaron que la misma es diferente a las encontradas en otras especies de este género. Sin embargo, presenta características básicas que permiten concluir que ésta es una estructura conservada y probablemente importante para la asociación con las plantas. El proceso mediante el cual *B. tropica* coloniza los tejidos de las plantas se encuentra aún sin dilucidar, pero se propuso que el EPS podría facilitar la interacción con las plantas a través de la unión con receptores tipo lectinas presentes en las células de las raíces (Serrato *et al.*, 2008).

En estudios realizados sobre especies diazotróficas de *Burkholderia* asociadas con plantas de tomate, se demostró que la habilidad de solubilizar fosfatos es variable en las diferentes especies, siendo *B. tropica* la que exhibió la mayor capacidad ya que fue capaz de solubilizar fosfatos aún en presencia de *buffer*. Por este motivo es que fue propuesto que no sólo la producción de ácidos orgánicos sería la responsable de esta capacidad solubilizadora, como ocurre en la mayoría de los microorganismos solubilizadores de fosfatos, pero aún no ha sido dilucidado su mecanismo (Caballero-Mellado *et al.*, 2007).

B. tropica produce sideróforos tipo hidroxamatos, presenta uno de los mayores tamaños de halo en el medio *Chrome Azurol S* (CAS). Los sideróforos en *B. tropica* son sintetizados en mayor cantidad cuando se utilizan como fuente de carbono, ácidos glutámico y succínico, sugiriendo que estos ácidos orgánicos forman parte de las rutas biosintéticas (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016).

En relación a su capacidad como agente de biocontrol, Tenorio-Salgado y colaboradores (2013) reportaron que diferente especies de *B. tropica* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de

hongos fitopatógenos a través de la producción de 18 compuestos volátiles que incluyen α -pineno y limoneno. *B. tropica* se encuentra fuertemente asociada con nematodos como *Helicotylenchus dihystra* y *Pratylenchus zae* y débilmente asociada con otros altamente patógenos *Xhipinema elongatum*, permitiendo postular a esta especie como un potencial inoculante para atraer comunidades de nematodos menos patógenos, reduciendo con ello el daño a un nivel aceptable y, en consecuencia, dando lugar a una situación de crecimiento más favorable de las plantas (Omarjee *et al.*, 2008)

B. tropica fue aislada inicialmente como diazótrofo endófito de maíz, caña de azúcar y teosinte, y posteriormente asociada al rizoplasma y rizósfera de cultivos de tomate (Caballero-Mellado *et al.* 2007). La cepa tipo es *B. tropica* Ppe8, y ha sido la más estudiada hasta el momento (Perin *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2004). Oliveira y colaboradores (2009) estudiaron la colonización de caña de azúcar con mezclas de inoculantes compuestas por *B. tropica* Ppe8 y *Azospirillum amazonense*, y por *B. tropica* Ppe8, *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* y *Azospirillum amazonense*. Se observó que *B. tropica* presentó una elevada competitividad con respecto a *A. amazonense*, colonizando más eficientemente las raíces. En cambio, en la segunda mezcla, las especies predominantes fueron las de *Herbaspirillum*. Por otro lado, se encontró que *B. tropica* MTo-293 es un eficiente colonizador de las raíces del híbrido de tomate Superman y que esta colonización fue acompañada por una mejora en la producción de esta variedad en número y peso de los frutos (Bernabeu *et al.*, 2015). Si bien son escasos los estudios de colonización y promoción del crecimiento *in vivo* realizados con *B. tropica*, han demostrando que este microorganismo no solo tiene la capacidad de colonizar eficientemente los tejidos de algunas plantas con las que interacciona, sino que esa interacción se ve reflejada en un aumento del rendimiento.

Tal como se describió anteriormente, Angus y colaboradores (2014) estudiaron la patogenicidad de diversas especies del género *Burkholderia* (patógenas y no patógenas), y varias especies cercanas filogenéticamente a *B. tropica* no presentaron los genes relacionados comúnmente con patogenicidad (ver descripción detallada de los genes en el Capítulo 6).

Por todo lo expuesto, se considera que *B. tropica* es una bacteria promisoría para ser utilizada en la agricultura, pensando en el desarrollo de inoculantes como una alternativa para mejorar la producción de los cultivos. Sin embargo, poco se conoce acerca de los aspectos fisiológicos básicos de este microorganismo.

1.25 Interacción PGPB endófito –gramíneas: Modelos de estudio

Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés en el estudio de PGPB asociadas a cultivos agrónomicamente importantes como arroz, maíz, trigo, caña de azúcar y sorgo, con especial interés en las bacterias fijadoras de nitrógeno buscando extender a las gramíneas los conocimientos

y usos de la FBN muy estudiado en cultivos de leguminosas (Bhattacharjee *et al.*, 2008; Dobereiner, 1997). Tal como se mencionó previamente, se han reportado diversas bacterias fijadoras de nitrógeno promisorias para su uso biotecnológico que habitan tanto la rizósfera como el interior de las plantas (Videira, 2007), postulándose que la eficiencia del intercambio del nitrógeno fijado en la interacción diazótrofo endófito-planta podría ser mayor si es liberado en el interior de la planta, quedando rápidamente disponible para sus necesidades, en comparación a la interacción diazótrofo rizosférico-planta (James y Olivares, 1998). La interacción entre bacterias endófitas diazótroficas y gramíneas ha sido estudiada en diversos modelos con distintas plantas hospedantes y bacterias huéspedes tales como *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5-caña de azúcar; *Azoarcus* sp. BH72-arroz; *Klebsiella pneumoniae* 342-trigo y *Herbaspirillum* spp. con cultivos de caña de azúcar, maíz, sorgo y arroz, entre otros (Taulé, 2011). Se han realizado diversas investigaciones enfocadas principalmente en demostrar el efecto de la FBN de estas bacterias sobre el crecimiento de la planta y también relacionados con la idea de trasladar éste y otros efectos beneficiosos a otros cultivos.

La búsqueda de nuevos microorganismos con capacidades promotoras del crecimiento vegetal tales como los diazótroficos endófitos, y el empleo de los mismos como modelo de interacción endófito-gramínea, particularmente cereales, contribuirá a profundizar el conocimiento de este tipo de interacción que permitirían lograr el desarrollo de nuevos inoculantes para estos cultivos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, junto con el potencial uso agrobiotecnológico de las bacterias pertenecientes al grupo A del género *Burkholderia*, en este trabajo de Tesis Doctoral se postula que *B. tropica* MTo-293 (diazótrofa, aislada de tejidos desinfectados de maíz, caña de azúcar y teosinte, y con características de PGPB *in vitro*) tendría la capacidad de colonizar eficientemente otras plantas diferentes de sus huéspedes naturales, tales como las especies vegetales *Triticum aestivum* (trigo) y *Sorghum bicolor* (sorgo), en las que podría expresar sus capacidades promotoras del crecimiento. Para ello, se proponen los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar metodologías conducentes a la aplicación agronómica de bacterias diazótroficas endófitas promotoras del crecimiento vegetal como una nueva alternativa de inoculación en gramíneas, particularmente cereales, que contribuya a la sustentabilidad económica y ambiental de estos cultivos, procurando un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente.

Objetivos específicos

1. Evaluar algunas de las habilidades de *B. tropica* MTo-293 como colonizadora competente y como promotora del crecimiento vegetal:

- a- la formación *biofilm* y la producción de enzimas líticas
 - b- la solubilización de compuestos insolubles de fósforo
2. Caracterizar el proceso de colonización de *B. tropica* MTo-293 en plantas de trigo y sorgo después de inocular semillas de ambas gramíneas, como primer requisito para poder expresar los posibles efectos benéficos
 3. Evaluar aspectos prácticos fundamentales para el posible uso de *B. tropica* MTo-293 como inoculante:
 - a- viabilidad bacteriana en formulaciones líquidas y sobre la superficie de las semillas
 - b- compatibilidad con agroquímicos
 4. Evaluar el efecto promotor de *B. tropica* MTo-293 en ambos cereales en ensayos a campo
 5. Realizar la búsqueda de genes de *B. tropica* MTo-293 relacionados con la rizocompetencia y la promoción del crecimiento vegetal

ANEXO 1

Solubilización de fosfatos

El P y su disponibilidad: solubilización de P por PSB

El P después del N es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, pero en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal ya que, a pesar de ser abundante en una variedad de formas orgánicas e inorgánicas de P insoluble, el P soluble esencial para el crecimiento de las plantas reacciona con iones tales como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, y disminuyen su biodisponibilidad (Goldstein, 1986). El fenómeno de precipitación y fijación de fósforo en los suelos es altamente dependiente del pH y del tipo de suelo: en suelos ácidos, el fósforo se asocia a óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio (Sharpley *et al.*, 1984), mientras que en suelos alcalinos lo hace con el calcio, ocupando entre el 20-80% del fósforo total del suelo (Gyaneshwar *et al.*, 2002) y están presentes en mayor proporción como compuestos insolubles, es decir, no biodisponibles (Sashidhar y Podile, 2009). Para evitar la deficiencia de P en los suelos agrícolas, los fertilizantes fosfatados son ampliamente aplicados. Sin embargo, una parte significativa de P añadido se inmoviliza rápidamente como formas insolubles y se hace no disponible para las plantas (Goldstein, 1986). La movilización de P por acción microbiana es una forma posible de proporcionar P soluble a las mismas. En la literatura se encuentran gran cantidad de reportes que muestran la habilidad que poseen ciertas bacterias de solubilizar compuestos de P inorgánico tales como: fosfato tricálcico, hidróxipatita y roca fosfórica. La detección visual y la estimación semicuantitativa de la habilidad de los microorganismos de solubilizar fosfatos inorgánicos, es posible utilizando métodos de *screening* en placa. Estos se basan en la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas, utilizando medios sólidos conteniendo fosfatos minerales (fosfato tricálcico o en algunos casos hidroxipatita) como única fuente de P (Nautiyal, 1999). En algunos casos ha habido resultados contradictorios entre la detección de halo en placas y los experimentos en medio líquido. Sin embargo, el método resulta en una buena estrategia para identificar y caracterizar de manera preliminar aquellos microorganismos capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos. También han sido llevados a cabo estudios *in vitro* sobre la dinámica de solubilización de P por diferentes cepas bacterianas basados en las determinaciones de P soluble en los medios de cultivo líquidos conteniendo compuestos insolubles como única fuente de P. Los resultados varían desde un comportamiento en el que se observa un aumento lineal de la concentración de P solubilizado con el crecimiento del cultivo, hasta comportamientos oscilatorios en cuanto a los niveles de P solubilizado. Se encuentran diversos géneros bacterianos que poseen esta capacidad y se las ha denominado bacterias solubilizadoras de P o PSB de sus siglas en inglés. Algunas de ellas se muestran en la Tabla A1.

Bacteria	P (mg/l)	Referencia
<i>Pseudomonas sp.</i>	8	Nautiyal, 1999
<i>Pseudomonas sp.</i>	35	Nautiyal, 1999
<i>Bacillus sp.</i>	8	Nautiyal, 1999
<i>Pseudomonas sp.</i>	26	Nautiyal, 1999
<i>Pseudomonas sp.</i>	90	Nautiyal, 1999
<i>Bacillus sp.</i>	21	Nautiyal, 1999
<i>Bacillus sp.</i>	268	Alikhani <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus sp.</i>	7,5	De Freitas <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas sp.</i>	52	Illmer y Schinner, 1992
<i>G. diazotrophicus</i>	100	Crespo <i>et al.</i> , 2011

Tabla A1 PSB y P solubilizado en medios líquidos con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Adaptado de Rodríguez y Fraga (1999).

La habilidad de solubilizar fosfatos inorgánicos ha sido atribuida a la capacidad que poseen las PSB de reducir el pH a su alrededor, ya sea por la liberación de ácidos orgánicos o de protones, con la consecuente liberación del P inorgánico del mineral por una sustitución de H^+ por Ca^{2+} , o bien, por quelación de los cationes asociados al PO_4^{-3} (Gyaneshwar *et al.*, 2002). La solubilización de P también puede ser llevada a cabo por la acción de fosfatasa pero éstas actúan sobre compuestos insolubles de P de origen orgánico convirtiéndolos luego en compuestos de P inorgánico (Rodríguez y Fraga, 1999).

Muchas bacterias solubilizadoras de fosfatos están presentes en los suelos, sin embargo su número no es lo suficientemente grande como para competir con otras bacterias comúnmente establecidas en la rizosfera (Rodríguez y Fraga, 1999). Por lo tanto, la cantidad de P liberado por estos microorganismos no es suficiente para proporcionar un incremento sustancial en el crecimiento vegetal. Esto implica que se requiera inocular las plantas con una concentración mucho mayor de bacterias que aquella encontrada normalmente en los suelos.

Solubilización de P a través de la producción de ácidos orgánicos

El mecanismo más aceptado como responsable del fenómeno de solubilización de fosfatos insolubles es la acidificación del medio como producto de la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. No sólo la naturaleza de la fuente de carbono sino también su concentración, afectan la producción de ácidos orgánicos y son considerados los factores más influyentes para la solubilización de P por las PSB (Nautiyal, 1999). El ácido glucónico es considerado el mayor responsable de la solubilización de compuestos insolubles de P en la mayor parte de los PSB, pero también ácidos tales como 2-ceto-glucónico, acético, láctico, oxálico, succínico y cítrico pueden ser producidos por estos microorganismos (Ahmed y Shahab, 2009). Para bacterias Gram negativas se ha propuesto que la oxidación extracelular de glucosa a ácido glucónico y 2-cetoglucónico a través de la ruta de oxidación periplasmática directa provee las bases bioquímicas para la alta eficiencia de

solubilización de compuestos insolubles de P y les confiere a las PGPB un fenotipo PSB (Goldstein, 1995; Sashidhar *et al.*, 2010). Goldstein y colaboradores (2003) postularon que esta ruta podría ser la base de la evolución de la relación mutualista planta-bacteria en algunos ecosistemas de suelos limitados en P. Esta oxidación primaria es catalizada por una glucosa deshidrogenada que pertenece al grupo de las quinoproteínas (PQQ-GDH), cuyo dominio catalítico se encuentra en la cara externa de la membrana citoplasmática (Duine, 1991), exceptuando la sGDH PQQ-dependiente de *Acinetobacter calcoaceticus* (Duine, 1999) que está en forma soluble. Dentro de éstas, la glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (mGDH, E.C. 1.1.99.17) ha sido una de las más estudiadas en relación no sólo a la solubilización de fosfatos insolubles sino también a la provisión de energía (Luna *et al.*, 2000). Estas deshidrogenasas de membrana poseen su sitio catalítico orientado hacia el lado periplasmático y son capaces de oxidar directamente el sustrato, y son importantes debido a que participan en la oxidación de sustratos en el exterior celular y el proceso está acoplado a la cadena respiratoria, es decir, a la producción de ATP (Anthony, 1996; Matsushita *et al.*, 1994; McIntire, 1994). Esta enzima en realidad es una aldosa deshidrogenasa y transfiere dos electrones de las aldosas directamente a la ubiquinona en la membrana plasmática (Figura A1). Esta oxidación directa al ácido aldónico correspondiente genera una fuerza protón motriz capaz de producir energía a través de la cadena respiratoria, mientras los protones dissociables del ácido quedan disponibles para la solubilización de compuestos insolubles de P.

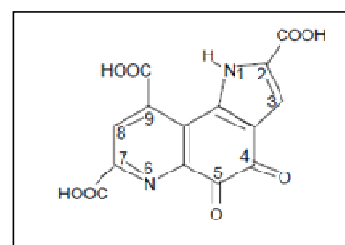
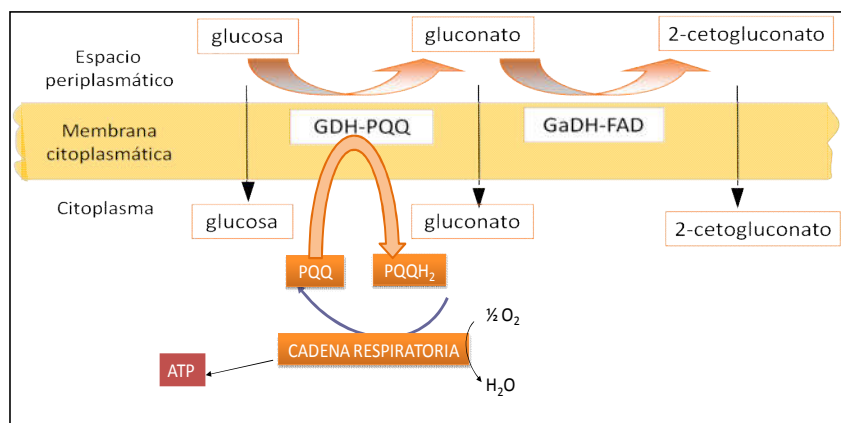


Figura A1 Izquierda: Ruta de oxidación directa de la glucosa en la membrana periplasmática. Derecha. Estructura del PQQ.

En 1980 Duine y colaboradores determinaron la identidad de su grupo prostético de las quinoproteínas y éste fue una *o*-quinona. Este hecho resultó relevante porque no se tenía conocimiento sobre quinonas que pudieran funcionar como cofactores. Basados en su nombre químico, 2,7,9-tricarboxi-1H-pirrolo (2,3-*f*) quinolina-4,5-diona, fue propuesto el nombre sistemático pirrolo-quinolina quinona (PQQ) (Duine, 1999). Esto dio origen a una tercer clase de deshidrogenasas, las deshidrogenasas PQQ-dependientes, las cuales pueden oxidar alcoholes, aldehídos y azúcares. El grupo PQQ se sintetiza a partir de los residuos de tirosina y de ácido

glutámico y es el único ejemplo de unión no covalente. El cofactor PQQ se obtuvo por primera vez desnaturalizando la enzima metanol deshidrogenasa y su estructura se muestra en la Figura 1.2 (Duine *et al.*, 1980). Se ha observado que muchas bacterias lo producen en grandes cantidades y lo excretan al medio. Aunque la vía biosintética del grupo PQQ aún no se conoce completamente (Flores-Encarnación *et al.*, 2004), hay genes involucrados en la síntesis del PQQ que ya han sido clonados, secuenciados y caracterizados en varios microorganismos (Choi *et al.*, 2008, Han *et al.*, 2008, Velterop *et al.*, 1995). El análisis de genes de biosíntesis de PQQ de una variedad de bacterias Gram negativas mostró que al menos los genes *abcde* del PQQ se conservan, están codificados en un mismo operón y la presencia de genes adicionales es variable (Wagh *et al.*, 2014).

En resumen, se puede generalizar que el gen *pqqA* codifica un péptido que se llama PQQA, que tiene un grupo glutamato y tirosina conservado y tiene como función principal la síntesis de los precursores de la biosíntesis de PQQ. Por otro lado, el gen *pqqB* codifica un péptido PQQB que pareciera estar involucrado en el transporte del PQQ a través de la membrana plasmática en el periplasma. En *P. fluorescens* B16, el operón está formado por 11 genes *pqqA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F*, *-H*, *-I*, *-J*, *-K*, y *pqqM* (Choi *et al.*, 2008). El gen *pqqC* codifica para la pirroloquinolina quinona sintasa C (PqqC), la enzima mejor caracterizada de esta ruta y que cataliza el paso final de la biosíntesis del PQQ denominado ciclización y oxidación del ácido 3a-(2-amino-2-carboxi-etil)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahidroquinolina-7,9- dicarboxílico a PQQ (Meyer *et al.*, 2011). Los roles en la biosíntesis de PQQ de los genes *pqqD*, *pqqE* y *pqqF* aún no se están bien definidos (Kim *et al.*, 2003). Se observó también que entre las diferentes PSB hay cierta homología con respecto a los genes que codifican para el PQQ y se podría decir que hay ciertos marcos de lectura (ORFs) que podrían ser compartidos.

Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ: mGDH

La mGDH forma parte de una vía alterna del sistema típico de fosfotransferasa que poseen muchos microorganismos para transportar la glucosa hacia el citoplasma para luego metabolizarla por las vías metabólicas comunes (Figura A1). La mGDH cataliza la oxidación directa de la D-glucosa para producir D-gluconato (Matsushita *et al.*, 1994). La mGDH de las Gram negativas puede encontrarse tanto en forma de apoenzima (sin PQQ) como de holoenzima (con PQQ), siendo esta última su forma activa. Se ha demostrado que algunas mGDH tienen unido el PQQ por medio de puentes de Ca^{+2} y Mg^{+2} , y que al ser dializadas frente a una solución *buffer* con EDTA pierden la actividad enzimática (Dewanti y Duine, 1998), tal como se ha detectado en *K. aerogenes* y *Pseudomonas* sp. (Flores-Encarnación *et al.*, 2004). Esto se debe a que se produce quelación entre el EDTA y los iones haciendo que el PQQ se desprenda de la mGDH dejándola inactiva. A estas mGDH se las clasificó como Tipo I. Por otro lado, se ha observado que *G. diazotrophicus* sintetiza la holoenzima y que, al igual que la mGDH de *Acinetobacter calcoaceticus* y *Gluconobacter oxydans*, no pierde la actividad cuando se

dializa frente a buffers que contienen EDTA (Galar y Boiardi, 1995), perteneciendo de esta manera a las quinoproteínas de Tipo II. Entre los microorganismos fijadores de N, *Klebsiella pneumoniae* posee la holoenzima (Hommes *et al.*, 1989), mientras que algunas especies de *Rhizobium* y *Azotobacter* sp. poseen sólo la apoenzima (van Schie *et al.*, 1987). En *E. coli* y *Acinetobacter iwoffii* la mGDH también está inactiva, es decir, se sintetiza sólo la apoenzima, ya que la vía de síntesis del grupo PQQ está alterada (Bernardelli *et al.*, 2001; Boiardi *et al.*, 1996; De Jonge *et al.*, 1996). En *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas aeruginosa* la síntesis de la apoenzima y el cofactor PQQ son no coordinadas (van Schie *et al.*, 1984). Bajo algunas condiciones sólo la apoenzima es sintetizada. La actividad de estas deshidrogenasas puede restablecerse mediante la adición exógena del grupo PQQ (Ameyama *et al.*, 1986; Iswantini *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 1997). Así en presencia de PQQ exógeno, el crecimiento de las mutantes de *E. coli* (carentes de actividad de fosfotransferasa y glucoquinasa) es similar al crecimiento de la tipo silvestre (Adamowicz *et al.*, 1991). El grupo PQQ es un quimioatrayente para los rizobios, los cuales dependen completamente de la fuente de carbono que le provee la planta huésped cuando se encuentran dentro del nódulo en forma de bacteroides (Bernardelli *et al.*, 2001; Boiardi *et al.*, 1996). La presencia de la apo-mGDH en los bacteroides hace que éstos sean atraídos por el grupo PQQ que se encuentra en el medio ambiente. Se ha propuesto que la vía extracelular beneficia energéticamente y competitivamente a los rizobios y en general a las bacterias que cuentan con esta vía. Bajo condiciones ambientales y de limitación de nutrientes, los rizobios pueden competir con otros microorganismos para infectar y producir nódulos en la raíz de las plantas leguminosas (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995).

Se ha sugerido que la incompleta oxidación de la glucosa vía la mGDH le da al microorganismo la capacidad de tomar el azúcar y transformarla en otro compuesto que no es tan rápidamente utilizado por otros organismos que compiten por los nutrientes del entorno. No obstante, la función principal está relacionada con el metabolismo energético. Se ha demostrado que una de las funciones principales de esta enzima es proveer energía extra a la energía suministrada por las rutas usuales, y también que se sintetiza en elevadas concentraciones bajo circunstancias donde las demandas energéticas para las funciones de crecimiento y/o mantenimiento son altas (Hommes *et al.*, 1989) tal como durante la FBN ya que provee la energía extra necesaria para este proceso (Luna *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2006).

La mGDH es una proteína que pesa aproximadamente 100 kDa, a la que se une una molécula de PQQ y un ión Ca^{2+} (McIntire, 1994). La mGDH puede donar electrones a diversos colorantes redox y análogos del cofactor (Matsushita *et al.*, 1989; Matsushita *et al.*, 1994). El aceptor natural de electrones es el PQQ y el sitio de unión se localiza hacia el espacio periplasmático (McIntire, 1994). La mGDH presenta la estructura típica de "super-barril", pero lo más notable es la presencia de un residuo de histidina (His-262), que se encuentra en la parte superior de la hendidura hidrofóbica

(Cozier y Anthony, 1995). La His-262 sustituye al doble anillo disulfuro encontrado en la MDH de *M. extorquens* y su función es mantener unido al grupo PQQ en el sitio catalítico de la mGDH. Su interacción con el grupo PQQ es más débil que la que puede proporcionar el doble anillo disulfuro en la MDH (Avezoux *et al.*, 1995). Esta puede ser una de las razones por las que el grupo PQQ puede ser removido de la mGDH con mayor facilidad (Cozier *et al.*, 1999).

En casi todas las bacterias Gram negativas la actividad mGDH está regulada según las necesidades de carbono o de energía de la célula por ser parte central del metabolismo del carbono, no por la disponibilidad de P. La mGDH no ha sido reportada como parte de ningún regulón asociado a la deficiencia de P en ninguna de las bacterias estudiadas hasta el momento. En general, grandes cantidades de ácido glucónico secretado al medio se correlacionan con elevada actividad mGDH, siendo esta producción normalmente constitutiva en la mayoría de las bacterias solubilizadoras de P, excepto para *Erwinia herbicola* (Goldstein y Liu, 1987) y *Enterobacter asburiae* PSI3 en las que se ha demostrado que la actividad enzimática responde a las deficiencias de P. Goldstein y Liu (1987) encontraron en *E. herbicola* que la solubilización de P se ve afectada por la presencia de compuestos insolubles de P (*P starvation*) y reprimida por elevadas cantidades de P externo, es decir, pareciera estar regulada por la concentración de P soluble presente en el sobrenadante del cultivo. Gyaneshwar con sus colaboradores (1999) encontraron que la actividad mGDH incrementó más de 5 veces en condiciones de *P starvation* pero la actividad no fue reprimida por completo en presencia de exceso de P soluble, adjudicando esto a la presencia de 2 isoenzimas. En cambio, en *P. aeruginosa* P4 grandes cantidades de ácido glucónico fueron secretadas tanto a elevados como a bajos niveles de P, indicando la naturaleza constitutiva de esta enzima para este microorganismo. Mikanova y Nováková (2002) aislaron un número de PBS y observaron que algunas exhibían represión de actividad en presencia de P soluble mientras que otras no mostraban efecto represor. Estas observaciones indican que la solubilización de P es un complejo fenómeno que depende de muchos factores tales como las condiciones nutricionales, fisiológicas y de crecimiento del microorganismo en el cultivo. En el ecosistema de suelos limitados en P soluble y ricos en compuestos insolubles de P la ruta periplasmática de oxidación de azúcares puede jugar un rol vital para incrementar la biodisponibilidad del P.

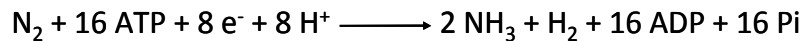
Las vías bioquímicas y la genética de la síntesis y expresión de la mGDH se han estudiado en muchas bacterias (Clesscerl *et al.*, 1998; Naveed *et al.*, 2015; van Schie *et al.*, 1984). van Schie y colaboradores (1984) demostraron que la síntesis de la holoenzima mGDH y el cofactor PQQ podrían no estar coordinadas y el control de la actividad mGDH por la síntesis de PQQ podría estar generalizado entre las bacterias. Choi y colaboradores (2008) han informado que los genes implicados en la biosíntesis de PQQ pueden ser inducidos bajo limitación de nutrientes. Además, la sobreexpresión del gen o genes biosintéticos del PQQ en algunas bacterias dio como resultado la

producción de ácido glucónico y la cantidad de secreción ácida limitada de PQQ, pero no de apoproteína (Wagh *et al.*, 2014). Por otra parte, algunos informes muestran que los genes que inducen la capacidad de las PSB (en bacterias con fenotipo negativo de PSB) no están directamente involucrados en la biosíntesis de la holoenzima mGDH o PQQ, sino en la síntesis de una proteína transportadora (Ahmed y Shahab, 2009). En *Pseudomonas cepacea*, otro gen llamado *gabY* puede actuar como un gen funcional en la expresión y/o regulación de la vía oxidativa directa (Babu-Khan *et al.*, 1995). Sin embargo, todavía no se conocen claramente los mecanismos bioquímicos y genéticos que regulan la biosíntesis de PQQ y su ensamblaje para dar una mGDH activa (Ahmed *et al.*, 2009; Wagh *et al.*, 2014). Con el objeto de comprender la regulación de la expresión de la holoenzima se han realizado estudios de extracción de genes provenientes de PSB que han sido expresados con éxito en bacterias incapaces de solubilizar compuestos de P insoluble. Sin embargo, al usar una estrategia similar para aislar el gen de *Pseudomonas cepacia*, el gen *gabY*, se observó que no tenía similitud con la PQQ sintetasa aislada del caso anterior, pero sí la tenía con una proteína del sistema de la membrana periplasmática. En presencia de *gabY*, solamente se produjo ácido glucónico si las cepas expresaban el gen funcional encargado de la síntesis de la mGDH (*gcd*) (Rodríguez *et al.*, 2007). Por lo tanto este gen *gabY*, podría tener un rol alternativo en la regulación y/o expresión de la ruta de oxidación de aldosas en el espacio periplasmático en *Pseudomonas cepacia*. El gen involucrado en la síntesis de la mGDH (*gcd*) fue clonado y caracterizado en *Acinetobacter calcoaceticus* y en *E. coli* (Cleton-Jansen *et al.*, 1988, 1990) y en *E. asburiae* (Tripura *et al.*, 2007). El gen aislado de *P. cepacea* designado como *gabY* le confiere la capacidad de producción de ácido glucónico a *E. coli* JM109. *gabY* no tiene homología con los genes que codifican para PQQ y basados en la homología con otras proteínas se propuso que tiene algún rol en la expresión o en la regulación de la ruta periplasmática de producción de glucónico en *P. cepacia* y podría actuar como un gen funcional *in vivo* (Babu-Khan *et al.*, 1995).

La actividad de la enzima clave de la oxidación periplasmática directa de la glucosa, la mGDH, es dependiente de la síntesis de la apoenzima y/o la del cofactor, es decir, que la síntesis de ambos puede ser no coordinada y depende también del ensamblaje del cofactor con la apoenzima para dar lugar a la holoenzima. No obstante, se observó que en la mayoría de los microorganismos estudiados que no expresan constitutivamente la holoenzima mGDH o que sólo la expresan bajo determinadas condiciones, en general, se encuentra alterada la síntesis del PQQ y en particular la expresión de la enzima PQQ sintasa es la que se encuentra alterada (Encarnación-Flores *et al.*, 2004). En *Pseudomonas aeruginosa*, la mGDH no es constitutiva sino inducible por glucosa, gluconato, manitol y glicerol (Goldstein *et al.*, 1995). Goldstein y Liu (1987) han informado que el rasgo PSB en *Erwinia herbicola* es inducido/reprimido por niveles bajos/altos de P exógeno y encontró algunos genes implicados en el metabolismo de la inanición de fosfato.

Fijación Biológica de Nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) puede ser considerada como la habilidad que poseen algunas especies de microorganismos de convertir el nitrógeno atmosférico (N₂) en amonio (NH₄⁺). Esta reducción del nitrógeno es debida al complejo enzimático de la nitrogenasa, la cual requiere como fuente de energía la hidrólisis de ATP (se emplean 16 moléculas de ATP por cada molécula de N₂ reducida) (Hoffman *et al.*, 2014; Wagner, 2012).



Todos los organismos fijadores de N₂ (diazótrofos) son procariotas, y este grupo especializado incluye organismos acuáticos, como las cianobacterias, bacterias de vida libre que pueden vivir y fijar N₂ independientemente de otros organismos, bacterias que forman relaciones de asociación con plantas, y bacterias que tienen simbiosis con plantas (Postgate, 1982; Wagner, 2012). Los microorganismos fijadores pueden ser aerobios, anaerobios, Gram positivos, Gram negativos, heterótrofos, autótrofos y fotótrofos, con una única característica común: la habilidad para fijar N₂. Todos los sistemas enzimáticos de nitrogenasa aislados de diferentes organismos fijadores de nitrógeno muestran amplias similitudes. Su más remarcable propiedad es la sensibilidad al oxígeno molecular (O₂) tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta es la razón por la cual para muchos procariotas la fijación tiene lugar sólo en condiciones de microaerofilia, por ejemplo, dentro del nódulo de las leguminosas donde la presión parcial de O₂ es muy baja debido a la acción de una leg-hemoglobina (Appleby, 1984). No obstante, algunos procariotas pueden llevar a cabo la fijación en ambientes con elevadas pO₂ debido a la presencia de un mecanismo de protección de la nitrogenasa, como es el caso de *Azotobacter vinelandii* (Poole y Hill, 1997). Este último microorganismo pertenece a los diazótrofos de vida libre.

Formación de *biofilm*

Donlan y Costerton (2002) definen al *biofilm* como una comunidad microbiana compuesta por células sésiles que se encuentran irreversiblemente adheridas a un sustrato o a una interfase o entre ellas, hallándose embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas producen, y exhiben un fenotipo alterado en relación a la tasa de crecimiento y la transcripción génica con respecto a sus contrapartes planctónicas. El componente principal del *biofilm* son los exopolisacáridos, que por sus propiedades fisicoquímicas le otorgan estabilidad y cooperan con la adherencia a la superficie, aunque normalmente puede contener proteínas, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos (Flemming y Wingender, 2010; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Estas sustancias que conforman el *biofilm* son comúnmente llamadas sustancias poliméricas extracelulares, y conforman

la composición heterogénea del *biofilm*, que influye en su complejidad y en la diferencia en el gradiente de los nutrientes que se encuentran en el mismo, además de conferirle protección y competitividad a los microorganismos que lo conforman (Bordi y Bentzmann, 2011).

La formación del *biofilm* y las señales que inician el proceso son variables. En bacterias Gram negativas, como es el caso del microorganismo en estudio en el presente trabajo, el comienzo de la formación del *biofilm* está dado por ciertas condiciones ambientales, como puede ser la escasez de nutrientes, o la presencia de alguno en particular. Por otro lado, hay microorganismos que no requieren señales, y desarrollan *biofilm* en casi todas las condiciones en las que crecen (O'Toole *et al.*, 2000). Para el desarrollo del *biofilm*, son necesarios ciertos requerimientos de los microorganismos que lo componen, que implican la expresión de genes distintos de aquellos necesarios para la vida en cultivo planctónico (Watnick y Kolter, 2000). Ha sido reportado que hasta un 30% de los genes pueden estar diferencialmente expresados entre una bacteria crecida en condiciones planctónicas y una crecida en forma de *biofilm* (Solano *et al.*, 2002).

El desarrollo de un *biofilm* comienza con la aproximación de bacterias a una superficie. El acercamiento se hace tan estrecho que la movilidad disminuye, permitiendo la formación de una asociación transitoria con la superficie (Figura A3-1) (Watnick y Kolter, 2000). Esta adhesión inicial es dinámica y reversible, y depende de fuerzas atractivas o repulsivas generadas por el ambiente en el que se encuentran las bacterias, y por la presencia de flagelos y del pili tipo IV en las mismas. Posteriormente, esta adhesión se vuelve irreversible cuando algunas bacterias logran superar las fuerzas del ambiente y establecerse sobre la superficie de forma estable, siendo denominadas células sésiles aquellas que logran este tipo de adhesión. A medida que los microorganismos planctónicos se acercan, comienzan a formarse las microcolonias de células sésiles (Figura A3-2). Luego, con la incorporación de más microorganismos, el *biofilm* comienza a crecer tridimensionalmente, incrementándose la cantidad de microorganismos así como la matriz que los rodea (Figura A3-3 y 4). La última etapa del desarrollo del *biofilm* es el desprendimiento de células o agregados celulares (Figura A3-5), lo que permitiría dar inicio a un nuevo *biofilm* sobre otra superficie. Este desprendimiento puede deberse al proceso activo de dispersión, a un proceso mecánico o a un proceso químico (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

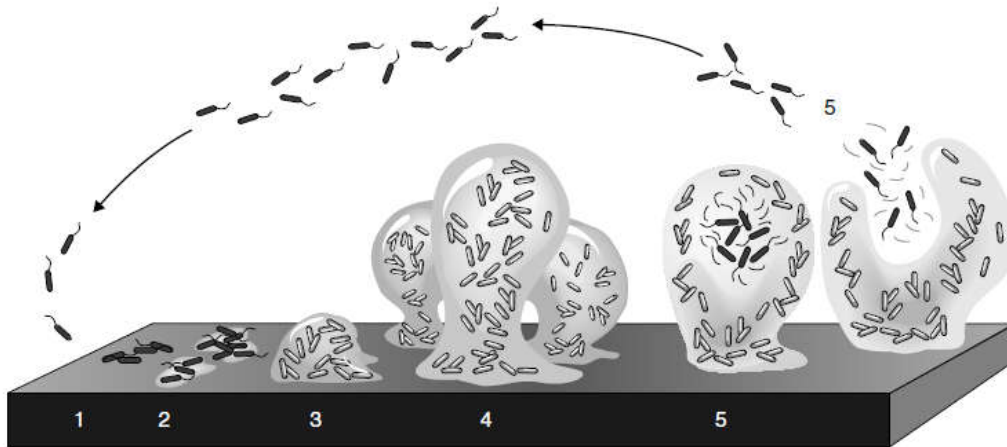


Figura A3 Proceso de formación de un *biofilm* (Sauer, 2003).

La cuantificación de los *biofilms in vitro* es normalmente llevada a cabo a partir de la tinción de los microorganismos componentes del mismo mediante la utilización de colorantes como cristal violeta o safranina (Adetunji e Isola, 2011; O'Toole *et al.*, 2000). Si bien este tipo de técnicas presenta ciertas limitaciones (Peeters *et al.*, 2008), son las más ampliamente distribuidas por la información útil que brindan, y por su practicidad y bajo costo. Cuando se desea estudiar la estructura tridimensional del *biofilm*, es necesaria la aplicación de técnicas microscópicas, como pueden ser la microscopía de escaneo laser confocal o la microscopía de barrido (Palmer y Sternberg, 1999; Schlafer y Meyer, 2016). Este tipo de técnicas permite evaluar la conformación del *biofilm*, así como su desarrollo en el tiempo.

El desarrollo de los *biofilms* ha sido ampliamente estudiado, debido a la importancia de este tipo de crecimiento en diversas áreas de la ciencia. En el caso de las PGPB, ha sido reportado que muchas tienen la capacidad de formar *biofilm* sobre la superficie de las raíces (Bogino *et al.*, 2013; Ramey *et al.*, 2004), no solo para colonizar el rizoplano, sino también para proteger a la planta de microorganismos patógenos (Chen *et al.*, 2012; Haggag y Timmusk, 2008). La producción de exopolisacáridos por parte de las bacterias es un requisito para la formación de *biofilms in vitro*. Mediante el estudio de cepas mutantes incapaces de la síntesis y secreción de EPS, se ha observado que esto deriva en la incapacidad de colonizar tejidos vegetales (Meneses *et al.*, 2011).

Estructura de la pared vegetal

Las células vegetales están rodeadas por una pared relativamente delgada, ubicada por fuera de la membrana plasmática, la pared celular. La pared celular vegetal proporciona la forma y el soporte a la planta, ayuda a regular procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta de defensa, es fuente de moléculas biológicamente activas en la interacción célula-célula y actúa de barrera física ante la invasión de patógenos. Está compuesta por una mezcla compleja de carbohidratos, lignina y

proteínas, así como de otras sustancias embebidas en ella (Goodwin y Mercer, 1990; Showalter, 1993). La pared celular de las plantas superiores está formada por tres capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria. La pared es secretada (elaborada y despedida por la célula hacia el exterior) por la célula viva, de manera que la capa más vieja está hacia afuera, y la capa más joven hacia adentro, junto al protoplasma, demarcando el lumen celular (cavidad celular limitada por las paredes). La lámina media, primera capa que se deposita durante la división celular, está formada principalmente por polisacáridos pécticos y proteínas de diferente composición que el resto de la pared y es la encargada de mantener la unión entre las células adyacentes (Zarra y Revilla, 1993). Una vez completada la división se deposita la pared primaria, formada fundamentalmente por celulosa; y también por otros carbohidratos como hemicelulosa y polisacáridos pécticos así como por proteínas estructurales, lignina y otras sustancias. Presenta gran flexibilidad, debido en parte a la presencia de sustancias pécticas y a la disposición desordenada de las microfibrillas de celulosa. La pared primaria continúa creciendo en área y espesor mientras las células hijas crecen en tamaño. La pared secundaria comienza a depositarse hacia el final del crecimiento de la célula y continúa cuando éste ha parado. Consiste básicamente en tres capas de microfibrillas de celulosa con diferente orientación embebidas de lignina, que realiza un papel cementante. Contiene además otros polisacáridos tales como hemicelulosas. En conjunto, es una estructura más gruesa que la pared primaria, con una mayor rigidez y resistencia (Smith, 1993) (Figura A4).

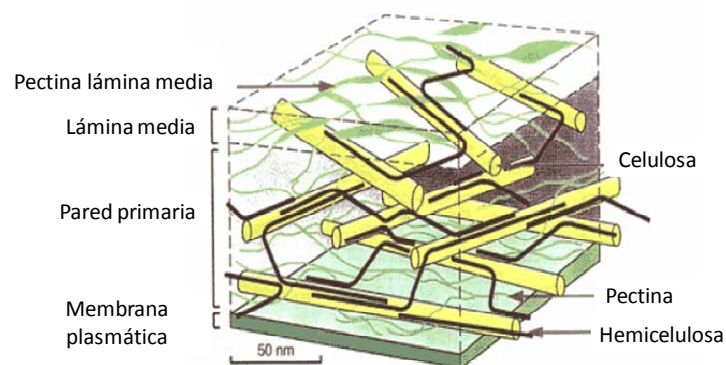


Figura A4 Estructura de la pared celular vegetal, donde se observan los componentes de su estructura: celulosa, hemicelulosa y pectina.

La celulosa es el polisacárido más común encontrado en el reino vegetal. Consiste en un polímero lineal (no ramificado) formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular vegetal. Las microfibrillas de celulosa forman una estructura paracristalina estabilizada por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, con cadenas orientadas de manera paralela y antiparalela. Las hemicelulosas son polisacáridos muy heterogéneos, segundos por orden de abundancia en la pared celular vegetal. Sus componentes

principales varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan. Son polisacáridos neutros, conteniendo habitualmente glucosa o xilosa, que presentan una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas. Algunos polisacáridos representativos de las hemicelulosas encontradas en la pared celular son: xilanos, mananos, glucomananos, galactoglucomananos, xiloglucanos y calosa.

Se utiliza generalmente el término “sustancias pécticas” como una denominación de grupo para los polisacáridos complejos provenientes de tejidos vegetales y que contienen en su composición química una gran proporción de unidades de ácido galacturónico (GALA) formando cadenas y se caracterizan por su capacidad para formar geles y actuar como sustancias cementantes en la lámina media y la pared primaria. Algunos polisacáridos pécticos de la pared celular son: galacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, galactano, arabinogalactano y arabinano.

Debido a la gran complejidad química de la pectina y a su abundancia en la naturaleza, los microorganismos poseen una gran variedad de enzimas capaces de degradarla de alguna forma, con el fin de utilizarla como FCE. En general, estas enzimas son de tipo inducible y su síntesis responde a la presencia extracelular del sustrato. La degradación enzimática total de la pectina resulta primordialmente en GALA y ramnosa junto a cantidades menores de galactosa, arabinosa, metanol, acetato y trazas de otros azúcares, tales como xilosa, fructosa, apiosa, etc. los cuales son metabolizados durante el crecimiento celular.

La pectina industrial se extrae de residuos de la industria juguera: pomaza de limón (25-35 % pectina en base seca) y de manzana (15-20% de la fruta procesada, 10-15% de pectina). El proceso de extracción se efectúa con ácidos minerales en caliente, luego se filtra, se precipita con alcohol y se seca. Contienen 70-80% de GALA y una metilación del 65-80%.

Además, puede encontrarse y extraerse a partir de diversos tejidos vegetales. Se utiliza principalmente como materia prima pulpa de manzana y cáscara de cítricos, generalmente de limón y naranja (Emaga *et al.*, 2008). La cáscara de cítricos contiene aproximadamente un 20% de pectina en su composición.

Como se mencionó anteriormente, la lámina media que conecta a las células vegetales unas con otras, consiste principalmente de pectina que funciona como sustancia cementante, mientras que las paredes primarias y secundarias (en células maduras) poseen un 30 a 70% de celulosa respectivamente. Así es como la colonización intercelular de las bacterias estaría mediada por la secreción de enzimas pécticas que permitirían la ocupación de los espacios intercelulares a través de la ruptura de la lámina media de la pared tal como se ha propuesto para algunas PGPB endófitas.

Enzimas líticas de la pared vegetal

Pectinasas

Las pectinasas se clasifican en tres tipos principales: enzimas desesterificantes (pectinesterasas), enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) y protopectinasas (Alkorta *et al.*, 1998).

Las pectin estererasas (PE), también conocidas como polimetilgalacturonato estererasas (PMGE), cortan los enlaces éster del C6 liberando el metanol y convirtiendo la pectina de alto grado de esterificación en pectatos de bajo grado de esterificación. Son sintetizadas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores (Alkorta *et al.*, 1998).

Las enzimas despolimerizantes o despolimerasas se clasifican teniendo en cuenta tres aspectos, que se refieren al modo de ataque al esqueleto de ácido poligalacturónico (APG): i- el mecanismo químico de ruptura de los enlaces: hidrólisis o transeeliminación; ii- la naturaleza del sustrato preferido: pectina o APG; iii- el modo de corte del polímero: endo o exo (Alkorta *et al.*, 1998; Kashyap *et al.*, 2001). Estas enzimas pueden romper los enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4) entre los monómeros de ácido galacturónico de las pectinas por hidrólisis (hidrolasas) o por transeeliminación (liasas). Las poligalacturonasas (PG) o pectato hidrolasas degradan la pectina desmetilada, es decir, el APG o pectato. Pueden tener modo de acción endo o exo. Las polimetilgalacturonasas (PMG) o pectina hidrolasas degradan el polímero metilado, la pectina. Las liasas, también llamadas transeeliminadas, rompen los enlaces glucosídicos en el C4 eliminando al mismo tiempo un hidrógeno en el C5. Durante la ruptura se genera un doble enlace en el extremo no reductor de la cadena resultante. Según el sustrato sobre el que actúen sea pectina o APG se clasifican en polimetilgalacturonato liasas o poligalacturonato liasas, respectivamente. Las polimetilgalacturonato liasas (PMGL) o pectin liasas fueron descubiertas por Albersheim en 1960. Todas las descritas hasta la fecha actúan de forma endo (Alkorta *et al.*, 1998). A diferencia de las hidrolasas, no requieren calcio para su actividad. Las poligalacturonato liasas (PGL) o pectato liasas actúan sobre sustratos con bajo grado de esterificación y requieren Ca^{+2} para su actividad óptima. Pueden tener modo de acción endo o exo, y requieren iones calcio para la actividad enzimática (Sakai *et al.*, 1993).

Las protopectinasas son enzimas que solubilizan la protopectina, y se caracterizan por liberar pectina de alto peso molecular a partir de protopectina. Se clasifican en dos tipos (Sakai *et al.*, 1993). El tipo A degrada el APG de la protopectina mientras que el tipo B degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el APG con otros constituyentes de la pared celular. En este tipo de enzimas se incluirían las hidrolasas y liasas que degradan el ramnogalacturonano (De Vries y Visser, 2001).

Celulasas

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) presentes en la celulosa. La degradación total de la celulosa requiere la acción sinérgica de los tres componentes enzimáticos de las celulasas: endoglucanasas (EGs) o endo- β -1,4-glucanasas, celobiohidrolasas (CBHs) o exo- β -1,4-glucanasas y β -1,4-glucosidasas (BGLs) (Reinhold-Hurek, 1993). Estas enzimas catalizan la bioconversión de celulosa insoluble a soluble en agua con la subsecuente liberación de glucosa (Jahangeer *et al.*, 2005).

El mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa se resume en tres etapas: primero la EG actúa al azar sobre los enlaces β -1,4-glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa. Esta enzima actúa sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato en la segunda etapa. Posteriormente, la CBH ataca gradualmente las moléculas de celulosa en los extremos terminales no reductores, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa (Ryu y Mandels, 1980). Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de las endo y exo glucanasas. Finalmente las moléculas de celobiosa son hidrolizadas por la BGL dando glucosa como producto final.

Capítulo 2

Características de *B. tropica* relacionadas con la rizocompetencia: formación de *biofilm* y producción de enzimas líticas

Capítulo 2

Características de *B. tropica* relacionadas con la rizocompetencia:
formación de *biofilm* y producción de enzimas líticas

2.1 RESUMEN

En el estudio de las interacciones planta-microorganismo, uno de los primeros pasos es la evaluación de las características que puede poseer el microorganismo para colonizar eficientemente las raíces. En el presente capítulo, se describen los ensayos que permitieron evaluar características de *B. tropica* MTo-293 relacionadas con la rizocompetencia, tales como la capacidad de formar *biofilm*, implicada en la colonización del rizoplano, y la producción de enzimas líticas de la pared celular vegetal, que también le permite ingresar a los tejidos internos de las plantas en forma activa. Haciendo uso de cultivos *batch* se seleccionó un medio con glicerol y extracto de levadura como promisorio para su uso como inoculante a aplicar en cultivos de gramíneas. Mediante el análisis del crecimiento de la cepa salvaje de *B. tropica* MTo-293 y dos derivadas marcadas con los genes reporteros *gfp* y *gus*, se determinó que presentaron un comportamiento similar, pudiendo ser tratadas como equivalentes. La formación de *biofilm* por *B. tropica* MTo-293 se evaluó: i- cuantitativamente en distintos medios de cultivo y sobre distintas superficies abióticas (polipropileno y vidrio) mediante la técnica de tinción con cristal violeta, y se observó formación de *biofilm* en ambas superficies en la interfase líquido-aire y en mayor cantidad en el medio con glicerol y extracto de levadura; ii- cualitativamente utilizando técnicas microscópicas, y se caracterizó el crecimiento del *biofilm* sobre una superficie de vidrio como un *biofilm* compacto de 26 μm de espesor. Un *screening* en medio sólido permitió determinar actividad lipasa y pectinasa. En medios líquidos no se encontró actividad celulasa, se detectó actividad pectinasa y se determinó que es inducible por sustrato. No se encontró actividad celulasa ni pectinasa en cultivos de *B. tropica* MTo-293 en un sistema de crecimiento en presencia de raíces de gramíneas, indicando que si la colonización interna de estos tejidos se realizó activamente mediante la expresión de estas enzimas, las concentraciones de las mismas no pudieron ser detectadas con la metodología empleada. Se puede concluir que *B. tropica* MTo-293 presenta dos características ampliamente distribuidas entre las PGPB, que influyen directamente sobre la competencia por la colonización de tejidos superficiales, como es la formación de *biofilm*, y la colonización endofítica mediada por un mecanismo activo, como es la producción de una enzima lítica de la pared celular vegetal, específicamente una pectinasa.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Organismos y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la bacteria *Burkholderia tropica* MTo-293 (ATCCBAA 569) (Reis *et al.*, 2004), cedida gentilmente por el Dr. Jesús Caballero-Mellado (Centro de Ciencias Genómicas, Cuernavaca, Morelos, México), que se nombrará como *B. tropica*. Las cepas de *B. tropica* fueron conservadas en medio LB líquido (Sambrook, 1989) (Tabla 2.1) con glicerol 20% v/v a -80°C. Se realizaron repiques mensuales en medio LB agarizado (con la adición de 14 g/l de agar), que fueron mantenidos a 4°C. Las cepas derivadas de *B. tropica* que contienen el gen reportero correspondiente a la enzima β -glucuronidasa (*gus*) o el de la proteína verde fluorescente (o GFP, por las siglas en inglés de *Green Fluorescent Protein*) (*gfp*) fueron crecidas y mantenidas en los mismos medios con el agregado de tetraciclina (Tc) (10 mg/ml). Los medios de cultivo líquidos y sólidos se esterilizaron por autoclave a 121°C durante 20 minutos. La Tc se esterilizó por filtración con membranas de 0,22 μ m (Merck Millipore).

Componente	Concentración (g/l)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	5
Glucosa	1
pH	6,00

Tabla 2.1 Composición del medio LB (Sambrook, 1989).

Las cepas bacterianas y los plásmidos que se utilizaron para realizar los experimentos de este capítulo se detallan en la Tabla 2.2.

Cepa/plásmido	Descripción	Referencia/fuente
<i>B. tropica</i> MTo-293	Cepa salvaje	Reis <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA</i> , Δ lacU169, F80dlac ZDM15	Bethesda Res. Lab.
<i>B. tropica-gus</i>	MTo-293 con el plásmido pFs7p- <i>gusA</i> , marcada con el gen <i>gus</i>	Bernabeu <i>et al.</i> , 2015
<i>B. tropica-gfp</i>	MTo-293 con el plásmido pFAJ1708:: <i>GFP</i> , marcada con el gen <i>gfp</i>	Bernabeu <i>et al.</i> , 2015
pFAJ1708	Vector de clonación, Tc ^r	Dombrecht <i>et al.</i> , 2001
pGreenTir	Ap ^r , cassette <i>gfp</i> -P64L/S65T	Miller y Lindow, 1997
pFAJ1708:: <i>GFP</i>	Derivado de pFAJ1708 que contiene promotor constitutivo fusionado al gen <i>gfp</i> , Tc ^r	Bernabeu <i>et al.</i> , 2015

Tabla 2.2 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el presente capítulo.

La cepa que contiene el gen *gus* fue gentilmente cedida por el Dr. Jesús Caballero-Mellado (Centro de Ciencias Genómicas, Cuernavaca, Morelos, México), y será nombrada como *B. tropica-gus*. La variante isogénica que contiene el gen *gfp* fue construida a partir de *B. tropica* MTo-293 tal como se detalla posteriormente, y será nombrada como *B. tropica-gfp*.

Para la realización de los inóculos se tomaron dos azadas del cultivo sólido, se colocaron en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio LGI líquido (Stephan *et al.*, 1991) modificado según el ensayo (Figura 2.1) y se hicieron crecer los microorganismos durante 24 horas a 30°C y 200 rpm. Posteriormente, un volumen apropiado del cultivo se sembró en 50 ml de medio LGI, y se hizo crecer en las mismas condiciones que el cultivo anterior por 48 horas. Se determinó en forma directa el número de bacterias viables en la suspensión final de los cultivos mediante la técnica de recuento en placa (Swanson *et al.*, 2001) por diluciones seriadas (1/10) en solución fisiológica estéril (NaCl 0,85% p/v). Se sembró un volumen de una dilución apropiada en placas de Petri con medio LGI agarizado (por triplicado) y se dispersó con espátula de Drigalski. Las placas se incubaron por 24 horas en estufa a 30°C, se contaron las colonias y se expresó el resultado en Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml) (Figura 2.2).

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64
KH ₂ PO ₄	0,6
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
Ácido cítrico	0,2
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0,01
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,002
pH	6,00



Figura 2.1 Composición del medio de cultivo LGI (Stephan *et al.*, 1991) y cultivos de *B. tropica* crecidos en ese medio de cultivo.

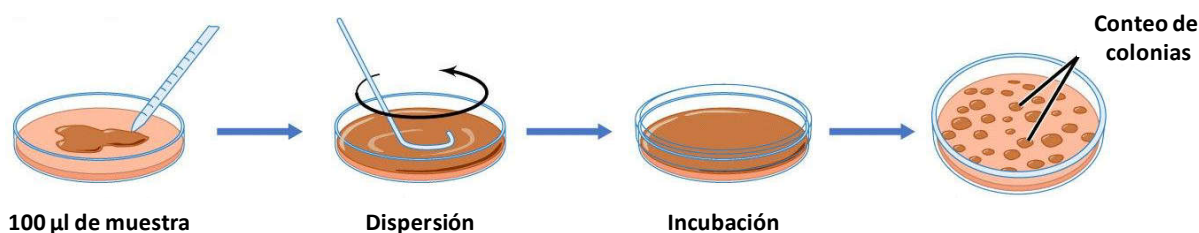


Figura 2.2 Metodología del recuento en placa por diluciones seriadas. Adaptado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf

2.2.2 Construcción de *B. tropica-gfp* y estabilidad del plásmido

Para obtener la cepa de *B. tropica* marcada con el gen *gfp*, primero se construyó un plásmido estable que llevara dicho gen (pFAJ1708::GFP). Para su construcción se realizó la digestión del plásmido pFAJ1708 (Figura 2.3) (Dombretch *et al.*, 2001) con la enzima de restricción *EcoRI* y luego fue ligado a un fragmento 0,77 Kpb que contenía el gen *gfp* del plásmido pGreenTir (Miller y Lindow, 1997) digerido con la misma enzima, dando lugar al plásmido pFAJ1708::GFP.

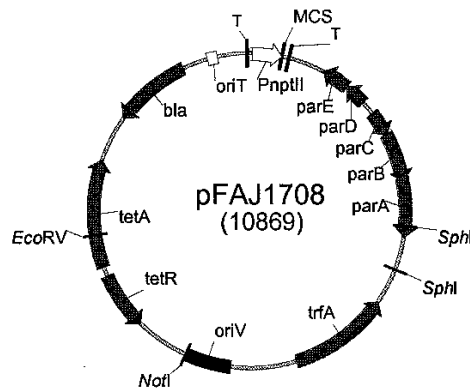


Figura 2.3 Plásmido pFAJ1708, sitios de restricción y genes que contiene (Dombretch *et al.*, 2001).

Posteriormente se transformaron células de *Escherichia coli* DH5 α competentes por electroporación. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB agarizado con Tc. Se eligieron los clones que resultaron verdes bajo luz azul, indicando que el gen *gfp* se había clonado en la orientación correcta y, por lo tanto, se expresaba. El plásmido fue introducido posteriormente en la cepa de *B. tropica* MTo-293 competente por electroporación. La estabilidad de la marca fue analizada por más de 80 generaciones (Ver Anexo 2).

Los procedimientos de obtención de ADN total, purificación de plásmidos, clonado, obtención de competentes y transformación de *E. coli* y *B. tropica*, fueron llevados a cabo según técnicas previamente establecidas (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.3 Evaluación del crecimiento en cultivos *batch*

Se llevaron a cabo cultivos *batch* de *B. tropica* para estudiar su crecimiento en el medio LGI modificado (Ver Anexo 2). Inóculos de 24 hs, obtenidos como se mencionó anteriormente, se centrifugaron a 10000 g por 20 minutos. El *pellet* de microorganismos se resuspendió en medio de cultivo y se usó para inocular los erlenmeyers donde se estudió la cinética de crecimiento (erlenmeyers de 1 litro con 250 ml de medio de cultivo, por duplicado). Los cultivos se incubaron a 30°C en agitación a 250 rpm. El crecimiento de los microorganismos se evaluó de forma indirecta por

medidas de Densidad Óptica del cultivo a 560 nm (DO_{560}). El volumen de resuspendido bacteriano utilizado se calculó teniendo en cuenta la DO_{560} final del mismo y una DO_{560} inicial de todos los cultivos de 0,05. La cinética de crecimiento de los microorganismos se evaluó por medidas de DO_{560} y pH en función del tiempo tomando muestras cada 1,5-2 hs hasta la fase estacionaria de crecimiento. Asumiendo que la cinética de crecimiento de los microorganismos se ajusta a un modelo de crecimiento exponencial según la ecuación 1, se aplicó el logaritmo natural (Ln) a los valores de DO_{560} para cada tiempo, se graficaron estos valores en función del tiempo y se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) como la pendiente de la recta en la fase exponencial de crecimiento.

$$X_f = X_o \cdot e^{(\mu \cdot t)} \quad (1)$$

X_f = biomasa final
 X_o = biomasa inicial
 μ = veloc. específica de crecimiento
 t = tiempo

Estos cultivos se realizaron con *B. tropica* en medio LGI modificando la fuente de carbono y energía (FCE), glucosa o glicerol (10 g/l), y la fuente de nitrógeno (FN), $(NH_4)_2SO_4$ (2,64 g/l) o extracto de levadura (EL) (1 g/l) (Figura 2.4). También se estudió la cinética de crecimiento de las cepas *B. tropica-gus* y *B. tropica-gfp* pero éstas se hicieron crecer en LGI con una sola composición: 10 g/l de glicerol y 1 g/l de EL. Se realizaron tres ensayos independientes de cada experimento. Los valores obtenidos a cada tiempo se promediaron y se utilizaron para realizar los gráficos de DO_{560} , $\ln(DO_{560})$ y pH en función del tiempo.

Medio	FCE (g/l)	FN (g/l)
1	Glicerol 10	EL 1
2	Glicerol 10	$(NH_4)_2SO_4$ 2,64
3	Glucosa 10	EL 1
4	Glucosa 10	$(NH_4)_2SO_4$ 2,64

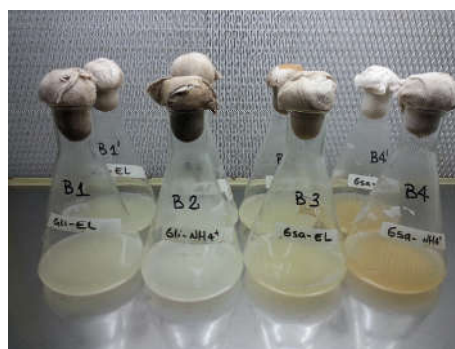


Figura 2.4 Variaciones en la FCE y en la FN de los medios LGI utilizados y cultivos de *B. tropica*.

2.2.4 Evaluación de la formación de *biofilm*

La capacidad de formación de *biofilm* de *B. tropica* fue evaluada por dos metodologías: 1- caracterización cuantitativa del *biofilm* formado en distintas superficies y medios de cultivo mediante la técnica de tinción con cristal violeta (O'Toole, 2011); 2- caracterización cualitativa del *biofilm* mediante técnicas microscópicas: microscopía de epi-fluorescencia (MEF) y microscopía de escaneo láser confocal (MELC) (Prieto *et al.*, 2013).

2.2.4 a - Caracterización cuantitativa del biofilm

En primera instancia se determinó el tiempo necesario para la adhesión irreversible de la bacteria a perlas de polipropileno ($\theta=4,2$ mm, $h=2$ mm; Petroken, Argentina) (Bosch *et al.*, 2000). Se utilizaron cultivos en medio LGI modificado, con 5 g/l de glicerol y 1 g/l de EL. Se colocaron 2 gramos de perlas de polipropileno en tubos de vidrio de 15 ml (20 tubos) se adicionó una suspensión bacteriana con una DO_{560} inicial de 0,2 hasta dejarlas completamente sumergidas y los tubos se llevaron a 30°C. Se realizaron blancos en los que se reemplazó el inóculo por agua destilada. A distintos tiempos (cada hora hasta las 7 hs) se tomaron 2 tubos, se descartó el medio con las bacterias no adheridas y se lavaron las perlas por inversión tres veces con PBS (por las siglas en inglés de *Phosphate Buffered Saline* o *buffer* fosfato salino) (8,01 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,78 g/l Na_2HPO_4 ; 0,27 g/l KH_2PO_4) a pH 6,00. Los tubos se llevaron a 60°C durante una hora y se realizó la tinción con cristal violeta que permite teñir a las bacterias y luego eluir el colorante con etanol para medirlo espectrofotométricamente, mediante el siguiente protocolo:

- Agregar una solución de cristal violeta 0,1% hasta cubrir la muestra para teñir a las bacterias.
- Dejar actuar por 15 minutos.
- Descartar el colorante excedente y lavar la muestra 3 veces con agua destilada.
- Dejar secar a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Eluir con 2 volúmenes de etanol 95% v/v.
- Después de 10 minutos, medir la DO_{590} del colorante eluido.

Este mismo procedimiento se realizó sobre la superficie a evaluar sin *biofilm* (Blancos sólo con medio de cultivo) para obtener un control de tinción negativo.

Se consideró que el tiempo necesario para que *B. tropica* se adhiriera irreversiblemente a las perlas de polipropileno fue aquel a partir del cual las medidas de DO_{590} del colorante eluido se incrementaron. Se realizaron tres ensayos independientes.

Luego, se estudió la formación de *biofilm* en dos superficies abióticas distintas: poliestireno y vidrio, y en distintos medios de cultivo.

Para el ensayo en poliestireno se utilizaron placas multipocillo estériles (Kartell). El medio de cultivo base utilizado fue el LGI, variando la calidad y la concentración de las FCE y FN, como se detalla en la tabla 2.4.

Medio	FCE (g/l)	FN (g/l)
1	Glucosa 5	EL 1
2	Glucosa 5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2,64
3	Glicerol 5	EL 1
4	Glicerol 15	EL 2
5	Glicerol 5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2,64

Tabla 2.4 Variaciones en la FCE y en la FN de los medios LGI utilizados.

Las placas se sembraron con cultivos de distinta DO₅₆₀ inicial (0,2 y 0,6) en cada uno de los medios de cultivos a evaluar. En cada pocillo, se sembraron 200 µl de cada cultivo (por triplicado) y sus correspondientes blancos, y se incubaron a 30°C. Durante las primeras horas (tiempo determinado por el ensayo de adhesión en perlas de polipropileno) la placa se incubó sin agitación, y luego se colocó en agitación a 100 rpm. A las 24 horas post-inoculación (PI), se realizó el recambio del medio de cultivo por medio fresco. A las 48 horas, la placa fue lavada tres veces con PBS, con el fin de eliminar las bacterias no adheridas a la superficie, y se llevó a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó la tinción con cristal violeta como fue detallada anteriormente. Se realizaron tres ensayos independientes, sembrando en cada uno seis pocillos de cada medio de cultivo y sus blancos.

Para el estudio de la formación de *biofilm* sobre una superficie de vidrio se utilizaron tubos previamente tratados con una solución de HCl, lavados y esterilizados. Cada tubo se inoculó con 3 ml de cultivo bacteriano en cada medio ensayado, con la DO₅₆₀ inicial determinada en el ensayo de placas multipocillo. Los tubos inoculados se incubaron a 30°C en forma estática durante las primeras horas, y luego en agitación a 100 rpm. A distintos tiempos y por triplicado para cada condición, se descartó el medio, y se lavó 3 veces con PBS. Se llevaron a 60°C durante 30 minutos, y se cuantificó la formación de *biofilm* mediante la tinción con cristal violeta. Se realizaron dos ensayos independientes cada uno con sus blancos. También se determinó de cada tubo el pH y la DO₅₆₀ en muestras finales del cultivo planctónico (aquel que está disperso en la fase líquida y no está adherido a ninguna superficie).

2.2.4 b - Caracterización de la formación de *biofilm* por técnicas microscópicas

Se evaluó el crecimiento en *biofilm* de *B. tropica-gfp* sobre portaobjetos de vidrio ubicados en placas de Petri y en tubos de polipropileno que contenían el medio LGI en el que se registró mayor formación de *biofilm* en los ensayos previos en tubos de vidrio. Los portaobjetos fueron lavados previamente con alcohol, con agua destilada y esterilizados. El sistema de cultivo empleado fue de tipo *batch* con una DO₅₆₀ inicial determinada en el ensayo de placas multipocillo y agitación de 100 rpm. Cuando se utilizaron placas de Petri, se agregaron diferentes volúmenes de medio con el

objetivo de mantener los portaobjetos completamente sumergidos (25 ml) o parcialmente sumergidos (10 ml). Durante las primeras horas luego de la inoculación (determinadas por el ensayo de adhesión) se llevaron a 30°C de forma estática para permitir la adhesión de las bacterias a la superficie y luego se agitaron a 100 rpm. Los portaobjetos fueron retirados a distintos tiempos para ser analizados por MEF. Cuando se utilizaron tubos de polipropileno se agregaron 15 ml de medio, quedando los portaobjetos parcialmente sumergidos. Los tubos se cerraron con tapones de algodón para permitir el paso de oxígeno. Durante las primeras horas luego de la inoculación, se llevaron a 30°C de forma estática y luego se agitaron a 100 rpm. Los portaobjetos fueron retirados a distintos tiempos para ser analizados por MEF y MELC. Los portaobjetos tanto de las placas de Petri y de los tubos de polipropileno se lavaron 3 veces con agua destilada, se cubrieron con agua destilada, se colocó el cubreobjetos y se sellaron con esmalte.

Las muestras se observaron en un microscopio de epi-fluorescencia Leica DM 2500 (Leica Microsystems; Heerbrugg, Germany) equipado con una cámara digital Leica DFC300 FX y en un microscopio confocal Leica SP5. Para la observación utilizando MELC, la longitud de onda de excitación fue de 488 nm (láser de argón). Se seleccionó una banda de emisión para detectar la proteína GFP entre 504-550 nm. Se utilizó un objetivo de 63,0 X oil UV y una apertura numérica de 1,40. Se obtuvieron imágenes en diferentes planos a través del eje z con intervalos de 0,99 μ m. Las imágenes obtenidas de los *stacks* (conjunto de imágenes consecutivas en el eje z) fueron analizadas utilizando los programas Leica Application Suite, ImageJ e Imaris para conformar la estructura tridimensional del *biofilm*. Para algunas muestras también se seleccionó una banda de emisión de 568-762 nm que no se solapaba con la banda de emisión de la GFP y permitió observar otros componentes estructurales del *biofilm*.

A los distintos tiempos también se analizaron mediante MEF muestras del cultivo planctónico.

Las imágenes que se muestran en los resultados se seleccionaron de aquellas obtenidas de 3 ensayos independientes realizados cada uno por triplicado.

2.2.5 Evaluación de la producción de enzimas

El estudio de la producción de enzimas líticas por *B. tropica* se realizó en medios sólidos y en medios líquidos. En medios sólidos se analizaron enzimas relacionadas con la rizocompetencia del microorganismo en estudio. En medios líquidos, se evaluó la producción de pectinasas y celulasas, enzimas también relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal. Por otro lado, se evaluó la producción de enzimas líticas en presencia de raíces de trigo y sorgo.

2.2.5 a – Evaluación de la actividad de enzimas líticas en medios sólidos

Se utilizaron medios de cultivo específicos para la determinación cualitativa de distintas actividades enzimáticas:

Celulasas: NaNO_3 0,2% p/v; K_2HPO_4 0,1% p/v; MgSO_4 0,05% p/v; KCl 0,05% p/v; peptona 0,02% p/v; CMC 0,2% p/v, agar 1,7% p/v.

Amilasas: almidón soluble 1% p/v; EL 0,2% p/v, peptona 0,5% p/v, MgSO_4 0,05% p/v; NaCl 0,05% p/v; CaCl_2 0,015% p/v; agar 2% p/v.

Lipasas: NaCl 0,5% p/v; CaCl_2 0,01% p/v; peptona 1% p/v; agar 2% p/v; tween 80 1% v/v.

Proteasas (medio agar-leche): leche descremada 5% p/v; agar 1% p/v.

Pectinasas: pectina cítrica 1% p/v; EL 0,2% p/v; peptona 0,5% p/v; MgSO_4 0,05% p/v; CaCl_2 0,015% p/v; NaCl 0,05% p/v; agar 2% p/v.

El pH de todos los medios se ajustó a 6,00, excepto en el medio para la detección de proteasas, el cual no se modificó por indicación del protocolo de preparación.

Se realizaron inóculos de *B. tropica* en medio LGI modificado con 10 g/l de glicerol y 1 g/l de EL como se describió anteriormente. Por otro lado, con el fin de que la inoculación en placa no incluyera medio de cultivo líquido, se centrifugó el cultivo y se resuspendió en la misma cantidad de agua destilada estéril. Se inocularon placas con el resuspendido bacteriano resultante. Además, se inocularon placas con *B. tropica* crecida en medio LGI sólido. Para ello, se tomó una anzada del cultivo en medio agarizado y se repicó en las placas con los medios específicos para la observación de la producción enzimática. Las placas se inocularon colocando 7 gotas de 20 μl de cultivo por placa y se llevaron a estufa a 30°C. El tiempo de cultivo y el revelado posterior se describen a continuación según enzima evaluada:

Celulasas: las placas inoculadas se llevaron a estufa a 30°C durante 5 días. El medio utilizado para la determinación de celulasas se reveló mediante la adición de rojo Congo 0,1% v/v. Se dejó secar el excedente de colorante durante 5 minutos, se lavó con NaCl 1 M (para desteñir la zona con actividad) y por último se agregó ácido acético al 0,5% v/v para bajar el pH (Teather y Wood, 1982). Las celulasas hidrolizan la celulosa a unidades de glucosa. Luego del revelado, el rojo Congo es absorbido por las largas cadenas de polisacáridos de CMC. Si el microorganismo utiliza como sustrato la CMC, alrededor de esa zona, no se absorbe el rojo Congo, por lo tanto se observará un halo claro, mientras que el medio se observa de un color marrón oscuro.

Amilasas: las placas inoculadas se colocaron en estufa a 30°C durante 24 a 48 hs. El revelado se realizó con una solución de I_2/I^- (1 g de I_2 + 5 g de IK en 330 ml de agua). El medio cambia de color con el agregado de la solución yodada, debido a que el almidón que no fue hidrolizado reacciona con el yodo para formar un complejo de color azul intenso. Con un resultado positivo se observa la

formación de un halo transparente alrededor de la colonia, en un medio color azul/violeta. (Fuwa, 1954).

Lipasas: las placas inoculadas se llevaron a estufa a 30°C durante 5 días. Las lipasas catalizan la hidrólisis de acilglicérols de cadena larga. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el *tween* 80 contenido en el medio de cultivo se observa la aparición de un precipitado alrededor de la colonia debido a la combinación de Ca^{+2} y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis, formándose monooleato de calcio (Samad *et al.*, 1989).

Proteasas: las placas inoculadas se llevaron a estufa a 30°C. Las mismas se observaron luego de las 24 y 48 hs de incubación. Las proteasas producen la hidrólisis de la caseína (proteína predominante de la leche). Las bacterias productoras de proteasas, degradan la caseína e incorporan los aminoácidos liberados en la hidrólisis. Con un resultado positivo, se observarían halos transparentes alrededor de las colonias, lo cual indicaría que se produjo la hidrólisis de la caseína (Walsh *et al.*, 1995).

Pectinasas: las placas inoculadas se colocaron en estufa a 30°C durante 5 días. Pasado ese tiempo, las placas se revelaron con la solución de I_2/I^- descrita anteriormente (Hankin *et al.*, 1971). La pectina reacciona con el yodo para formar un complejo color café (color del medio luego del revelado). Con un resultado positivo se observa la decoloración instantánea alrededor de la colonia.

2.2.5 b – Evaluación de la producción de enzimas líticas en medios líquidos

Para el estudio de las actividades enzimáticas de *B. tropica* en medios líquidos se utilizaron medios de cultivo con pectina cítrica (Parafarm) o cáscara de limón (CL) tamizada (retenida en *mesh* 16, $\varnothing=1,19$ mm) para el estudio de pectinasas, y carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma) o afrecho de trigo para el estudio de actividad celulasa. La CL es una fuente natural de pectina y el afrecho es una fuente natural de celulosa. El medio de cultivo base utilizado fue el LGI y se modificó en cada caso la FCE y la FN, como se detalla en la Tabla 2.5. En todos los casos la concentración de FCE fue 10 g/l, la de EL fue 1 g/l y la de $(NH_4)_2SO_4$ fue 2,64 g/l.

Medida de actividad pectinasa			Medida de actividad celulasa		
Medio	FCE	FN	Medio	FCE	FN
1	Pectina	-	10	Afrecho	-
2	Pectina	EL	11	Afrecho	EL
3	Pectina	$(NH_4)_2SO_4$	12	Afrecho	$(NH_4)_2SO_4$
4	Glicerol + Pectina	EL	13	Glicerol + Afrecho	EL
5	Glicerol	EL	14	Glicerol	EL
6	CL	-	15	CMC	-
7	CL	EL	16	CMC	EL
8	CL	$(NH_4)_2SO_4$	17	CMC	$(NH_4)_2SO_4$
9	Glicerol + CL	EL	18	Glicerol + CMC	EL

Tabla 2.5 Variación de las FCE y FN utilizadas para la preparación de los medios de cultivo.

Se realizaron inóculos como se mencionó anteriormente en medio LGI modificado con 10 g/l de glicerol y 1 g/l de EL. Los cultivos crecidos se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de agua destilada estéril. Los medios detallados en la Tabla 2.5 fueron inoculados con el resuspendido bacteriano, con una DO_{560} inicial calculada de 0,05 y fueron colocados en agitación a 200 rpm, a 30°C. Luego de la inoculación de los medios, se tomaron muestras de cada cultivo en condiciones de esterilidad a distintos tiempos y se midió a cada muestra pH y DO_{560} . Además, en los mismos tiempos, se tomó una muestra de cada uno de los cultivos, se centrifugó y se guardó el sobrenadante a -20°C para la posterior medida de actividad enzimática por el método de Somogyi Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) realizado sobre las muestras. Los compuestos reductores generados a partir de la ruptura de la pectina o la celulosa (ácido galacturónico o glucosa, respectivamente) son capaces de reducir los iones Cu^{+2} del reactivo de Somogyi en iones Cu^{+} , que al reaccionar con el ácido arseno-molibdico del reactivo de Nelson produce compuestos coloreados, que se miden espectrofotométricamente.

Las medidas se realizaron por triplicado, tanto para las muestras como para cada sus blancos. El protocolo del método fue el siguiente:

- Agregar 150 μ l de sustrato en tubos de vidrio de 5 ml.
- Adicionar a cada tubo 50 μ l de extracto enzimático (solo a los tubos de muestra, no a los blancos)
- Incubar a 37°C durante 1 hora
- Colocar en baño de agua con hielo
- Agregar 200 μ l de reactivo de Somogyi
- Agregar la muestra correspondiente a cada blanco
- Colocar en agua en ebullición durante 10 minutos y luego enfriar inmediatamente en baño con agua con hielo
- Agregar 200 μ l de reactivo de Nelson
- Dejar reposar unos minutos a temperatura ambiente
- Adicionar 2 ml de agua destilada
- Agitar bien los tubos y medir DO a 660 nm

El sustrato de reacción utilizado para las medidas de actividad pectinasa fue ácido poligalacturónico (APG) 0,2% p/v en *buffer* BCP (por las siglas en inglés de *Borate-Citrate-Phosphate buffer*) a pH 6,50; mientras que en el caso de la actividad celulasa, se utilizó como sustrato CMC 0,2% p/v en *buffer* BCP a pH 6,50. Se realizó para cada caso la puesta a punto de las medidas de actividad pectinasa y celulasa y las curvas de calibración con ácido galacturónico y glucosa, productos de la lisis de los sustratos utilizados (Ver Anexo 2). Se realizaron 2 ensayos independientes de cada experimento.

Se midió la actividad pectinasa de las muestras tomadas a las 10, 16 y 36 horas PI. Se definió la unidad enzimática (U/ml) como la cantidad en enzima que libera el equivalente a un μmol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones de reacción. A partir de los datos obtenidos de absorbancia a 660 nm para las muestras, se calculó para cada una de las muestras la concentración de ácido galacturónico correspondiente (ppm). De la colorimetría se obtuvieron datos en unidades de $\mu\text{g/ml}$. Se calculó la actividad enzimática mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{\text{ml}} = \frac{\text{ppm}}{212,1} * 0,2 * \frac{1}{60} * \frac{1000}{50} * D$$

Siendo 212,1 el peso molecular del ácido galacturónico en $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$, 0,2 ml el volumen de reacción, 60 el tiempo de incubación en minutos, 50 μl el volumen de extracto enzimático y D la dilución realizada a las muestras.

Por otro lado, se realizó la liofilización de las muestras utilizadas para obtener mayores valores de actividad pectinasa. Los cultivos se realizaron como fue mencionado anteriormente (por duplicado), y a las 18 horas se tomaron muestras para medir DO_{560} y pH con el fin de corroborar el crecimiento de cada uno de los cultivos y se centrifugaron todos los medios a 14000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se dividió en frascos conteniendo 15 ml cada uno (por triplicado), y se guardaron a -80°C para luego ser liofilizados en un liofilizador (L-3 Rificor) durante 3 días. Una vez liofilizados los sobrenadantes, se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril, y se midió actividad enzimática con el método de Somoygi-Nelson, como se detalló anteriormente.

Para la medida de actividad celulasa, se midió la actividad en las muestras tomadas a las 10, 16 y 36 hs. Con los datos obtenidos se calculó la concentración de glucosa correspondiente para cada muestra. Se definió la unidad enzimática (U/ml) como la cantidad en enzima que libera el equivalente a un μmol de glucosa por minuto en las condiciones de reacción. Los datos obtenidos a partir de la colorimetría se encontraron expresados en $\mu\text{g/ml}$. Se calculó la actividad enzimática según la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{\text{ml}} = \frac{\text{ppm}}{180} * 0,2 * \frac{1}{60} * \frac{1000}{50} * D$$

Siendo 180 el peso molecular de la glucosa en $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$, 0,2 ml el volumen de reacción, 60 minutos el tiempo de incubación, 50 μl el volumen de extracto enzimático y D la dilución realizada a las muestras.

2.2.5 c – Evaluación de la producción de enzimas líticas en sistemas con plantas

El inóculo fue realizado como se menciona anteriormente, en LGI con 10 g/l de glicerol y 1 g/l de EL. Los cultivos crecidos se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua destilada estéril. Se utilizaron semillas de trigo variedad Baguette 9 (Nidera semillas) y semillas de sorgo variedad Energía (KWS), y se desinfectaron superficialmente, mediante un protocolo explicado en detalle posteriormente. Las semillas desinfectadas, se colocaron en placas de Petri con agar nutritivo (Tabla 2.6) y se dejaron germinar durante 48 horas a 30°C, con el objetivo de poder seleccionar aquellos brotes que no presentaran contaminación luego de la desinfección de las semillas. De esta forma se aseguró que no hubiera microorganismos contaminantes capaces de presentar actividad enzimática.

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de carne	3
Peptona	5
Agar	15

Tabla 2.6 Composición del agar nutritivo.

Se colocaron 100 ml de solución líquida de Fåhreaus (Fåhreaus, 1957) a pH 6,00 (Tabla 2.7) en frascos de vidrio y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos, tapados con gasa y papel.

Componente	Concentración (g/l)							
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Solución A-Z</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H₃BO₃ 0,31</td> </tr> <tr> <td>ZnSO₄.7H₂O 0,05</td> </tr> <tr> <td>CuSO₄.5H₂O 0,22</td> </tr> <tr> <td>KCl 0,041</td> </tr> <tr> <td>NaMoO₄ 0,01</td> </tr> </tbody> </table>	Solución A-Z	H ₃ BO ₃ 0,31	ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,05	CuSO ₄ .5H ₂ O 0,22	KCl 0,041	NaMoO ₄ 0,01
Solución A-Z								
H ₃ BO ₃ 0,31								
ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,05								
CuSO ₄ .5H ₂ O 0,22								
KCl 0,041								
NaMoO ₄ 0,01								
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12							
KH ₂ PO ₄	0,1							
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,15							
Citrato férrico	0,005							
Solución A-Z	2 ml							

Tabla 2.7 Composición de la solución de Fåhreaus (Fåhreaus, 1957).

Como soporte para las semillas, se utilizaron planchas de poliestireno expandido, que se cortaron en círculos que entraran en los frascos con solución de Fåhreaus, y a las que se les realizaron orificios por donde pasarían las raíces cuando las semillas germinadas se apoyaran sobre los soportes. Como los soportes de poliestireno no podían ser esterilizados por autoclave, se desinfectaron sumergiéndolos durante media hora en etanol 96% v/v, y luego mediante luz UV, siendo cada lado del soporte expuesto durante 20 minutos. Los frascos con soportes fueron inoculados con el resuspendido bacteriano para obtener una DO₅₆₀ inicial de 0,2. Luego de inoculados los frascos, se colocaron las semillas germinadas sobre los soportes, pasando las raíces a través de los orificios

realizados previamente, para que las mismas tuvieran contacto con la solución de Fåhræus. En cada frasco se colocaron 7 semillas germinadas no contaminadas, como se observa en la Figura 2.5 A. Se realizaron controles negativos con frascos no inoculados con semillas de trigo y sorgo y frascos inoculados sin semillas.

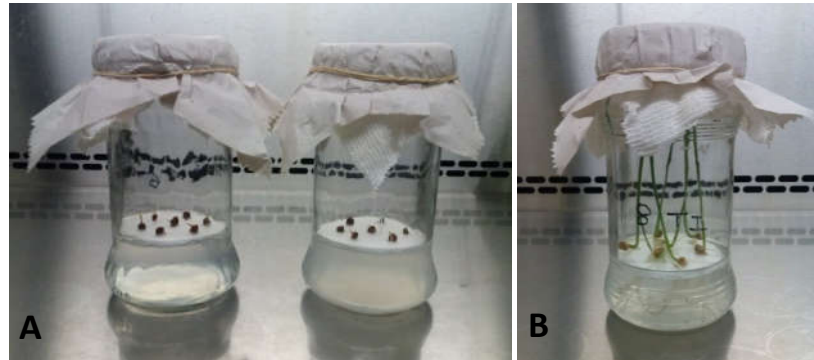


Figura 2.5 Sistema de cultivo de plantas para la medición de actividad enzimática. Izquierda: medio no inoculado. Derecha: medio inoculado **(A)**. Plantas de trigo de 7 días en el sistema de cultivo **(B)**.

Los frascos se colocaron en agitación a 120 rpm en condiciones de luz y temperatura controladas (ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 26°C) en cámara de cultivo. A distintos días PI, en condiciones de esterilidad, se tomó por duplicado 1 ml de suspensión de cada frasco, se centrifugó y se guardó el sobrenadante a -20°C, para medir actividad enzimática mediante el método de Somogyi-Nelson, como se detalló anteriormente. Para la cuantificación de la población bacteriana tanto endofítica como superficial en raíces se empleó el recuento bacteriano en placa (explicado en detalle en el Capítulo 4) a los 7 días PI (Figura 2.5 B). Se realizaron dos ensayos independientes.

Los macerados de las raíces se guardaron a -20°C hasta la medida de actividad enzimática pectinasa y celulasa en el sobrenadante. Las muestras se centrifugaron con el fin de obtener los sobrenadantes de las mismas, a los que le les realizaría la medición de actividad enzimática. Las medidas de actividad fueron llevadas a cabo como se detalló anteriormente.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente capítulo, se describen los ensayos que permitieron evaluar características de *B. tropica* relacionadas con la rizocompetencia tales como la capacidad de formar *biofilm*, implicada en la colonización del rizoplasma, y la producción de enzimas líticas, que además le permiten al microorganismo ingresar a los tejidos internos de las plantas de forma activa. Se evaluó el crecimiento de *B. tropica* en cultivos *batch* en medios con distinta composición y se comparó el crecimiento de *B. tropica* con dos variantes isogénicas marcadas con genes reporteros que serán utilizadas en este trabajo. Se determinó la capacidad de formación de *biofilm* de *B. tropica* creciendo en distintos medios de cultivo y en dos tipos de superficie abiótica mediante la tinción con cristal violeta. Se analizó la estructura del *biofilm* mediante MEF y MELC empleando la cepa *B. tropica-gfp*. Se analizó la producción de enzimas líticas del microorganismo en estudio en medios sólidos. Se determinó la actividad pectinasa y celulasa en cultivos líquidos con diferentes sustratos, y en un sistema de crecimiento del microorganismo en presencia de raíces de trigo y sorgo, sin FCE ni FN.

2.3.2 Crecimiento de *B. tropica* en medios líquidos

B. tropica fue capaz de crecer y alcanzar en 48 hs una concentración bacteriana final del orden de 1.10^9 UFC/ml en los medios líquidos con todas las FCE y FN evaluadas. En la Figura 2.6 se observa el crecimiento de *B. tropica* en medio LGI agarizado donde se hicieron los recuentos bacterianos, mostrando la forma y el aspecto de las colonias características de este microorganismo creciendo en este medio: colonias circulares, blanquecinas y mucosas.

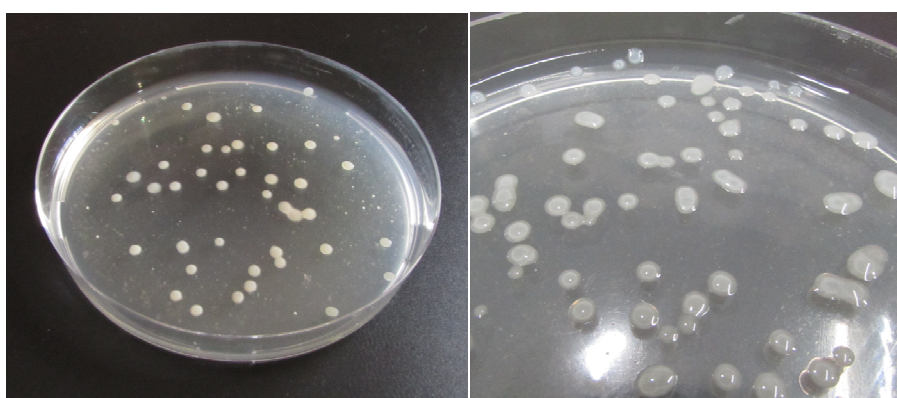


Figura 2.6 Colonias de *B. tropica* en medio LGI.

En la Figura 2.7 se muestran las curvas de crecimiento de *B. tropica* que se obtuvieron cuando se hizo crecer en el medio LGI modificando la FCE y la FN.

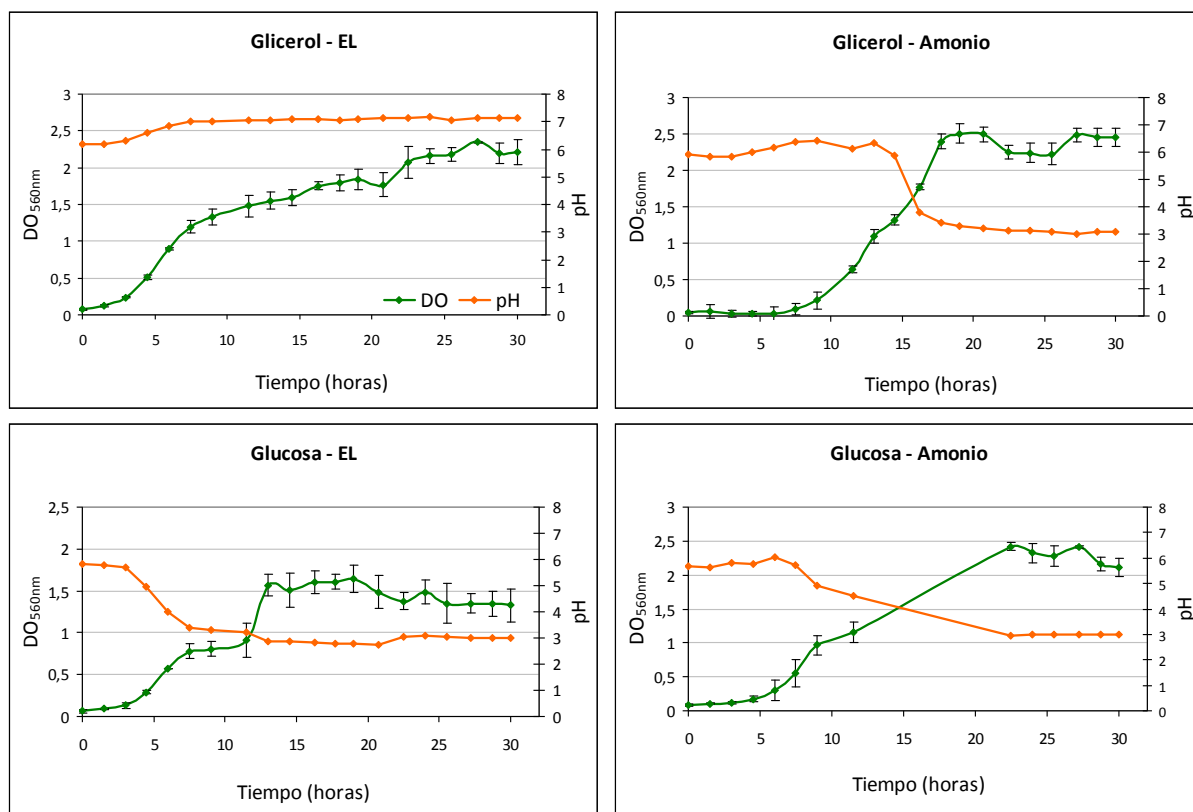
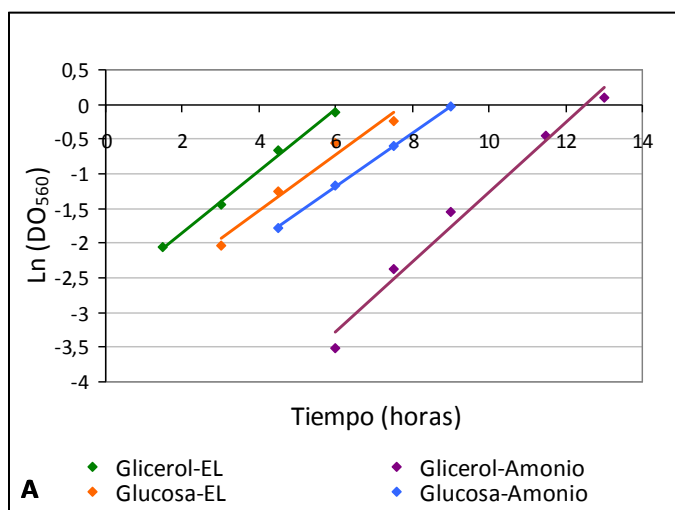


Figura 2.7 Curvas de crecimiento de *B. tropica* en cultivos *batch* en el medio LGI modificando la FCE y la FN. Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en tres ensayos independientes.

En todos los cultivos el pH disminuyó alcanzando valores cercanos a 3,00 después de 20 hs de crecimiento en todos los cultivos excepto en cultivos con glicerol y EL. En esta última condición de cultivo el pH incrementó hasta 7,00 en las primeras horas de cultivo y se mantuvo constante hasta el final del experimento. Cuando la FN fue $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el pH descendió, ya que por cada amonio que ingresa a la célula se expulsa un H^+ al medio extracelular para mantener constante el pH intracelular. Cuando *B. tropica* creció con glucosa y EL también se registró el descenso del pH, pero probablemente por la producción de ácidos orgánicos.

Para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) se calculó el Ln de los valores de DO₅₆₀ obtenidos, se graficó en función del tiempo (Figura 2.8 A) con el fin de determinar los valores que corresponden a la fase de crecimiento exponencial del microorganismo para cada cultivo (fase lineal en la curva de Ln DO₅₆₀ vs tiempo) y de la pendiente de esta recta se determinó este parámetro cinético (Figura 2.8 B). Los valores de μ más elevados se encontraron en los medios con EL como FN.

**B**

Medio	Veloc. específica de crecimiento (μ) (h^{-1})
1 Glicerol – EL	$0,44 \pm 0,04$
2 Glicerol - Amonio	$0,34 \pm 0,03$
3 Glucosa – EL	$0,42 \pm 0,04$
4 Glucosa - Amonio	$0,31 \pm 0,05$

Figura 2.8 Logaritmo natural de la DO_{560} en función del tiempo de los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento **(A)**, utilizados para la determinación de las velocidades específicas de crecimiento en cada medio de cultivo **(B)**.

Las velocidades específicas de crecimiento de *B. tropica* fueron menores cuando la fuente de nitrógeno empleada fue $(NH_4)_2SO_4$ y los cultivos con EL alcanzaron una velocidad específica de crecimiento significativamente superior para las dos fuentes de C empleadas, poniendo en evidencia que el EL le provee al microorganismo aminoácidos ya sintetizados posibilitando una multiplicación más rápida.

Con estos resultados se evidencia que *B. tropica* fue capaz de crecer en medio líquido utilizando glucosa o glicerol como FCE y sulfato de amonio o EL como FN con velocidades específicas promedio de $0,37 h^{-1}$, enmarcándola dentro del grupo de microorganismos de crecimiento rápido (Ertola *et al.*, 2000), alcanzando concentraciones finales del orden de 10^9 UFC/ml. Con la idea de utilizar este microorganismo como inoculante en cultivos agrícolas, ambas características resultan interesantes. En este sentido, es deseable también que el microorganismo crezca en un medio de cultivo en el cual no sólo se pueda obtener una elevada concentración del mismo en tiempos cortos sino que se encuentren al final del cultivo en un óptimo estado fisiológico, ya que deberán sobrevivir en el envase y posteriormente en la semilla hasta que logren multiplicarse. En el medio con glicerol y EL es donde *B. tropica* crece sin cambios considerables de pH y éste se mantiene cercano a la neutralidad hasta el final del cultivo, otra característica positiva ya que no es conveniente inocular las semillas con suspensiones de microorganismos que tengan un pH ácido (pH final cercano a 3,00 para el resto de los cultivos ensayados). En estas condiciones también destinaría menos FCE para mantenerse (está menos estresado) una vez envasado, ya que se encuentra cerca de su pH óptimo de crecimiento (Reis *et al.*, 2004).

2.3.1 Crecimiento en medio líquido de las variantes isogénicas de *B. tropica*

Se obtuvieron cuatro colonias de *B. tropica* marcada con el gen reportero *gfp*, que crecieron en medio con Tc. Se seleccionó una de ellas para evaluar la estabilidad del plásmido, y se determinó que la cepa presentó una elevada estabilidad en el tiempo, manteniendo los plásmidos incorporados por más de 80 generaciones (ver Anexo 2). Este aislamiento se seleccionó para continuar con los posteriores ensayos, y correspondió a la cepa *B. tropica-gfp*.

La introducción de marcadores moleculares en microbiología se realiza con el objetivo de llevar a cabo ciertos estudios con el microorganismo en el que fueron introducidos y, por lo tanto, no deberían afectar el comportamiento o las características del mismo. No obstante, antes de realizar estudios con las variantes isogénicas marcadas con los genes reporteros *gfp* y *gus*, previamente se hicieron estudios comparativos para verificar que ambas tenían el mismo comportamiento que la cepa salvaje, para entonces poder considerarlas como equivalentes. Se estudió el comportamiento en cultivos líquidos y se hicieron ensayos de co-inoculación en plantas de tomate, como se detallará en el Capítulo 4.

Al estudiar la cinética de crecimiento, los patrones de crecimiento de la cepa salvaje y sus variantes isogénicas marcadas con los genes *gfp* y *gus* fueron similares en el medio de cultivo ensayado, obteniéndose concentraciones finales del orden de 1.10^9 UFC/ml luego de 30 horas de cultivo. En la Figura 2.9 se muestran las gráficas de DO_{560} vs tiempo, y del $\ln DO_{560}$ en función del tiempo de la fase exponencial de crecimiento que se utilizaron para determinar las velocidades específicas de crecimiento en cada medio de cultivo (Tabla 2.8).

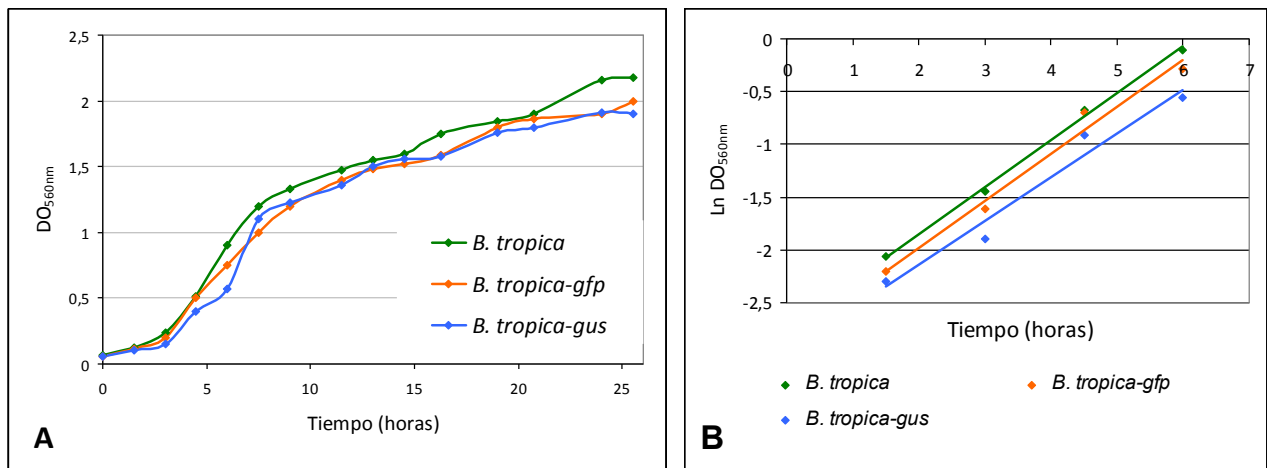


Figura 2.9 Curvas de crecimiento de *B. tropica*, *B. tropica-gfp* y *B. tropica-gus* (A) y $\ln DO_{560}$ en función del tiempo de los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (B), utilizados para la determinación de las velocidades específicas de crecimiento. Cada punto es el promedio de los valores obtenidos en tres ensayos independientes.

Cepa	Veloc. específica de crecimiento (μ) (h^{-1})
<i>B. tropica</i>	0,44 \pm 0,04
<i>B. tropica-gfp</i>	0,44 \pm 0,05
<i>B. tropica-gus</i>	0,42 \pm 0,07

Tabla 2.8 Velocidades específicas de crecimiento de las cepas estudiadas.

B. tropica y sus variantes isogénicas marcadas con los genes reporteros *gfp* y *gus* tuvieron el mismo comportamiento en cultivos líquidos, dato necesario para poder realizar estudios posteriores.

2.3.3 Evaluación de la formación de *biofilm*

Los *biofilms* se pueden definir como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de EPS y otros componentes, adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, donde están protegidos de las condiciones adversas del medio externo. El tipo de *biofilm* formado depende del microorganismo, de la superficie y de la composición del medio de cultivo, entre otras características (Tomaras *et al.*, 2003). Inicialmente, para determinar la capacidad de formación de *biofilm* de un microorganismo es común evaluar el proceso sobre superficies abióticas (Tomaras *et al.*, 2003). Por lo tanto, y debido a que no se han reportado hasta el momento estudios de este proceso en *B. tropica*, surgió como válida la evaluación de la capacidad de crecer formando *biofilms* en superficies abióticas como primer paso en su caracterización como PGPB. Para evaluar la capacidad de *B. tropica* de formar *biofilm* se hizo crecer el microorganismo en distintos medios de cultivo, en los que se modificó la relación C/N para favorecer la producción de EPS, y sobre distintas superficies.

2.3.3 a - Evaluación cuantitativa de la formación de *biofilm*

Se evaluó la adhesión de *B. tropica* a perlas de polipropileno ya que de esta forma se dispone de una elevada superficie expuesta. Se hizo crecer en medio LGI con glicerol y EL, ya que cuando *B. tropica* crece en este medio el pH se mantiene cercano a la neutralidad (resultados mostrados antes en este capítulo, en la Figura 2.7) y, por lo tanto, el EPS producido será hidrolizado en menor medida (Yan *et al.*, 2009). A distintos tiempos de incubación las perlas se tiñeron con cristal violeta y se observó la presencia del colorante debido a la biomasa adherida obteniéndose un marcado incremento de color a las 4 hs (Figura 2.10). Se tomó este tiempo como el necesario para que las bacterias se adhieran eficientemente a esta superficie abiótica.

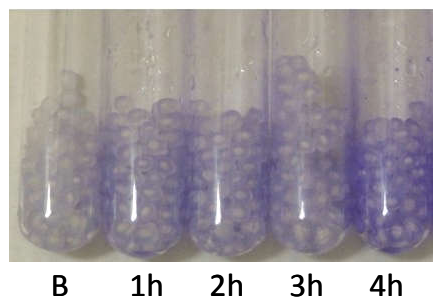


Figura 2.10 Adhesión a perlas de polipropileno a los distintos tiempos ensayados. B = blanco.

El seguimiento de la formación de *biofilm* se realizó en placas multipocillo y se cuantificó por la técnica de cristal violeta ensayando dos concentraciones de inóculo: DO_{560} inicial de 0,2 y 0,6, con los siguientes medios de cultivo:

Medio	FCE (g/l)	FN (g/l)
1	Glucosa 5	EL 1
2	Glucosa 5	$(NH_4)_2SO_4$ 2,64
3	Glicerol 5	EL 1
4	Glicerol 15	EL 2
5	Glicerol 5	$(NH_4)_2SO_4$ 2,64

Para ambas concentraciones iniciales los resultados fueron similares y, en ambos casos, se observó que solo se formó un *biofilm* en anillo en la región de la interfase líquido-aire de los pocillos que fueron inoculados con los medios de cultivo 2 (DO_{590} : $1,0 \pm 0,1$) y 5 (DO_{590} : $1,4 \pm 0,2$) (Figura 2.11). Estos resultados no fueron los esperados ya que se observó producción de *biofilm* en dos de los medios en los que el pH alcanzó valores inferiores a 3,00 (extrapolando los datos obtenidos en los cultivos en erlenmeyer) donde el EPS generalmente se hidroliza y contribuiría en menor medida a la formación de *biofilm*. La característica común de ambos medios de cultivo no era la FC sino la FN, siendo posible que debido a ello fueran diferentes las interacciones de *B. tropica* con la superficie de polipropileno.

En todos los ensayos posteriores de evaluación de la formación de *biofilm* se utilizó una DO_{560} inicial de 0,2 ya que los resultados fueron más reproducibles que los de DO_{560} de 0,6.



Figura 2.11 *Biofilm* formado por *B. tropica* en placas multipocillo: placa en la que se observan los blancos (A); pocillos de los cultivos con glucosa-amonio (B) y glicerol-amonio (C).

Al analizar la capacidad de crecimiento en *biofilm* en tubos de ensayo de vidrio con los 5 medios de cultivo detallados anteriormente se observó que luego de 24 hs de incubación a 30°C los tubos con los medios con glicerol y EL (Medios 3 y 4) presentaron formación de *biofilm* en la interfase líquido-aire (Figura 2.12 A). A las 48 hs de incubación a 30°C se observó mayor formación de *biofilm* en esos mismos medios y también la aparición de un anillo de crecimiento en los medios de cultivo con NH_4^+ (Medios 2 y 5) (Figura 2.12 B).

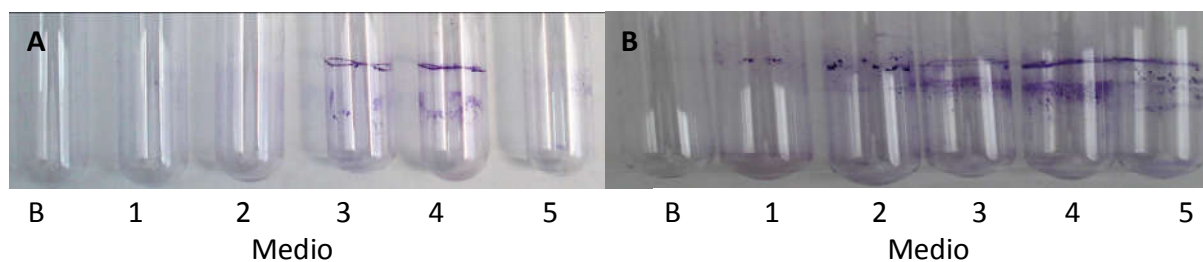
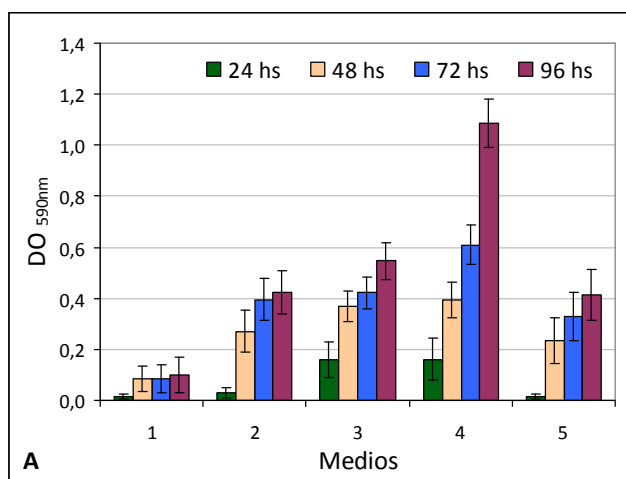


Figura 2.12 *Biofilm* formado por *B. tropica* en tubos de vidrio con los distintos medios, incubados a 30°C por 24 hs (A) y 48 hs (B).

Durante este ensayo la DO_{560} final de la contraparte planctónica en equilibrio con el *biofilm* alcanzó los mismos valores que aquellos obtenidos para estos mismos cultivos en erlenmeyer como se mostró previamente (Figura 2.7) al igual que el pH: los únicos medios en los que este se mantuvo cercano a 7,00 fueron aquellos con glicerol y EL (3 y 4). Con los datos obtenidos a los distintos tiempos se analizó la cinética de crecimiento del *biofilm* (Figura 2.13 A). Se observó que a tiempos mayores los medios con glicerol y EL (medios 3 y 4) seguían mostrando mayor formación de *biofilm* y al tiempo final del ensayo la mayor formación de *biofilm* se registró en el medio 4, medio con mayor relación C/N que favorece la formación de EPS. Estudios realizados en paralelo a este trabajo en el grupo de Microorganismos de Aplicación en la Agricultura en otra tesis de estudio, mostraron que en el medio 4 se observó una mayor producción de EPS (datos aún no publicados) que podría estar involucrado en el desarrollo del *biofilm*, tal como ocurre para otros microorganismos, y favorecer su formación. En la Figura 2.13 B se muestran los valores de μ de las células sésiles (aquellas que forman el *biofilm*) calculados de las pendientes de las curvas de Ln de DO_{590} en función del tiempo.



B

Medio	Veloc. específica de crec. (μ (h-1))
1	0,037
2	0,053
3	0,020
4	0,027
5	0,064

Figura 2.13 Evaluación cuantitativa de la formación de *biofilm* en distintos medios de cultivo en función del tiempo (A). Determinación de la velocidad de crecimiento de células creciendo en *biofilm* en los distintos medios de cultivo (B).

Mediante la técnica de cuantificación con cristal violeta, el cálculo de la velocidad de crecimiento de las células sésiles dio un valor diez veces menor que células planctónicas cultivadas en medio líquido. Una de las características que se registran para los microorganismos que forman *biofilm* es que las células sésiles poseen una velocidad de crecimiento alterada respecto a las células planctónicas (Prieto *et al.*, 2013).

Con este ensayo se pudo determinar que *B. tropica* fue capaz de desarrollar *biofilm* sobre diversas superficies tales como poliestireno y vidrio, sobre vidrio se seleccionó un medio de cultivo que permitió una mayor formación de *biofilm*, y su formación predomina en la interfase líquido-aire. Muchos microorganismos, incluso cepas de *Burkholderia* spp. pertenecientes al complejo BCC, se caracterizan por formar *biofilms* en el fondo de las cubetas o en profundidad, y esta característica no está solo relacionada a su microaerofilia sino también a otras propiedades del *biofilm* que dependen principalmente del medio de cultivo, ya que por ejemplo, el agregado de aminoácidos a un medio de cultivo base hace que estas cepas dejen de formar un *biofilm* en anillo y lo formen en profundidad (comunicación personal Dra. Alejandra Bosch, CINDEFI-CONICET-UNLP). Las bases de este fenómeno aún no han sido completamente dilucidadas. No obstante, el desarrollo de *biofilm* en la interfase líquido-aire muestra también que *B. tropica* tiene requerimientos significativos de oxígeno para crecer y formar *biofilms* en las condiciones estudiadas.

Teniendo en cuenta que la evaluación de la formación de *biofilm* mediante técnicas microscópicas se realizaría sobre portaobjetos de vidrio, se seleccionó el medio 4 (medio con 15 g/l de glicerol y 2 g/l de EL) para la realización de los ensayos posteriores de caracterización cualitativa de la formación de *biofilm* ya que en este medio *B. tropica* presentó mayor formación de *biofilm*.

2.3.3 b - Evaluación de la formación de *biofilm* por microscopía

Para estudiar en forma preliminar la formación de *biofilm*, se realizaron ensayos sobre portaobjetos de vidrio parcial y totalmente sumergidos en medio de cultivo inoculado con *B. tropica-gfp* en placas de Petri: 1- en los sumergidos totalmente se observaron bacterias fluorescentes adheridas a la superficie, pero sin la formación de estructuras organizadas (Figura 2.14 A), resultado que coincide con aquellos obtenidos con CV en tubos de vidrio en los que no se observó formación de *biofilm* en profundidad; 2- en los sumergidos parcialmente se observó a las 24 hs una gran cantidad de bacterias fluorescentes ordenadas y adheridas a la superficie, correspondiendo probablemente al inicio de la formación del *biofilm* en una superficie líquido-aire; a las 48 hs se observó una mayor cantidad de bacterias agrupadas con un ordenamiento mayor; a las 72 hs las bacterias se encontraron formando agregados, rodeadas de un material denso que podría formar parte de la matriz del *biofilm* (Figura 2.14 B, C y D, respectivamente).

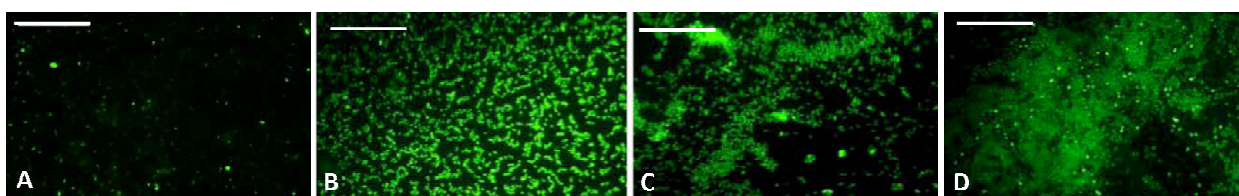


Figura 2.14 Imágenes de MEF de *B. tropica-gfp*: crecida sobre portaobjetos totalmente sumergidos por 48 hs (A); crecida sobre portaobjetos parcialmente sumergidos por 24 (B), 48 (C) y 72 hs (D). Barra: 20 μ m.

Para caracterizar la estructura del *biofilm* y tener una mejor reproducibilidad del ensayo, se evaluó su formación en portaobjetos de vidrio parcialmente sumergidos en medio de cultivo inoculado con *B. tropica-gfp* en tubos de polipropileno (Figura 2.15), como así también su contraparte planctónica.

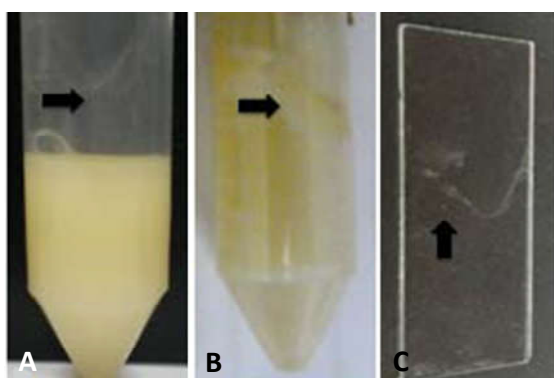
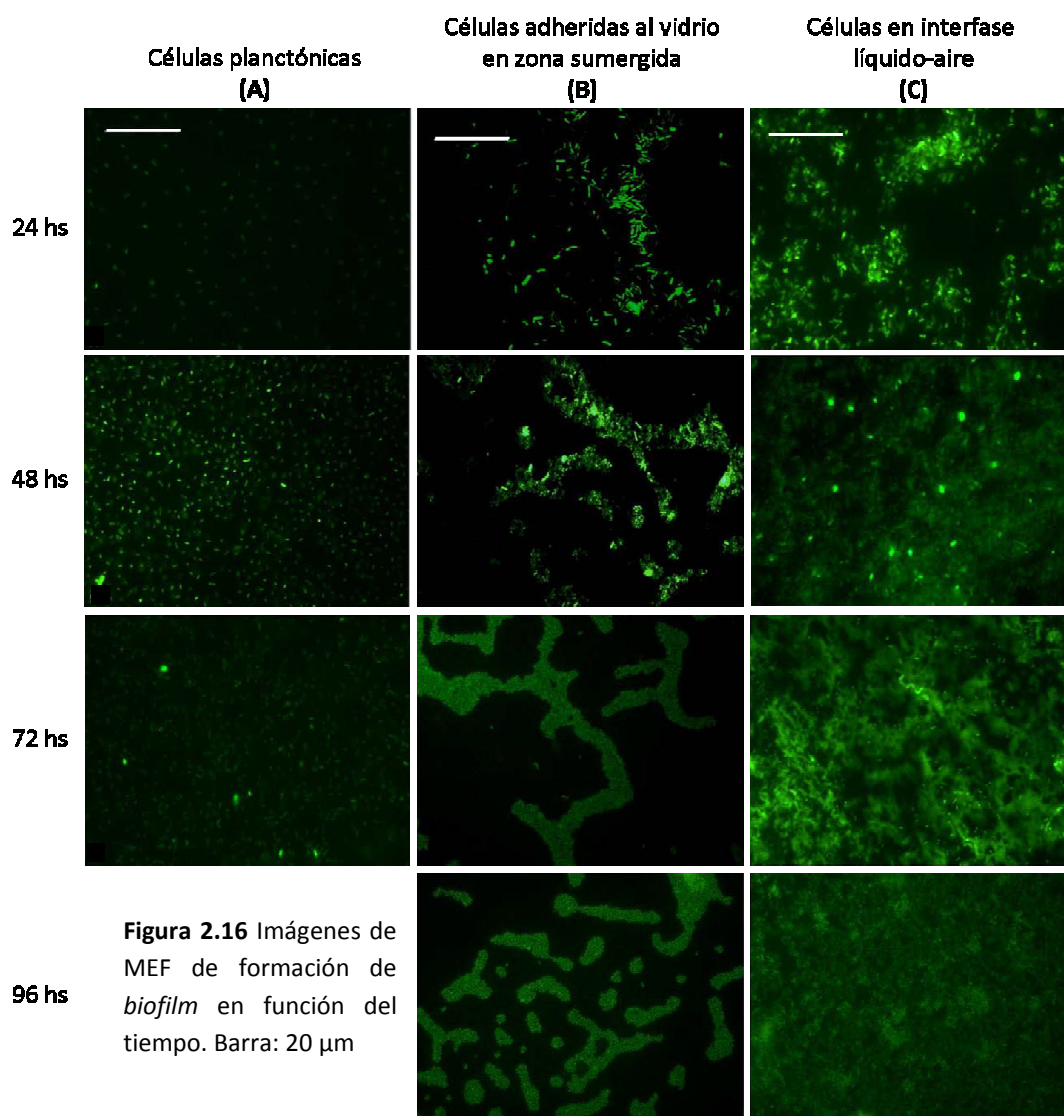


Figura 2.15 Cultivos de *B. tropica-gfp* de 48 (A) y 120 hs (B). Las flechas indican la formación de *biofilm* en la interfase líquido-aire tanto en las paredes del tubo como en el portaobjeto (C).

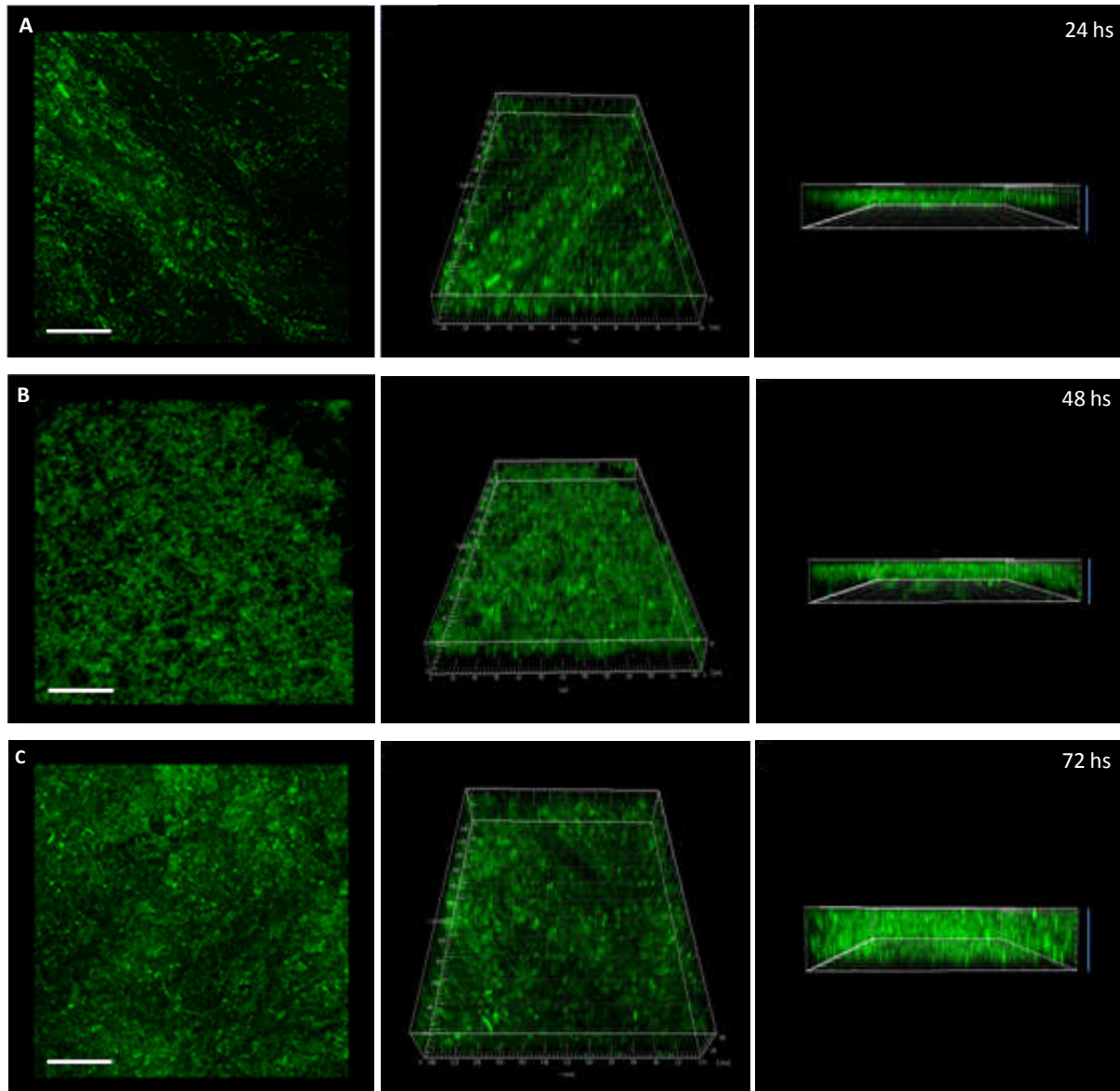
La Figura 2.16 muestra comparativamente las imágenes del MEF obtenidas del cultivo planctónico (Figura 2.16 A), de la zona sumergida inmediata inferior a la zona de interfase líquido-aire (Figura

2.16 B) y la zona de interfase líquido-aire (Figura 2.16 C). Se pudo observar nuevamente el crecimiento del *biofilm* en la interfase aire-líquido.



Las células planctónicas se encontraron dispersas, sin formar agregados (Figura 2.16 A). En la interfase líquido-aire (Figura 2.16 C) se pudieron observar las diferentes etapas de formación del *biofilm*: a las 24 hs se observaron las bacterias más ordenadas que en la contraparte planctónica y formando microagregados como un primer paso en la formación del *biofilm*; a las 48 hs la densidad celular aumentó considerablemente y las bacterias no pudieron distinguirse en forma individual ya que se encontraban inmersas en un material extracelular, que se puede interpretar como la matriz del *biofilm*. El *biofilm* continuó creciendo y a las 72 hs se observó mucho más estructurado. A las 96 hs se observó un *biofilm* homogéneo que cubrió toda la superficie (Figura 2.16 C). En este tipo de ensayo la interfase no es estática sino que fluctúa ya que el cultivo está agitado y tal vez las imágenes de la Figura 2.16 B corresponden a *biofilms* en formación.

También se analizaron las muestras por MELC y se pudo observar el crecimiento del *biofilm* en función del tiempo. Este tipo de microscopía permite obtener imágenes de gran calidad y capturar los distintos planos del *biofilm* para poder observar el tamaño y la estructura tridimensional. Seleccionando una banda de emisión entre 504-550 nm correspondiente a la banda de emisión de la GFP se observan específicamente las bacterias marcadas formando el *biofilm*. Las imágenes obtenidas y procesadas con los programas correspondientes se muestran en la Figura 2.17.



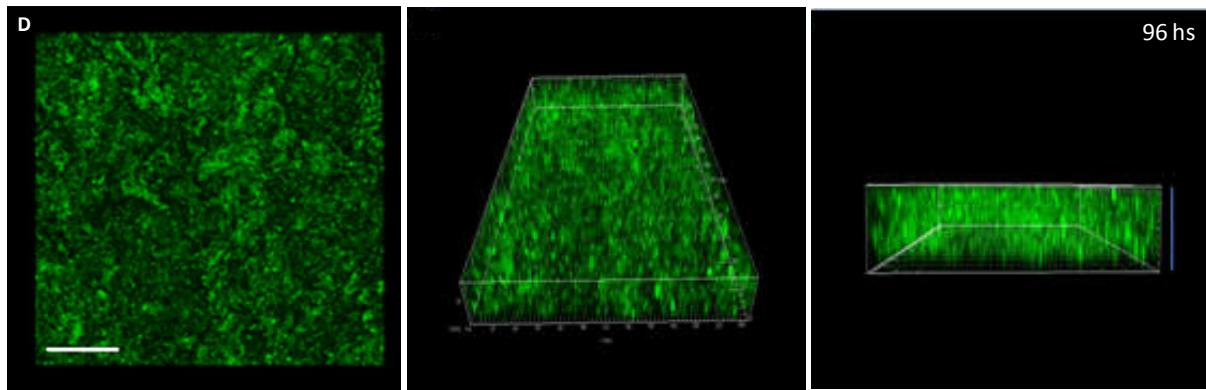


Figura 2.17 Imágenes obtenidas por MELC del *biofilm* de *B. tropica-gfp* a las 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 hs (D) de cultivo. Plano x-y (Izquierda). Reconstrucción volumétrica 3D de la serie de imágenes tomadas en secciones del eje z (*stacks* en z) (Centro y derecha). Barra: 50 μm .

Al igual que con MEF, a las 24 horas, se observaron bacterias adheridas a la superficie de vidrio como pequeñas agrupaciones celulares o microcolonias formando una estructura de *biofilm* de una altura promedio de 12 μm (Fig. 2.17 A). A las 48 horas de cultivo, la densidad de las células adheridas a la superficie aumentó y el *biofilm* alcanzó una altura promedio de 18 μm (Figura 2.17 B). A las 72 hs de crecimiento el *biofilm* se mostró estructuralmente más complejo cubriendo la mayor parte de la superficie. A las 96 hs los *biofilms* formados fueron robustos con una estructura mucho más compacta con una altura promedio de 26 μm , correspondiéndose con las características de un *biofilm* maduro (no se observó aumento del tamaño después de este tiempo).

Después de tomar las imágenes correspondientes a la banda de emisión de la GFP se seleccionó un canal con una ventana de excitación de 568-762 nm, considerablemente alejada de la banda de emisión de la proteína GFP. Este canal, cuya emisión corresponde al color rojo, permitió distinguir otro componente de la estructura del *biofilm* correspondiente a una matriz densa autofluorescente (Figura 2.18 B). En esta matriz se encontraban inmersas las bacterias (Figura 2.18 A) tal como se observa en las imágenes C de la Figura 2.18, que corresponden a la superposición de las imágenes A y B.

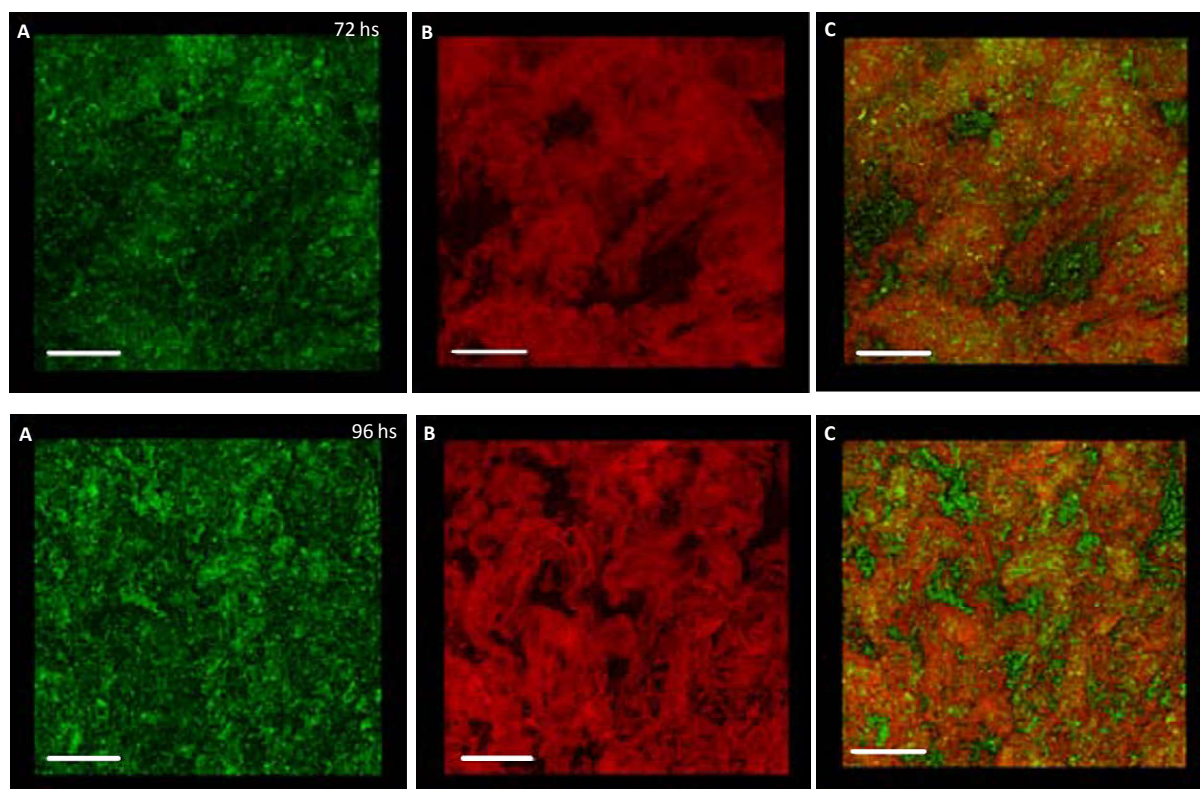


Figura 2.18 Imágenes obtenidas por MELC del *biofilm* de *B. trópica-gfp* a las 72 y 96 hs de cultivo. Plano x-y (A); con banda de emisión de 504-550 nm (B); con banda de emisión de 568-762 nm, (C) con banda de emisión de 504-762 nm. Barra: 50 μ m.

Al igual que para otros microorganismos esta matriz estaría formada probablemente por EPS, ADN y proteínas (Flemming y Wingender, 2010).

2.3.4 Evaluación de la producción de enzimas líticas

2.3.4 a – Producción de enzimas líticas en medios sólidos

Se realizó un *screening* de actividades enzimáticas en medio sólido, con el fin de determinar de forma rápida y sencilla la actividad de ciertas enzimas que podrían estar implicadas en la colonización vegetal y en la rizocompetencia.

Los inóculos utilizados para sembrar las placas estuvieron en el orden de 1.10^9 UFC/ml. Con el fin de determinar la producción enzimática por parte del microorganismo, luego del período de incubación correspondiente, se revelaron las placas de manera específica para cada caso, como se detalló anteriormente. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 2.19.

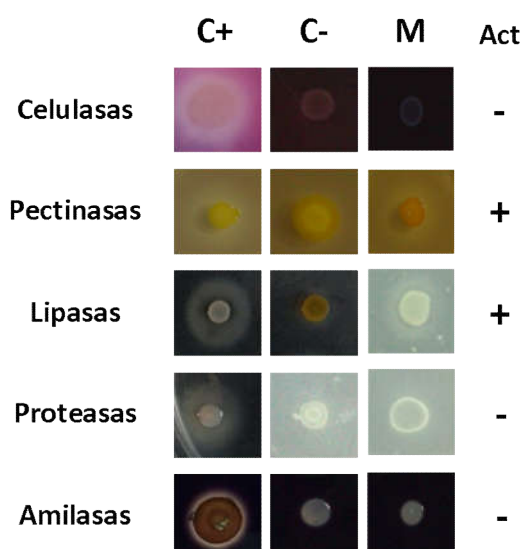


Figura 2.19 *Screening* de actividades enzimáticas en medios sólidos. C+: Control positivo. C-: Control negativo. M: muestra. Act: actividad enzimática positiva (+) o negativa (-).

Como resultado del *screening* enzimático se registró actividad en las placas utilizadas para la observación de lipasas y pectinasas. No se observó actividad en los medios para la detección de celulasas, amilasas y proteasas. Estos resultados fueron los mismos tanto en las placas inoculadas con cultivo centrifugado y no centrifugado, como en las inoculadas a partir de cultivo sólido.

2.3.4 b – Producción de enzimas líticas en medios líquidos

A distintos tiempos se tomaron muestras de los medios de cultivo con pectina y CL para la medida de actividad pectinasa, y con CMC y afrecho para la medida de actividad celulasa, se centrifugaron y se guardaron los sobrenadantes a -20°C para medir actividad enzimática con el método de Somogyi-Nelson. Con los valores de DO_{560} obtenidos, se determinó el crecimiento en los cultivos con pectina y CL (Figura 2.20). Se midió también el pH al finalizar los cultivos (Tabla 2.9).

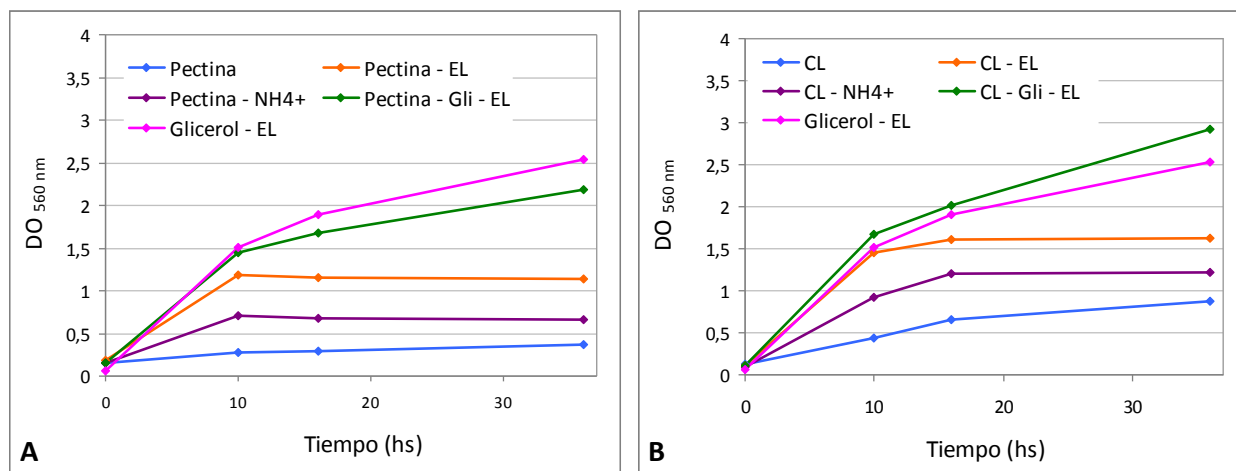


Figura 2.20 Curvas de crecimiento de *B. tropica* en medios con pectina y glicerol **(A)** y CL y glicerol **(B)** como FCE. Los puntos representan el promedio de los valores obtenidos.

Medio	pH final	Medio	pH final
Pectina	6,71 ± 0,02	CL	6,70 ± 0,04
Pectina-NH ₄ ⁺	6,25 ± 0,09	CL-NH ₄ ⁺	5,84 ± 0,19
Pectina-EL	7,53 ± 0,14	CL-EL	7,26 ± 0,10
Pectina-Glicerol-EL	7,02 ± 0,13	CL-Glicerol-EL	6,89 ± 0,06
Glicerol-EL	7,23 ± 0,19	Glicerol-EL	7,23 ± 0,19

Tabla 2.9 Valores de pH al final de los cultivos para la medida de actividad pectinasa.

Con estos resultados se pudo concluir que tanto la pectina como su fuente natural alternativa, la CL, no serían óptimas para sustentar el crecimiento de *B. tropica* como únicas fuentes de FCE.

Como se detalló anteriormente, se calculó la actividad enzimática (Tablas 2.10 y 2.11).

Tiempo (hs)	Pectina	Pectina-NH ₄ ⁺	Pectina-EL	Pectina-Gli-EL	Glicerol-EL
10	0	3,72 ± 0,75	3,00 ± 0,22	1,43 ± 1,17	0
16	0,78 ± 0,12	3,66 ± 1,37	0,12 ± 0,17	1,23 ± 1,18	0
36	0	3,23 ± 2,17	0	3,07 ± 0,3	0

Tabla 2.10 Actividad enzimática expresada en mU/ml en los sobrenadantes de los medios con pectina.

Tiempo (hs)	CL	CL-NH ₄ ⁺	CL-EL	CL-Gli-EL	Glicerol-EL
10	0	2,78 ± 2,48	2,94 ± 3,13	2,37 ± 1,30	0
16	2,25 ± 0,93	5,25 ± 0,17	4,89 ± 3,59	2,34 ± 1,46	0
36	0,91 ± 0,4	2,47 ± 3,35	5,49 ± 3,50	2,10 ± 1,90	0

Tabla 2.11 Actividad enzimática expresada en mU/ml en los sobrenadantes de los medios con CL.

Se detectó actividad pectinasa en el sobrenadante de los cultivos, siendo entonces una enzima extracelular, acorde al *screening* realizado en medio sólido. La actividad se registró solamente en los cultivos con pectina o CL, siendo por lo tanto la presencia de estas sustancias determinante para la

expresión de la pectinasa, ya que cuando sólo tenían glicerol no presentaron actividad. No obstante, como las medidas de actividad obtenidas fueron bajas, acorde a lo reportado para PGPB endófitas y a diferencia de los patógenos, se realizó la liofilización de las muestras y luego se midió nuevamente actividad pectinasa para confirmar estos resultados. Los valores de pH y DO₅₆₀ de los cultivos que fueron liofilizados fue similar a los anteriores cultivos analizados. Luego de liofilizar y resuspender el liofilizado resultante, se midió la actividad enzimática mediante el método de Somogyi-Nelson, y con los datos obtenidos de DO₆₆₀, se realizó el cálculo de mU/ml de enzima, tal como se detalló anteriormente (Tabla 2.12).

Medio	Actividad enzimática de liofilizados (mU/ml)	Actividad enzimática final (mU/ml)
Pectina	59,2 ± 13,7	3,95 ± 0,91
Pectina-NH ₄ ⁺	8,14 ± 5,75	0,54 ± 0,38
Pectina-EL	31,95 ± 17,85	2,13 ± 1,19
Pectina-Gli-EL	20,9 ± 3,73	1,39 ± 0,24
Glicerol-EL	0	0
CL	23,85 ± 4,8	1,59 ± 0,32
CL-NH ₄ ⁺	23,6 ± 4,43	1,58 ± 0,29
CL-EL	53,9 ± 8,06	3,59 ± 0,54
CL-Gli-EL	47,5 ± 4,00	3,17 ± 0,26

Tabla 2.12 Actividad enzimática expresada en mU/ml para las muestras liofilizadas y actividad enzimática final.

Los resultados obtenidos luego de la liofilización de las muestras confirmaron que se registró actividad pectinasa sólo en presencia de pectina o CL, indicando que la expresión de esta enzima estaría directamente relacionada a la presencia del sustrato, es decir, es una enzima inducible por sustrato.

Por otro lado, con los valores de DO₅₆₀ obtenidos se determinó el crecimiento en los cultivos con CMC y afrecho de trigo (Figura 2.21). Se midió también el pH al finalizar los cultivos (Tabla 2.13).

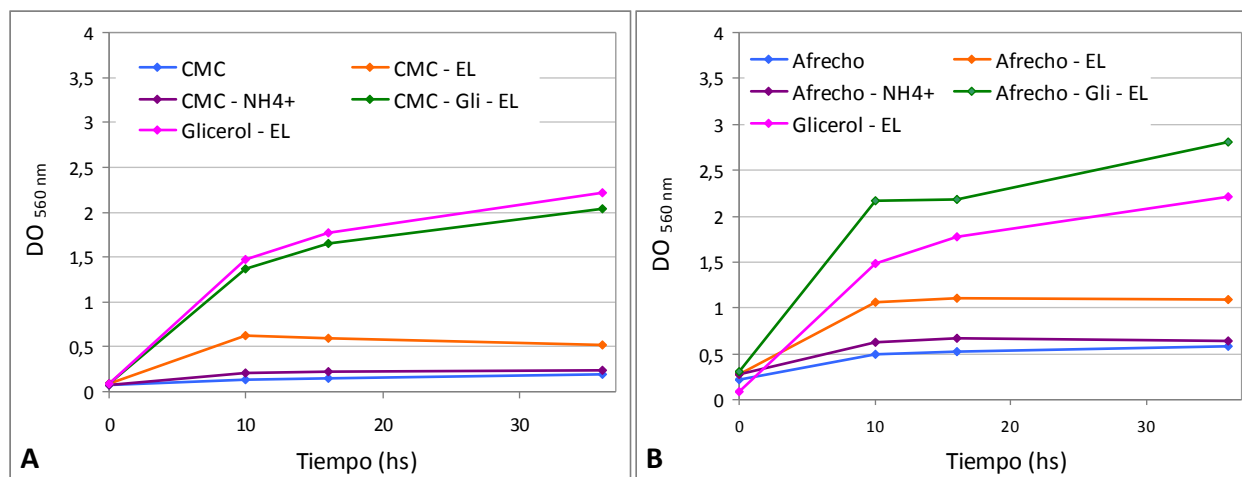


Figura 2.21 Curvas de crecimiento de *B. tropica* en medios con CMC y glicerol (A) y afrecho de trigo y glicerol (B) como FCE. Los puntos representan el promedio de los valores obtenidos.

Medio	pH final	Medio	pH final
CMC	6,78 ± 0,05	Afrecho	7,00 ± 0,09
CMC-NH ₄ ⁺	6,74 ± 0,02	Afrecho -NH ₄ ⁺	6,81 ± 0,14
CMC-EL	7,71 ± 0,25	Afrecho -EL	7,49 ± 0,16
CMC-Glicerol-EL	7,17 ± 0,07	Afrecho -Glicerol-EL	7,00 ± 0,03
Glicerol-EL	7,19 ± 0,21	Glicerol-EL	7,19 ± 0,21

Tabla 2.13 Valores de pH al final de los cultivos para la medida de actividad enzimática celulasa.

No se encontró actividad celulasa en ninguna de las muestras analizadas, tanto para los medios con CMC como para los medios con afrecho, sustratos que no serían metabolizables por este microorganismo, tal como se muestra en la gráficas donde se observa muy poco crecimiento bacteriano en comparación con otros sustratos. Los datos obtenidos en el análisis de los sobrenadantes de medios líquidos son coincidentes con los resultados de la misma actividad en medios sólidos.

2.3.4 c - Evaluación de la producción de enzimas líticas en sistemas con plantas

El presente ensayo fue realizado para determinar si *B. tropica* en presencia de raíces de trigo y sorgo en un medio mínimo sin FCE ni FN era capaz de producir enzimas pectinasas y celulasas que le permitieran colonizar internamente los tejidos vegetales. Los frascos con solución de Fåhræus donde se hicieron crecer las plantas se inocularon con un volumen del resuspendido bacteriano que permitió obtener una DO₅₆₀ inicial de 0,2.

Considerando que la actividad de las enzimas líticas degradadoras de la pared celular genera azúcares que podrían soportar el crecimiento de las poblaciones tanto superficiales como endofíticas de los microorganismos colonizadores de las raíces de las plantas (junto con otros exudados

radicales), además de darles paso hacia los tejidos internos, se determinaron cuantitativamente las poblaciones superficiales y endofíticas de *B. tropica* en raíces después de inocular semillas de trigo y sorgo que fueron crecidas según se describió anteriormente. En las raíces desinfectadas se analizó la cantidad de bacterias endófitas y la población superficial se calculó como la diferencia entre la población total (con raíces no desinfectadas) y las endófitas. Los resultados obtenidos fueron semejantes para las raíces de trigo y para las de sorgo y se muestran valores promedio en la Tabla 2.14.

Tiempo (días)	Población del rizoplano (UFC/gr raíz)	Población endofítica (UFC/gr raíz)
8	$2,1 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$
15	$1,8 \cdot 10^8 - 1,9 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^5 - 1,4 \cdot 10^6$

Tabla 2.14 Colonización del rizoplano y endofítica.

Se observó la presencia de *B. tropica* como único microorganismo aislado, y no se observó crecimiento en los controles no inoculados. El medio líquido donde se sumergieron las raíces fue una solución de Fahræus sin FCE ni FN, y los microorganismos pudieron crecer en el rizoplano o en el interior del vegetal, indicando que la colonización fue a expensas de los exudados radicales. El hecho de haber encontrado una población endofítica en raíces que prácticamente no poseen roturas físicas ni tampoco están dañadas por microorganismos patógenos indicaría que el interior de los tejidos fue colonizado pasivamente por zonas como el ápice, la zona de emergencia de las raíces laterales o los pelos radicales o bien, por un proceso activo mediado por enzimas líticas de la pared celular vegetal.

No se detectó actividad pectinasa al analizar las muestras a los distintos días PI. Pasados los 15 días, se tomaron 10 ml de cada medio y se liofilizaron como se mencionó anteriormente. Los liofilizados se resuspendieron en agua destilada, con el fin de obtener una suspensión concentrada 15 veces. Al analizar las muestras liofilizadas, no se obtuvo actividad enzimática pectinasa mediante la técnica utilizada. Por otro lado, se realizaron medidas de actividad en la suspensión resultante luego de la maceración de las raíces con solución fisiológica, no obteniéndose actividad en las mismas. Además, se centrifugaron dichos macerados y se midió actividad en el sobrenadante de los mismos y tampoco se registró actividad enzimática. Si *B. tropica* logró ingresar a los tejidos internos mediante la expresión de la enzima pectinasa, las concentraciones de la misma fueron bajas en las muestras analizadas, no pudiendo ser detectadas mediante la metodología utilizada.

Tampoco se detectó actividad celulasa al analizar las muestras a los distintos días PI, ni al medir las suspensiones resultantes luego de la maceración de las raíces.

2.4 CONCLUSIONES

Se ha descrito previamente que la habilidad de formar *biofilm* les confiere ventajas competitivas a las PGPB tanto en condiciones naturales como al ser aplicadas como inoculantes sobre las semillas, y también que la expresión de enzimas líticas de la pared celular vegetal está relacionada con la rizocompetencia y el ingreso del microorganismo al interior de los tejidos vegetales, haciendo que su evaluación cobre importancia en la caracterización de la capacidad de colonización del microorganismo en estudio. En el presente capítulo se pusieron en evidencia algunas características que presenta *B. tropica* MTo-293 relacionadas con estos procesos y con su crecimiento en medios líquidos. Los resultados obtenidos evidenciaron que:

1. En medios líquidos con glicerol como FCE y EL como FN *B. tropica* MTo-293 presenta mayor velocidad específica de crecimiento, mantiene el pH cercano a la neutralidad durante el cultivo y es uno de los medios donde se encontró una mayor formación de *biofilm*, resultados que contribuirían a la viabilidad a largo plazo del microorganismo luego del envasado y también en la semilla inoculada. Por estos motivos, los ensayos que se detallan en los capítulos posteriores se llevaron a cabo en medios con esta composición. *B. tropica* MTo-293 y sus variantes isogénicas, *B. tropica-gfp* (obtenida en este trabajo) y *B. tropica-gus*, tuvieron el mismo comportamiento en cultivos líquidos y, por lo tanto, fueron tratadas como equivalentes.

2. *B. tropica* MTo-293 es capaz de crecer formando *biofilm* sobre superficies abióticas, indicando que presenta una importante característica que normalmente tienen las PGPB competentes. En las condiciones ensayadas el *biofilm* se formó en la interfase líquido-aire, hecho que puede deberse a los requerimientos significativos de oxígeno de este microorganismo, y a otras características relacionadas como la composición del medio de cultivo, observándose sobre vidrio mayor producción en el medio donde la relación C/N fue elevada. Extrapolando estos resultados a la posible formación de *biofilm* por *B. tropica* sobre las raíces, ésta es una situación factible de darse *in vivo* ya que la raíz no está sumergida en una suspensión acuosa sino que en el suelo en general existe una circulación de agua que propicia la formación de tal interfase. Estudios en sistemas tipo continuo serían útiles para profundizar esta temática. Haciendo uso de técnicas microscópicas se determinó que la complejidad estructural y la altura del *biofilm* aumentan en el tiempo, hasta estabilizarse al superar las 96 horas de crecimiento y alcanzar una altura de 26 μm , similar a la reportada para otras PGPB. Ensayos *in vivo* inoculando semillas o raíces con cepas marcadas así como la construcción de cepas mutantes, defectivas por ejemplo en la producción de EPS, serían convenientes para poder determinar la contribución que puede tener el EPS en la formación de *biofilm* y este último en la colonización de las raíces por *B. tropica* MTo-293, para dilucidar si esta capacidad que presentó en superficies abióticas se extiende también a sistemas vivos, con la idea de contribuir a la aplicación más eficiente de este microorganismo como PGPB en cultivos de gramíneas.

3. *B. tropica* MTo-293 posee una enzima pectinasa extracelular inducible por la presencia del sustrato, que el microorganismo en estudio podría utilizar para ingresar activamente a los tejidos internos de las plantas que coloniza. No obstante, no se encontró actividad pectinasa en cultivos de *B. tropica* MTo-293 en un sistema de crecimiento en presencia de raíces de gramíneas, indicando que si la colonización de estos tejidos se realizó activamente mediante la expresión de esta enzima, las concentraciones de la misma no pudieron ser detectadas con la metodología. Otros ensayos serán necesarios para determinar el tipo de pectinasa que *B. tropica* MTo-293 produce. En ninguna de las condiciones ensayadas se encontró actividad celulasa.

A partir de los resultados obtenidos en el presente capítulo, se puede concluir que *B. tropica* MTo-293 presenta dos características ampliamente distribuidas entre las PGPB, que influyen directamente sobre la competencia por la colonización de tejidos superficiales, como es la formación de *biofilm*, y la colonización endofítica mediada por un mecanismo activo, como es la producción de una enzima lítica de la pared celular vegetal.

2.5 ANEXO 2

2.5.1 Estabilidad de *B. tropica-gfp*

Se realizaron cultivos de la cepa *B. tropica-gfp* en medio LB líquido. Erlenmeyers con 250 ml de medio (por duplicado) fueron inoculados con *B. tropica-gfp*, previamente centrifugados y resuspendidos en el mismo medio, con una DO_{560} inicial de 0,05. Considerando una velocidad específica de crecimiento promedio de $0,37 \text{ h}^{-1}$, se calculó el tiempo de duplicación del microorganismo en estudio, resultando ser de aproximadamente 2 horas. Cada 24 horas hasta los 7 días PI se realizaron recuentos en placas de medio LB agarizado en presencia y ausencia de Tc (10 mg/ml), con el fin de observar si el plásmido incorporado, que le brinda a la bacteria resistencia al antibiótico, continuaba presente. Teniendo en cuenta el tiempo de duplicación, se analizaron de esta forma más de 80 generaciones. Se calculó el logaritmo de los recuentos a cada tiempo, y los resultados obtenidos se observan en la Figura A1.

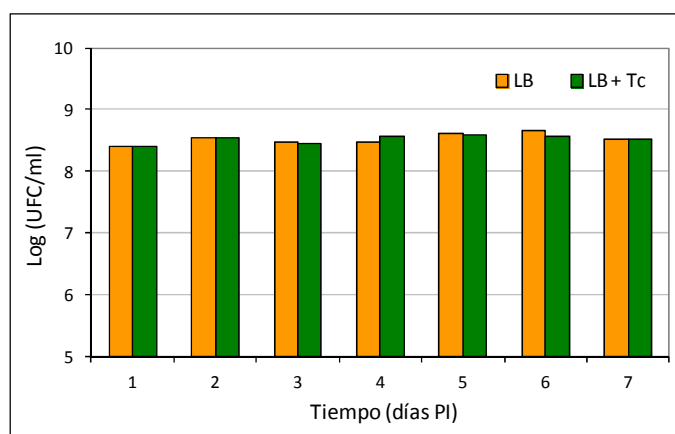


Figura A1 Recuento de viables del cultivo en medio LB de *B. tropica-gfp* creciendo en medio agarizado en ausencia y presencia de Tc.

En todos los tiempos analizados, se observó que ambos recuentos tuvieron valores semejantes, pudiendo considerar que el plásmido que le confiere resistencia a Tc se mantuvo estable por 7 días, es decir, por más de 80 generaciones.

2.5.2 Cultivos *batch*

Los cultivos *batch* o cultivos discontinuos, son sistemas cerrados que contienen todos los nutrientes necesarios para suplir las necesidades fisiológicas del organismo; y la concentración de uno de ellos, está en cantidades estequiométricamente más bajas que las concentraciones de los otros componentes del medio (nutriente limitante del crecimiento). Una ecuación que describe aceptablemente la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración del

nutriente limitante del crecimiento (S) es la ecuación de Monod, donde K_s es la constante de afinidad para el sustrato limitante.

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{(K_s + S)}$$

Esta indica que mientras el sustrato limitante esté presente en exceso en el medio de cultivo, la velocidad específica de crecimiento es máxima (fase exponencial), y al ir disminuyendo su concentración, el crecimiento se hace más lento hasta llegar a la fase de no crecimiento o fase estacionaria. En este sistema de cultivo, los microorganismos producen cambios continuos e incontrolables en su medio ambiente; la concentración de microorganismos se eleva, mientras que la concentración de sustrato disminuye y comienzan a aparecer productos. Los microorganismos se adaptan a esas condiciones cambiando continuamente su fenotipo, lo cual a menudo se traduce en una alteración de la velocidad de crecimiento que obviamente tiene un efecto sobre la fisiología del microorganismo. No obstante, como una primera aproximación del estudio de las características fisiológicas de un microorganismo, los cultivos *batch*, tanto en erlenmeyers como en biorreactores (donde no sólo se aumenta la escala de estudio sino que también se pueden realizar controles del proceso) son la herramienta adecuada y previa necesaria para un estudio posterior con mayor profundidad.

2.5.3 Puesta a punto de las condiciones de tiempo y temperatura para las medidas de actividad pectinasa y celulasa por el método Somogyi-Nelson

Actividad pectinasa

Se realizó una medida preliminar para determinar si el sustrato utilizado generaba por si mismo variabilidad en la coloración sin que hubiera actividad enzimática, utilizando agua destilada en lugar del extracto enzimático. Por otro lado, se realizó un control de blancos de las muestras a utilizar (utilizando agua destilada en lugar del sustrato), con el fin de observar si los extractos enzimáticos utilizados generaban variabilidad en la coloración sin que ocurriera la reacción enzimática. Se realizaron diluciones de las muestras y se midieron como se detalló anteriormente. La incubación se realizó a 30°C durante 1 hora. Posteriormente, se realizó una medida inicial siguiendo el protocolo descrito, para determinar las condiciones óptimas de medición. Para dicha medida, se utilizaron las muestras obtenidas del crecimiento de *B. tropica* en medios con pectina como FCE, sin FN o con EL o NH_4^+ como FN. Como se decidió probar con diluciones de las muestras (ya que no se sabía hasta el momento si habría actividad, y si la variación de color entraría dentro del rango de la curva de calibración) se utilizaron dos tiempos de incubación: 1 y 4 horas. Los mismos se realizaron a 30°C. Una vez obtenidos los resultados anteriores, y con el fin de determinar la temperatura óptima de

incubación, se probaron incubaciones de 1 hora de duración, a 5 temperaturas diferentes: 30, 37, 40, 50 y 60 °C. Finalmente, con todos los resultados obtenidos, se determinó la metodología a utilizar para la medida de actividad pectinasa. Al analizar el sustrato (con agua en lugar de extracto enzimático), se observó que el mismo no produjo cambio de coloración al medir actividad, como se observa en la Figura A2.

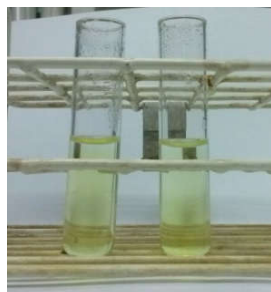


Figura A2 Medida de actividad enzimática del APG 0,2% en buffer BCP a pH 6,5, sin extracto enzimático.

Con respecto a los blancos de reacción, se siguió el protocolo para blancos como se indicó anteriormente para la muestra proveniente de medio con CL como FCE y NH_4^+ como FN y sus correspondientes diluciones. En todas las muestras analizadas se obtuvo la misma coloración y similares medidas de DO_{660} , como se observa en la Figura A3, por lo que se determinó que no sería necesario diluir las muestras.



Figura A3 Medida de actividad enzimática correspondiente a los blancos de la muestra proveniente del medio con CL y NH_4^+ .

Con respecto al tiempo de incubación, al analizar las muestras diluidas se observó que no había variación de la coloración, por lo que no sería necesaria una incubación tan prolongada. Con respecto al análisis de las temperaturas a ensayar, se observó que realizando la incubación a 37 °C, los blancos de reacción no fueron tan elevados, y las medidas de las repeticiones de cada muestra fueron similares entre sí, por lo que se decidió utilizar esta temperatura en las siguientes medidas. Por lo tanto, para la medida de actividad pectinasa, se decidió realizar la incubación durante una hora a 37°C.

Actividad celulasa

Considerando los resultados obtenidos en la medida de actividad pectinasa, se utilizaron los extractos enzimáticos sin dilución. Se realizó, además, un control de blancos de reacción con las

muestras con Afrecho-NH₄⁺, Glicerol-EL y CMC-NH₄⁺, para determinar si los sustratos a utilizar generaban una variabilidad del color sin que ocurriera reacción enzimática. Con el objetivo de determinar la temperatura óptima de incubación, se realizaron mediciones incubando las muestras durante 1 hora a 30, 37, 40, 50 y 60 °C. Con los resultados obtenidos, se determinó la metodología a utilizar para la medida de actividad celusasa. Al realizar el control de blancos, se observó que todas las muestras analizadas presentaron la misma coloración, como se observa en la Figura A4.

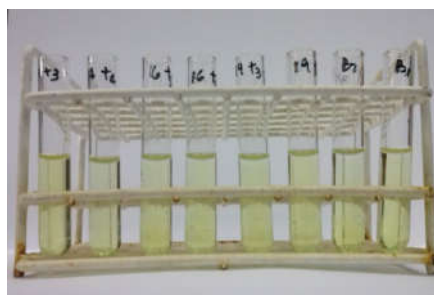


Figura A3 Control de blancos de la medida de actividad celusasa.

Al analizar las distintas temperaturas, se observó que no había variación entre los resultados obtenidos, por lo que se decidió incubar a 37°C, tal como en el ensayo anterior.

2.5.4 Curvas de calibración para las medidas de actividad pectinasa y celusasa

Actividad pectinasa

Para la medida de actividad pectinasa, la misma se realizó utilizando una solución stock de ácido galacturónico (1 g/l) en *buffer* BCP a pH 6,5, según se muestra en la Tabla A1. Las curvas de calibración fueron tratadas igual que las muestras, pero no se incubaron.

Ác. galacturónico (µl)	H ₂ O destilada (µl)	Concentración final (ppm)
0	200	0
5	195	25
10	190	50
20	180	100
30	170	150
40	160	200

Tabla A1 Curva de calibración para las medidas de actividad pectinasa.

La curva de calibración se realizó por duplicado en cada medición, y se promediaron los valores obtenidos. Luego se graficaron los resultados obteniéndose la curva de absorbancia a 660 nm en función de la concentración final de ácido galacturónico (ppm) (Figura A4).

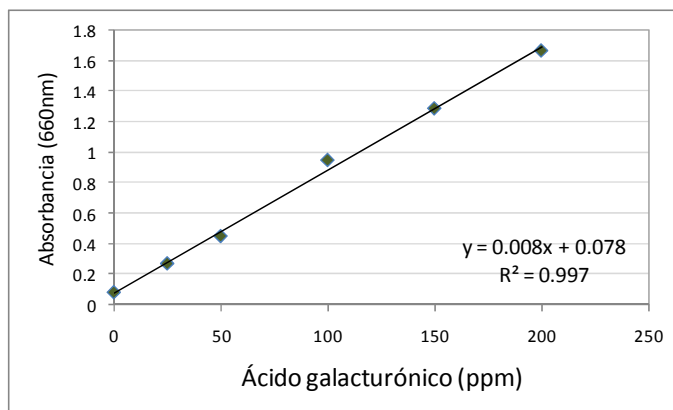


Figura A4 Curva de calibración para la medida de actividad pectinasa.

Actividad celulasa

En el caso de la medida de actividad celulasa, la curva de calibración se realizó con glucosa (500 mg/l) en *buffer* BCP a pH 6,5, como se muestra en la Tabla A2.

Glucosa (µl)	H ₂ O destilada (µl)	Concentración final (ppm)
0	200	0
5	195	12,5
10	190	25
20	180	50
30	170	75
40	160	100

Tabla A2 Curva de calibración para las medidas de actividad celulasa.

La curva de calibración se realizó por duplicado en cada medición, y se promediaron los valores obtenidos. Luego se graficaron los resultados obteniéndose la curva de absorbancia a 660 nm en función de la concentración final de glucosa (ppm) (Figura A5).

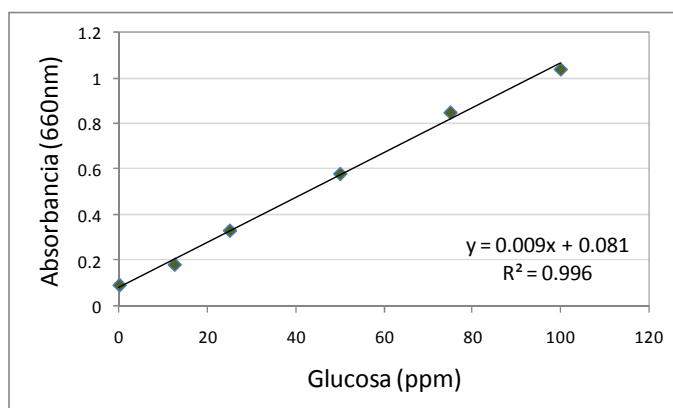


Figura A5 Curva de calibración para la medida de actividad celulasa.

Capítulo 3

Evaluación de la capacidad de solubilización de compuestos insolubles de fósforo por *Burkholderia tropica*, rol de la ruta periplasmática de oxidación de aldosas

Capítulo 3

Evaluación de la capacidad de solubilización de compuestos insolubles de fósforo por *Burkholderia tropica*, rol de la ruta periplasmática de oxidación de aldosas

3.1 RESUMEN

El principal mecanismo de solubilización de compuestos inorgánicos insolubles de fósforo en bacterias Gram negativas es por la acción de ácidos orgánicos producidos por la oxidación extracelular directa de aldosas, catalizada por una glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ ligada a la membrana (mGDH) que en la mayoría de estos microorganismos se expresa en forma constitutiva. En el presente capítulo, se evaluó la capacidad de solubilización de estos compuestos por *Burkholderia tropica* MTo-293 y el rol de la vía de oxidación directa de aldosas utilizando diferentes enfoques de cultivo. Ensayos cualitativos en placa utilizando fosfato tricálcico demostraron que *B. tropica* MTo-293 solubilizó compuestos de fósforo insoluble sólo en presencia de aldosas como fuente de carbono. En cultivos líquidos con fosfato tricálcico y glucosa, se registró ácido glucónico concomitantemente con el aumento de fósforo soluble. La baja disponibilidad de fósforo (cultivos con fosfato tricálcico) y/o la condición de fijación biológica de nitrógeno (*stress* nutricional y energético, respectivamente) indujeron la vía periplasmática de oxidación de aldosas, presentando una actividad significativa mGDH siendo el ácido glucónico fue el único producto en cultivos con glucosa como única fuente de carbono y energía. No se encontró actividad mGDH bajo condiciones de elevada disponibilidad de fósforo y nitrógeno fijado aún en presencia de glucosa. La adición de PQQ a estos cultivos condujo a una excreción inmediata de ácido glucónico con una concomitante actividad mGDH. *B. tropica* MTo-293 creciendo con glucosa, fósforo soluble y nitrógeno fijado no sólo no fue capaz de sintetizar el cofactor PQQ sino que también necesitó un metabolismo activo para producir ácido glucónico. Por lo tanto, la solubilización de fósforo insoluble en *B. tropica* MTo-293 implicó una mGDH. También se observó una actividad significativa de gluconato deshidrogenasa asociada a membrana en todas las condiciones de cultivo, pero no se registró ácido 2-cetoglucónico.

Con la realización de este trabajo se contribuyó a la caracterización del proceso de solubilización de compuestos insolubles de P *in vitro* por *B. tropica* MTo-293 y se redactó un artículo que fue publicado en 2016: **Mineral Phosphate Solubilization in *Burkholderia tropica* involves an inducible PQQ-Glucose Dehydrogenase**; autores: Bernabeu PR, García SS, García Ferreyra G, Guidi VI, Galar ML, Boiardi JL y Luna MF. British Microbiology Research Journal. doi: 10.9734/BMRJ/2016/24405.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Organismos y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa salvaje de *B. tropica* en todos los ensayos, conservada como se detalló en el Capítulo 2. En los ensayos cualitativos en medio sólido, se utilizó como control positivo la bacteria *G. diazotrophicus* PAL 5 (ATCC 49037) (Cavalcante y Döbereiner, 1988) ya que este microorganismo fue caracterizado como un solubilizador de fosfato con capacidad de solubilizar 100 mg/l de P en cultivos con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (PTC) y glucosa 20 g/l (Crespo *et al.*, 2011) siendo la oxidación periplasmática mediada por la mGDH (Crespo *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2006) la ruta principal del metabolismo de aldosas para este microorganismo. *G. diazotrophicus* fue mantenida en LGI con glicerol al 20% (v/v) a -80°C y por subcultivos mensuales en medio PDA (por las siglas en inglés *Potato Dextrose Agar*). Los microorganismos se hicieron crecer en medio LGI líquido modificado con la composición detallada en cada ensayo. Los inóculos se realizaron como se describió en el Capítulo 2.

3.2.2 Ensayos cualitativos de solubilización de fósforo en medio sólido

3.2.2 a – Evaluación de la solubilización de fosfato insoluble

Para la evaluación de la capacidad de solubilización de P de *B. tropica* con distintos sustratos carbonados se utilizó el medio agarizado NBRIP (de las siglas en inglés *National Botanical Research Institute's phosphate growth medium*) (Nautiyal *et al.*, 1999) con PTC, modificando la FCE (Tabla 3.1).

Componente	Concentración (g/l)
FCE*	10
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,25
KCl	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5
Agar	14
pH	6,00

Tabla 3.1 Composición del medio NBRIP (Nautiyal *et al.*, 1999). *FCE: glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, galactosa, sacarosa, fructosa, manitol, glicerol, gluconato de sodio o lactosa.

El medio fue esterilizado en autoclave, sin la FCE. Las soluciones de azúcares al 20% p/v fueron esterilizadas por filtración empleando membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Merck Millipore) y luego se adicionaron al medio. Las placas se sembraron con $50 \mu\text{l}$ de una suspensión bacteriana obtenida a partir de un cultivo de 48 hs, centrifugado (10000 g durante 15 min), lavado dos veces y resuspendido en agua destilada estéril. Las placas se incubaron a 30°C durante 72 hs. La presencia de

un halo translúcido alrededor de la colonia indicó un fenotipo solubilizador de fósforo o MPS. Se sembraron tres placas para cada FCE.

3.2.2 b – Evaluación de la producción de ácidos orgánicos

Para evaluar si el fenotipo MPS se debía a la producción de ácidos orgánicos se realizó un ensayo en placa con el agregado del indicador de pH rojo de metilo al 0,1% al medio NBRIP. Se sembraron 50 μ l de *B. tropica*, en placas conteniendo medio NBRIP agarizado con glucosa (10 g/l) como FCE y KNO_3 (1 g/l) en lugar de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ya que por cada NH_4^+ que ingresa a la célula se libera un H^+) modificando la fuente de fósforo, con P soluble (PS) (K_2HPO_4 0,2 g/l y KH_2PO_4 0,6 g/l) o con PTC (5 g/l). Las placas fueron incubadas por 72 hs y se registró el viraje del indicador debido a la producción de ácidos orgánicos (rojo 4,2-amarillo 6,2). El medio y los inóculos fueron preparados como se describió anteriormente.

3.2.3 Ensayos de solubilización de fósforo en medio líquido

3.2.3 a - Cultivos batch en erlenmeyer

Se realizaron cultivos *batch* en frascos agitados (de 1 litro con 250 ml de medio) en el medio LGI en los que se modificó la cantidad o la calidad de la FCE, de fósforo o de N según la condición del ensayo, como se detalla en la Figura 3.1. Se utilizaron glucosa o glicerol como FCE y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno. Para lograr condiciones de fijación biológica de nitrógeno (FBN), se empleó una dosis *starter* de 0,132 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mínima concentración para lograr condiciones de FBN, ya que la actividad de la nitrogenasa en la mayor parte de los microorganismos se inhibe a concentraciones mayores de 0,60 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Stephan *et al.*, 1991)). Como fuente de PS se empleó fosfato de potasio (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) y PTC como P insoluble. La DO_{560} inicial de todos los cultivos fue de 0,05-0,1 y el pH inicial se ajustó a 6,00. Los inóculos utilizados fueron crecidos en los mismos medios de cultivo para los que iban a ser utilizados. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 30°C y 200 rpm, excepto aquellos bajo FBN en los que la agitación se redujo a 100 rpm para prevenir la inhibición de la enzima nitrogenasa por el oxígeno. Cada cultivo se realizó por triplicado (dos cultivos para las medidas relacionadas al crecimiento y a los sustratos y productos en el sobrenadante y uno para la medida de actividad enzimática) en dos ensayos independientes.

No FBN		FBN	
<p>1</p> <p>Glucosa 10 g/l K₂HPO₄ 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,6 g/l (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l</p>	<p>2</p> <p>Glucosa 10 g/l Ca₃(PO₄)₂ 5 g/l (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l</p>	<p>7</p> <p>Glucosa 10 g/l K₂HPO₄ 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,6 g/l (NH₄)₂SO₄ 0,132 g/l</p>	<p>8</p> <p>Glucosa 10 g/l Ca₃(PO₄)₂ 5 g/l (NH₄)₂SO₄ 0,132 g/l</p>
<p>3</p> <p>Glucosa 30 g/l K₂HPO₄ 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,6 g/l (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l</p>	<p>4</p> <p>Glucosa 30 g/l Ca₃(PO₄)₂ 5 g/l (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l</p>	<p>9</p> <p>Glucosa 30 g/l K₂HPO₄ 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,6 g/l (NH₄)₂SO₄ 0,132 g/l</p>	<p>10</p> <p>Glucosa 30 g/l Ca₃(PO₄)₂ 5 g/l (NH₄)₂SO₄ 0,132 g/l</p>
<p>5</p> <p>Glicerol 30 g/l K₂HPO₄ 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,6 g/l (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l</p>	<p>6</p> <p>Glicerol 30 g/l Ca₃(PO₄)₂ 5 g/l (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l</p>	<p>11</p> <p>Glicerol 30 g/l K₂HPO₄ 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,6 g/l (NH₄)₂SO₄ 0,132 g/l</p>	<p>12</p> <p>Glicerol 30 g/l Ca₃(PO₄)₂ 5 g/l (NH₄)₂SO₄ 0,132 g/l</p>

Figura 3.1 Composición de los medios utilizados en cultivos en erlenmeyer.

3.2.3 b - Cultivos batch en biorreactores

Se llevaron a cabo cultivos de *B. tropica* en un biorreactor LH de 2 litros (Incelltech 210) con un volumen de trabajo de 1,5 litros. Se ensayó la condición 3 de los cultivos en erlenmeyer, con y sin control de pH mediante el agregado de KOH 0,1 N para mantener el valor constante en $6,00 \pm 0,10$. Se controló la temperatura a 28°C. La agitación se modificó cuando fue necesario para mantener el oxígeno disuelto por encima del 15% de la solubilidad máxima e impedir la limitación por oxígeno.

En el caso del cultivo con control de pH, a las 17 horas se realizó un pulso de pirrolo-quinolina quinona (PQQ) inyectando 10 ml de PQQ 2 mM, que correspondió a una concentración final en el biorreactor de 15 µM (Hommes, 1988), y se tomaron muestras del cultivo hasta 10 hs después del pulso.

Se realizaron también cultivos en los que 2 horas antes del agregado de PQQ se adicionó un pulso de cloranfenicol (200 µg/ml), con el fin de inhibir la síntesis de proteínas. Para cada condición de cultivo se realizaron dos ensayos independientes.

3.2.3 c – Análisis de las muestras

En los ensayos realizados en erlenmeyers se tomaron muestras a diferentes tiempos: un volumen se utilizó para medir DO₅₆₀ y pH, y el resto de muestra se centrifugó a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se empleó para medir glucosa y ácidos orgánicos (por HPLC) y PS (método del ácido vanadomolibdofosfórico (ASTM D 515-82)). En los cultivos con PTC, las muestras fueron previamente diluidas 1:1 (v/v) con HCl 0,1 M para solubilizar los fosfatos insolubles residuales e

impedir su interferencia (con un blanco idénticamente tratado) (Rodríguez *et al.*, 2000). Previamente a las medidas por HPLC las muestras del sobrenadante fueron desproteinizadas por precipitación con 2 volúmenes de etanol y posterior centrifugación a 12000 g durante 20 min. Los sobrenadantes desproteinizados se filtraron por membranas de 0,22 μm (Merck Millipore). La determinación de glucosa se realizó mediante HPLC utilizando una columna Shodex SC-1011 a 80°C y con H₂O a 0,8 ml/min como fase móvil con un detector de índice de refracción. La inyección se realizó en forma manual y el volumen de inyección fue de 20 μl . La determinación de ácido glucónico se realizó mediante una columna Hamilton PRP-X300 (250 x 4,1 mm) y un equipo Waters 717 plus Autosampler con un detector de arreglo de diodos. La corrida se realizó a 25°C utilizando H₂SO₄ (pH 1,70) como fase móvil a 1 ml/min. Los patrones de glucosa, ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico se procesaron de la misma forma que las muestras (Sashidhar y Podile, 2009).

Con respecto a los cultivos en biorreactor, se tomaron muestras aproximadamente cada dos horas: un volumen se utilizó para medir DO₅₆₀ y pH, el resto de la muestra se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. Con el *pellet* se determinó el peso seco (concentración de biomasa en g/l) y en el sobrenadante se midieron sustratos y productos como se describió para los cultivos en erlenmeyer. El peso seco se determinó por gravimetría: se tomaron 10 ml de cultivo (por duplicado) y se centrifugaron a 10000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido fue lavado con agua destilada y secado en estufa a 105°C hasta peso constante (Herbert *et al.*, 1971). En la Figura 3.2 se resume lo mencionado en este punto.

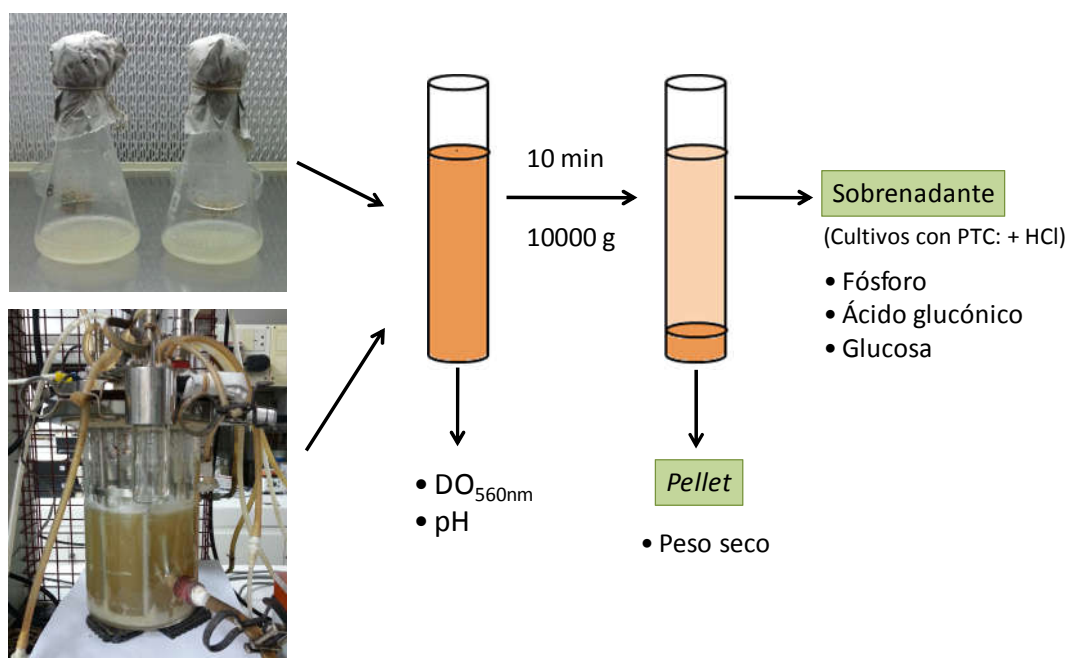


Figura 3.2 Esquema del análisis de las muestras líquidas de los cultivos provenientes de erlenmeyer y biorreactor.

Por otro lado, se tomaron muestras líquidas (20 ml-erlenmeyer; 200 ml-biorreactor) de todos los cultivos en fase exponencial (17-20 hs de crecimiento), se centrifugaron 15 minutos a 10000 g y 4°C y el *pellet* de células se utilizó para las medidas de actividades enzimáticas de la mGDH y la gluconato deshidrogenasa (GaDH). Las mismas se realizaron mediante técnicas espectrofotométricas utilizando 2,6 diclorofenolindofenol (DCIP) como aceptor de electrones, el cual al reducirse pasa de color azul a transparente, metosulfato de fenazina como intermediario (Matsushita y Ameyama, 1982; Matsushita *et al.*, 1982) y glucosa o gluconato, respectivamente. Para ello un volumen apropiado de cada cultivo (los cultivos con PTC se trataron previamente con HCl como fue mencionado anteriormente) se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos y el *pellet* de células fue lavado dos veces con buffer KH_2PO_4 10 mM (pH 6,00) conteniendo MgCl_2 5 mM y Tritón 0,1% v/v. Luego el *pellet* se resuspendió en una cantidad necesaria de buffer KH_2PO_4 10 mM (pH 6,00) hasta obtener una DO_{560} aproximada de 10, que equivale a concentración final de aproximadamente 4,5 mg de células/ml. Esta suspensión de células enteras lavadas fue empleada para la determinación de las actividades a través de medidas cinéticas durante tres minutos a 30°C empleando un espectrofotómetro Beckman DU 640. El peso seco de células en la mezcla de reacción fue de 0,10 mg/ml. La glucosa o gluconato fueron adicionados a una concentración final de 200 mM para las medidas de actividad de mGDH y GaDH, respectivamente. Para aquellas condiciones en las cuales no se obtuvo actividad mGDH, se realizó una incubación previa de las células con PQQ, incubando las células con buffer NaH_2PO_4 10 mM/ MgCl_2 5 mM y con PQQ 100 mM, durante 15 min a 30°C (Galar y Boiardi, 1995), previo a la adición de la fuente de carbono. En la Figura 3.3 se resumen los pasos para la medida de actividad enzimática.

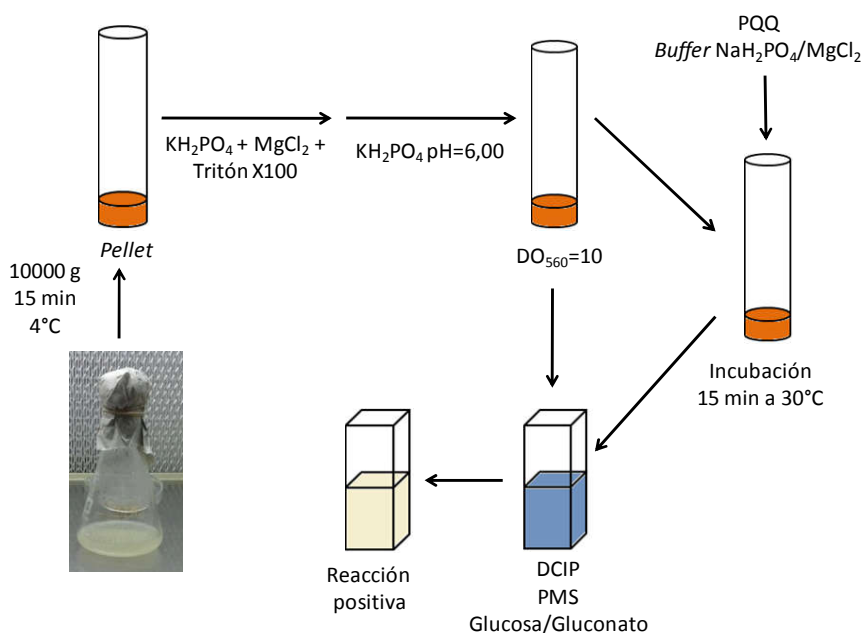


Figura 3.3 Esquema de los pasos a seguir para las medidas de actividad enzimática.

En todos los ensayos enzimáticos la velocidad de reacción fue linealmente proporcional a la cantidad de extracto celular adicionado. Las actividades enzimáticas se expresaron en nmoles de DCIP reducidos/mg proteína.min, según el siguiente cálculo:

Actividad específica = Actividad enzimática/[prot]

Actividad enzimática = $(\Delta A/\Delta t) \cdot V_t \cdot 10^6 \cdot (\epsilon_{\text{DCIP}} \cdot V_m)^{-1}$

ΔA : disminución de Absorbancia a 600 nm.

Δt : intervalo de tiempo.

V_t : Volumen de mezcla de reacción en ml.

V_m : Volumen de muestra en μl .

ϵ_{DCIP} : coeficiente de extinción molar del DCIP = $10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

[prot]: concentración de proteínas en mg/ml. Considerando un contenido de proteínas del 60% en la biomasa, se estima la concentración de proteínas multiplicando el valor de DO_{560} por el factor 0,27.

La obtención de $\Delta A/\Delta t$ se da a través de las pendientes obtenidas por las graficas de las cinéticas como se muestra en la Figura 3.4. Los valores de actividades enzimáticas fueron los promedios de los obtenidos en los duplicados de los cultivos y sus repeticiones.

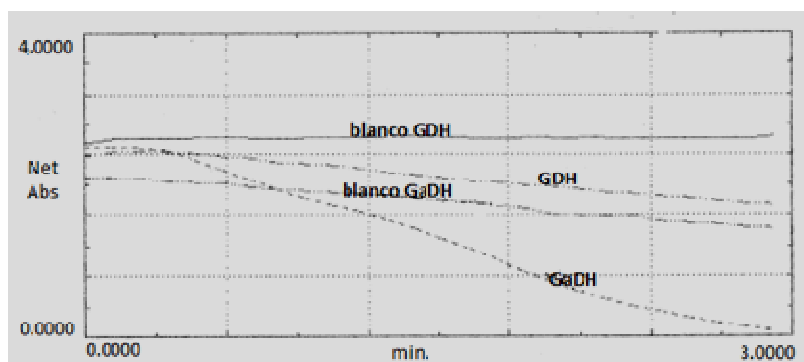


Figura 3.4 Gráfica de una medida de actividad enzimática.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Ensayos cualitativos de solubilización de fósforo en medio sólido

3.3.1 a – Evaluación de la solubilización de fosfato insoluble

B. tropica presentó un fenotipo MPS tal como lo reportado por Reis y colaboradores (2004). Se pudo determinar que con todas de las FCE utilizadas hubo crecimiento microbiano. Con glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, sacarosa y lactosa se formaron halos transparentes alrededor de las colonias, siendo todos éstos sustratos de la enzima mGDH, o el producto de su hidrólisis (Figura 3.3 A). No se formaron halos de solubilización de P con manitol, gluconato de sodio, glicerol y fructosa (Figura 3.3 B), indicando que hubo solubilización de PTC sólo utilizando aldosas como fuente carbonada. En el caso del microorganismo empleado como control positivo de solubilización de P, *G. diazotrophicus*, dado que la ruta principal del metabolismo de aldosas para este microorganismo es la catalizada por la mGDH periplasmática y el producto de la misma es el ácido orgánico correspondiente, también se observó solubilización del PTC en aquellos casos en que la fuente de carbono fue sustrato de esta enzima.

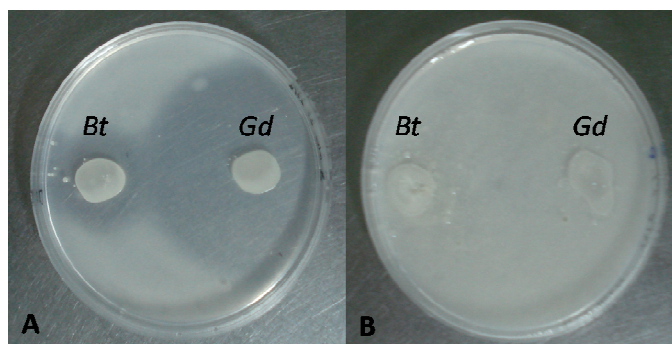


Figura 3.3 Placas con medio NBRIP que muestran halos de solubilización para los fenotipos MSP. Medio de cultivo con glucosa (A) y fructosa (B). *Bt*: *B. tropica* y *Gd*: *G. diazotrophicus* (control positivo).

3.3.1 b – Evaluación de la producción de ácidos orgánicos

En los ensayos en placa en NBRIP con indicador de pH, se observó que *B. tropica* sólo produjo viraje del indicador hacia el rojizo (pHs ácidos) cuando el medio contenía glucosa y P insoluble (Figuras 3.4 A y B), indicando que existe producción de ácidos, probablemente por la ruta de oxidación de aldosas, pero no cuando se utiliza P soluble.

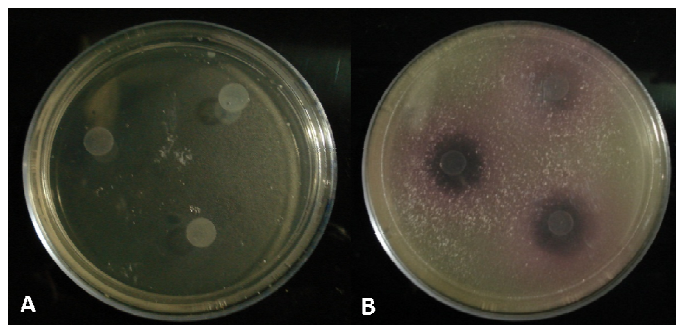


Figura 3.4 Placas con medio NBRIP con indicador de pH que muestran el viraje hacia pH ácidos. Medio con glucosa y PS (A), y con glucosa y P insoluble (B).

3.3.2 Ensayos de solubilización de fósforo en medio líquido

3.3.2 a - Cultivos batch en erlenmeyer

Crecimiento en condiciones de No FBN

Con el objetivo de evaluar la producción de ácidos orgánicos por *B. tropica*, se realizaron cultivos batch en erlenmeyers bajo condiciones de No FBN y con P soluble empleando glucosa como FCE en dos concentraciones: 10 y 30 g/l. En ambos casos, se observó una disminución significativa de pH (tal como se observó en el Capítulo 2) coincidente con la fase exponencial de crecimiento (Figura 3.5 A y B) y consumo de glucosa, aunque no se detectó ácido glucónico en los sobrenadantes de dichos cultivos. Por otro lado, y en concordancia con estos resultados, tampoco se registró actividad de mGDH en ninguno de los dos casos, aún cuando se preincubó con PQQ. Los cultivos con glucosa 30 g/l fueron realizados después de no haber encontrado ácido glucónico en los sobrenadantes de los cultivos con glucosa 10 g/l y suponiendo que tal vez para desviar la glucosa hacia la ruta periplasmática el microorganismo podía necesitar elevadas concentraciones de azúcar en el medio. No obstante, los resultados indicaron que en presencia de PS y condiciones de No FBN no hubo expresión de la vía de oxidación directa de la glucosa independientemente de la concentración de glucosa en el medio.

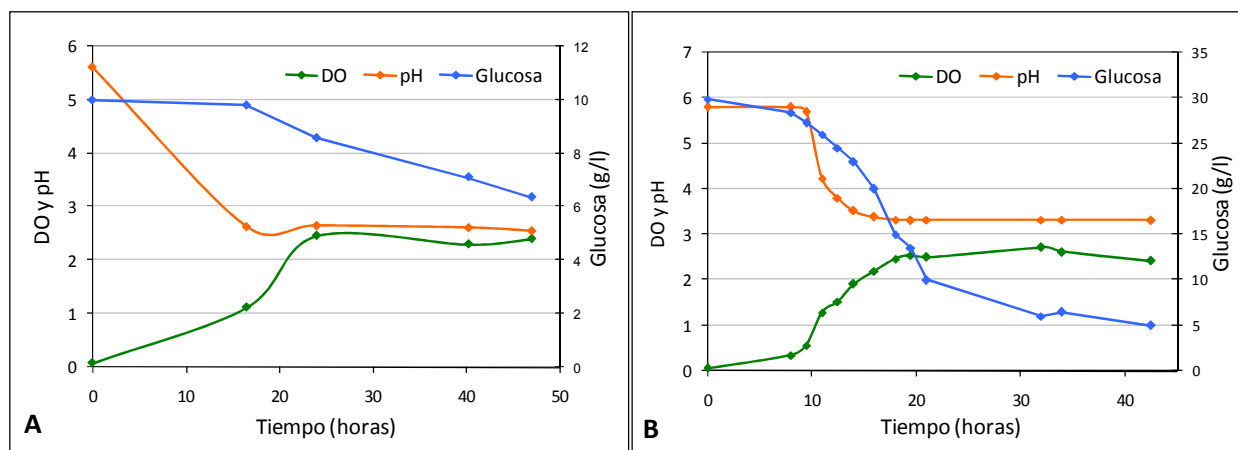


Figura 3.5 Curvas de crecimiento de *B. tropica* y consumo de sustrato bajo condiciones de No FBN y P soluble con 10 **(A)** y 30 **(B)** g/l de glucosa. Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes.

En estos cultivos el descenso del pH observado estaría dado sólo por la liberación de protones que se producen por la asimilación del amonio del medio de cultivo, ya que no se registró producción de ácidos orgánicos bajo estas condiciones de cultivo. A pesar de no haber producción de ácido glucónico, la concentración de glucosa fue disminuyendo a lo largo del cultivo como consecuencia del crecimiento microbiano, indicando que si posee la ruta metabólica de oxidación periplasmática de aldosas, bajo estas condiciones ésta no sería la principal ruta de metabolismo de la glucosa. Paralelamente a la medida de mGDH se midió también GaDH y se observó una elevada actividad enzimática alrededor de las 20 hs, que fue descendiendo a lo largo del cultivo hasta no detectarse al final del mismo (Tabla 3.2), para ambas concentraciones de glucosa.

En el siguiente ensayo, y con el objetivo de evaluar si *B. tropica* presenta la vía de la mGDH en condiciones de deficiencia de P, se llevaron a cabo cultivos con 10 y 30 g/l de glucosa y con PTC como única fuente de P en condiciones de No FBN. Se observó nuevamente un descenso del pH en la fase de crecimiento pero en este caso fue concomitante con la producción de ácido glucónico y el aumento de fósforo soluble en el sobrenadante (Figura 3.6). El pH disminuyó en menor proporción y más lentamente que en los cultivos con PS. Este comportamiento se debe a que los H⁺ liberados son intercambiados con los iones Ca⁺² para solubilizar el PTC y no contribuyen a descender el pH del medio. Además cuando comienza a consumirse el ácido glucónico, que ingresa a la célula cargado negativamente, el pH aumenta. Se observa que cuando aumenta la concentración de ácido glucónico, el pH desciende y el PS en el sobrenadante aumenta (Figura 3.6).

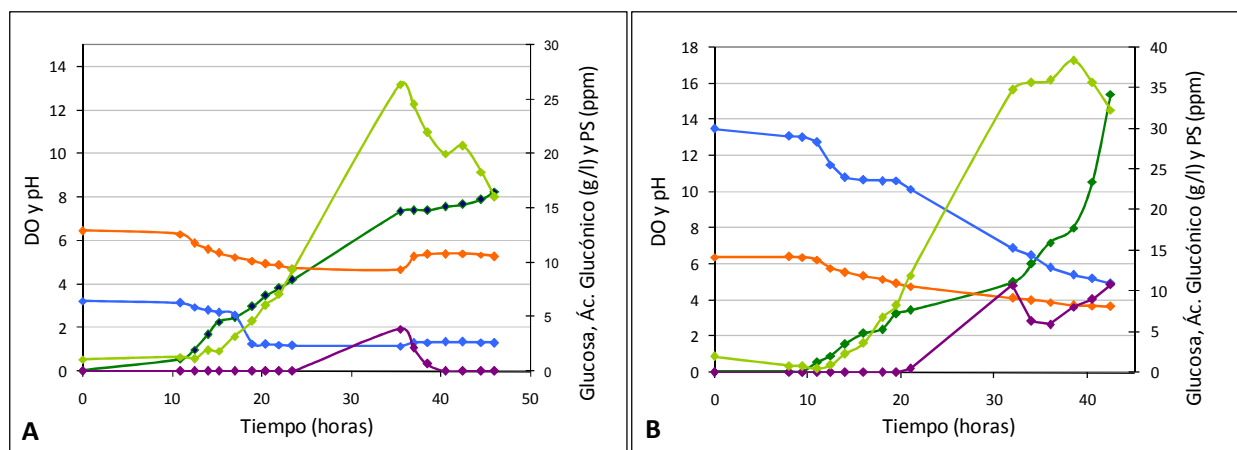


Figura 3.6 Curvas de crecimiento de *B. tropica*, consumo de sustrato y producción de productos bajo condiciones de No FBN con 10 (A) y 30 (B) g/l de glucosa y PTC. Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes. ■ DO*10 ■ pH ■ Glucosa ■ Ác. glucónico ■ PS

Como era de esperar, se registró actividad de mGDH coincidentemente con la aparición de ácido glucónico en el medio (Tabla 3.2). Se registró también actividad de GaDH, la cual mostró un perfil en el tiempo similar al de la actividad mGDH (Figura 3.7). Para ambas enzimas las actividades máximas se registraron en fase exponencial, alrededor de las 17-20 horas. Por este motivo las muestras de células para las medidas de actividad enzimática se tomaron en esos tiempos para todos los cultivos.

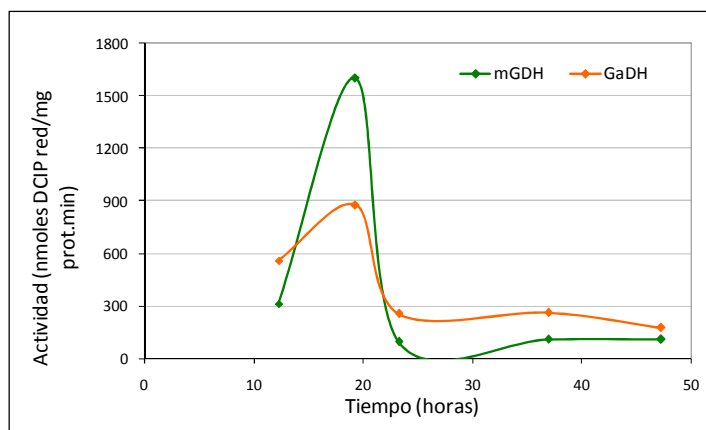


Figura 3.7 Medidas de actividad mGDH y GaDH en condición de No FBN con 30 g/l de glucosa y PTC. Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes

Con los resultados de este ensayo se podría concluir que en *B. tropica*, al igual que lo reportado para *Erwinia herbicola* y *Enterobacter asburiae* PSI3 (Goldstein y Liu, 1987; Gyaneshwar *et al.*, 1999), se activa la vía de oxidación periplasmática de aldosas cuando hay baja disponibilidad de PS, siendo posible que la mGDH sea reprimida por elevadas concentraciones de P (ya sea a nivel de la apoenzima, del cofactor PQQ o de holoenzima) o bien que fuera activada en situaciones de *stress*, en este caso nutricional.

Se realizaron cultivos con glicerol en lugar de glucosa como FCE en los que no se registró ácido glucónico en los sobrenadantes, el pH fue cercano a 7,00 y el P soluble en el sobrenadante fue de <10 ppm. No obstante, se observó actividad de mGDH sólo en cultivos con PTC como única fuente de P, al igual que lo ocurrido cuando la FCE fue glucosa, aunque los valores de actividad fueron menores (Tabla 3.2). Independientemente del valor máximo de actividad mGDH, estos cultivos tuvieron el mismo comportamiento que los cultivos con glucosa en cuanto a la activación de la vía de oxidación directa de aldosas, pero no se requirió la presencia de glucosa para activarla. Dada la escasa producción de biomasa en las primeras horas de estos cultivos, se pudieron realizar las medidas enzimáticas recién a las 43 hs de crecimiento. En ninguno de los cultivos se detectó ácido 2-cetoglucónico medido por HPLC.

Condiciones de cultivos		Act mGDH (nmoles DCIP red/min.mg prot)	Concentración de ác. glucónico (g/l)	Act GaDH (nmoles DCIP red/min.mg prot)
No FBN	Glucosa 10/30 g/l - PS	ND	ND	412 ± 25
	Glucosa 10/30 g/l - PTC	416 ± 16	15,4 ± 1,5	617 ± 51
	Glicerol 30 g/l - PS	ND	ND	215 ± 16
	Glicerol 30 g/l - PTC	167 ± 16	ND	104 ± 17

Tabla 3.2. Valores de actividad de mGDH, de producción de ácido glucónico y de actividad GaDH obtenidos en condiciones de No FBN de cultivos *batch* en erlenmeyer. ND: no detectado. Cada valor corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes.

Estos resultados indicaron que la vía periplasmática se activó sólo bajo condiciones de *stress* nutricional, en este caso correspondiente a una baja disponibilidad de PS, independientemente de la FCE empleada. En cultivos con PTC el microorganismo fue capaz de expresar la holoenzima sin necesidad de la incorporación de fuentes externas de PQQ. También se observó que no es necesaria la presencia del sustrato de la enzima en el medio para que ésta se encuentre en su forma activa.

Del análisis de estos resultados se puede concluir que cuanto mayor es la concentración de ácido glucónico en el sobrenadante mayor es la cantidad de fósforo solubilizado (Figura 3.8), pudiendo considerar a éste como el responsable de la solubilización de P en estos cultivos.

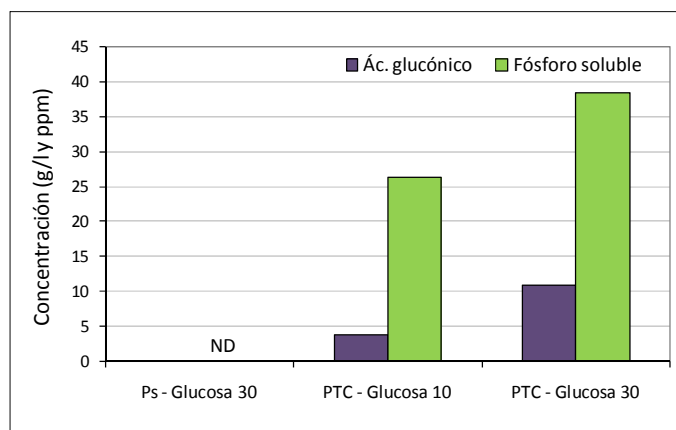


Figura 3.8 Concentración de fósforo (ppm) y ácido glucónico (g/l) en el sobrenadante de cultivos de *B. tropica* creciendo en distintas condiciones de No FBN. ND: ácido glucónico no detectado. El medio con PS tiene más de 100 ppm de P.

Crecimiento en condiciones de FBN

En estos cultivos se registró un descenso de pH, que estaría dado no solo por la liberación de H^+ producida por la asimilación del amonio, sino también por la producción de ácido glucónico registrada independientemente de la fuente de P empleada. Esto indicaría que no hubo represión por PS y que condiciones de FBN fueron suficientes para activar la vía de la mGDH. Cuando la FBN se llevó a cabo en un medio con PTC, se observaron concentraciones de ácido glucónico mayores que las obtenidas para la condición con PS. (Figuras 3.9 y 3.10). A partir de estos resultados, se pudo determinar nuevamente que con PTC en el cultivo, el pH no descendió demasiado, debido a que los H^+ del ácido glucónico solubilizan los fosfatos insolubles y no quedan tantos H^+ libres en solución.

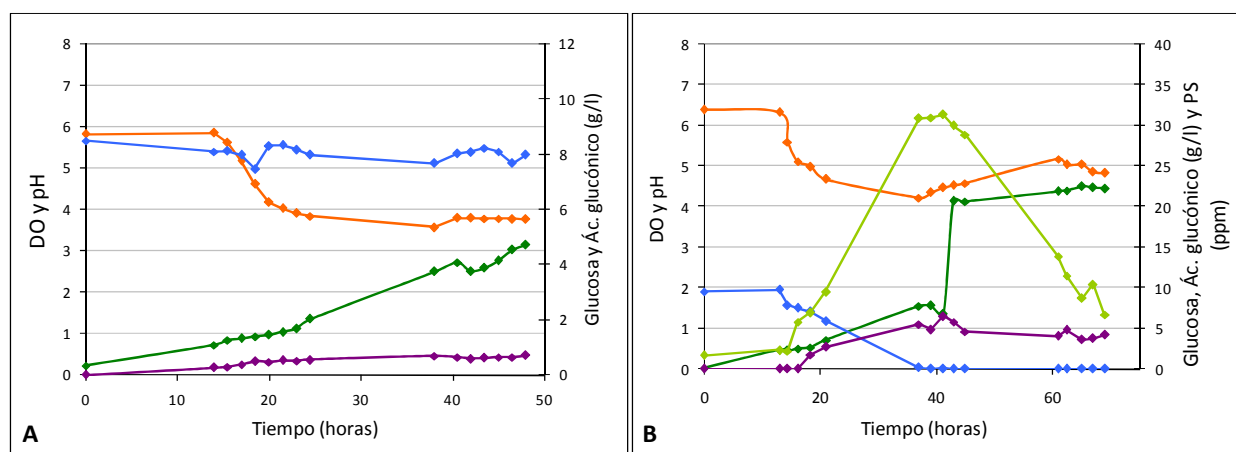


Figura 3.9 Curvas de crecimiento de *B. tropica* en condiciones de FBN con 10 g/l de glucosa y P soluble (A) y con 10 g/l de glucosa y PTC (B). Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes. ■ DO*10 ■ pH ■ Glucosa ■ Ác. glucónico ■ PS

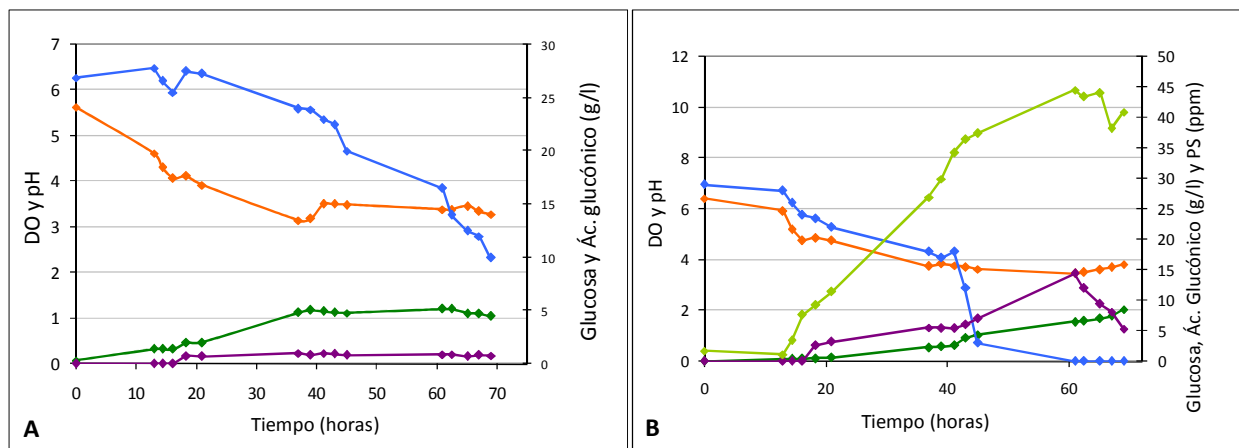


Figura 3.10 Curvas de crecimiento de *B. tropica* en condiciones de FBN con 30 g/l de glucosa y P soluble (A) y con 30 g/l de glucosa y PTC (B). Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes. ■ DO ■ pH ■ Glucosa ■ Ác. glucónico ■ PS

Se registró actividad de mGDH tanto en cultivos con PS como con P insoluble (Tabla 3.3), y aunque esa medida de actividad fue semejante, el flujo de FCE fue desviado en mayor proporción hacia la ruta de oxidación directa de la glucosa en el caso de P insoluble y FBN (se observó mayor producción de ácido glucónico), es decir, cuando se imponían ambas condiciones de *stress* al mismo tiempo, nutricional y energético respectivamente.

Al igual que con los cultivos creciendo bajo No FBN, también se estudió el crecimiento utilizando glicerol 30 g/l como FCE, en lugar de glucosa, tanto con PS como con PTC (Tabla 3.3).

Condiciones de cultivos		Act mGDH (nmoles DCIPred/min.mg prot)	Concentración de ác. glucónico (g/l)	Act GaDH (nmoles DCIPred/min.mg prot)
FBN	Glucosa 30 g/l - PS	147 ± 43	4,2 ± 0,5	287 ± 63
	Glucosa 30 g/l - PTC	232 ± 47	10,9 ± 2,9	411 ± 36
	Glucosa 10 g/l - PS	100 ± 45	1,3 ± 0,3	450 ± 63
	Glucosa 10 g/l - PTC	221 ± 57	4,1 ± 1,5	637 ± 98
	Glicerol 30 g/l - Ps	91 ± 12	ND	218 ± 23
	Glicerol 30 g/l - PTC	107 ± 14	ND	119 ± 60

Tabla 3.3 Valores de actividad de mGDH, de producción de ácido glucónico y de actividad GaDH obtenidos en condiciones de FBN de cultivos *batch* en erlenmeyer. ND: no detectado.

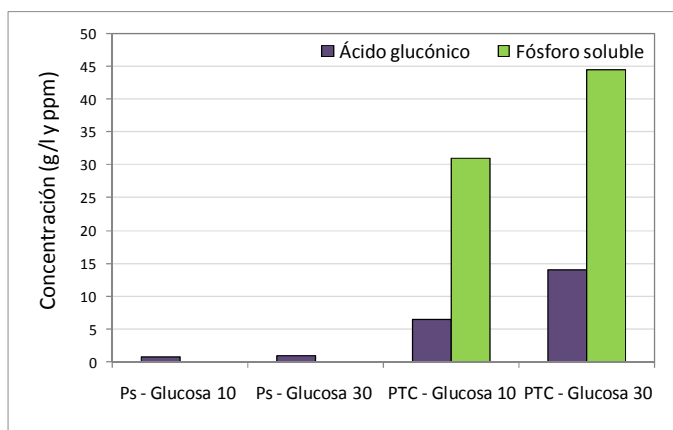


Figura 3.11 Concentración de ácido glucónico y fósforo en el sobrenadante de cultivos de *B. tropica* creciendo en distintas condiciones de FBN. Los medios con PS tienen más de 100 ppm de P.

En resumen, en cultivos *batch* con glucosa como FCE y PTC como única fuente de P, los niveles de P solubilizado determinados a lo largo del cultivo se correlacionaron de manera directa con la producción de ácido glucónico, siendo esta última más elevada en condiciones de *stress* energético tales como la baja disponibilidad de P (cultivos con PTC) y la FBN, como se muestra en la Figura 3.12.

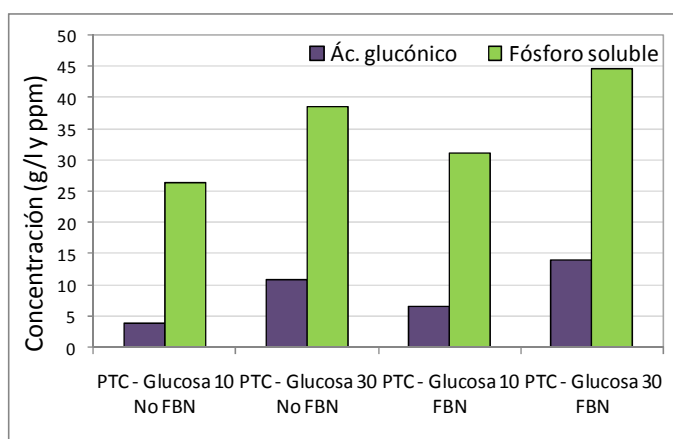


Figura 3.12 Concentración de ácido glucónico y PS de cultivos de *B. tropica* creciendo con PTC.

A partir de los resultados de todos los ensayos realizados con *B. tropica* creciendo bajo diferentes condiciones en cultivos *batch* en erlenmeyer, se observó que: 1- *B. tropica* posee la vía periplasmática de oxidación de aldosas, mediada por una mGDH que se encuentra activa bajo determinadas condiciones de cultivo; 2- el ácido glucónico se registró como el único producto de esta vía y como el responsable de la solubilización de compuestos de P insoluble en cultivos con glucosa como única FCE; y 3- condiciones de *stress* nutricional y energético tales como la baja disponibilidad de P (cultivos con PTC) y la FBN, respectivamente, fueron suficientes para activar la producción de ácido glucónico por la vía periplasmática de oxidación de aldosas.

3.3.2 b - Cultivos batch en biorreactor

Se realizaron cultivos *batch* de *B. tropica* con glucosa, PS y No FBN en biorreactores, con el objetivo de controlar el pH y determinar si esta variable afectaba los resultados obtenidos en cultivos en erlenmeyer. No se observó producción de ácido glucónico ni actividad de mGDH en cultivos sin y con control de pH, aún cuando células provenientes de ambos cultivos creciendo en fase exponencial se preincubaron con PQQ. Por tal motivo, se realizó un pulso de PQQ cuando el cultivo transcurría en la fase exponencial (17-20 hs). Se tomaron muestras para medir producción de ácido glucónico, consumo de glucosa, peso seco y actividad de mGDH, antes y después del pulso. Los resultados obtenidos muestran que después de 1 hora del pulso de PQQ se detectó ácido glucónico en el sobrenadante de los cultivos (Figura 3.13). Esta producción coincidió con la detección de actividad de mGDH medida indirectamente con DCIP y sin el agregado de PQQ exógeno (Tabla 3.4).

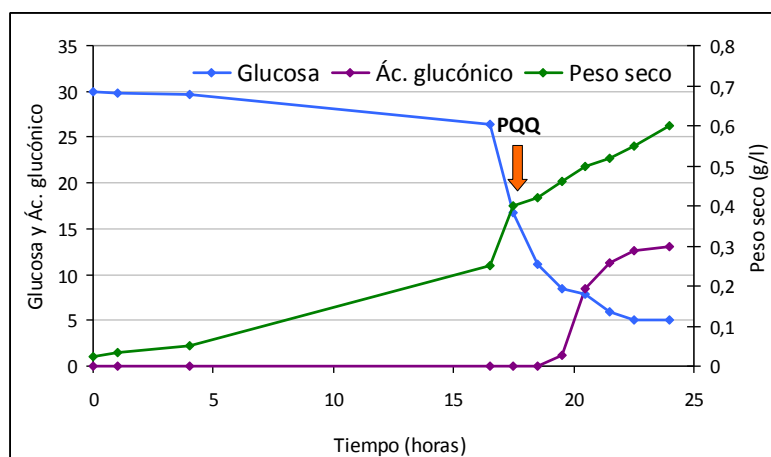


Figura 3.13 Curva de crecimiento de *B. tropica* en biorreactor bajo No FBN con glucosa 30 g/l y P soluble a pH constante. Se indica con una flecha la adición del pulso de PQQ. Cada punto corresponde al promedio de los valores obtenidos en dos ensayos independientes.

Estos resultados mostraron que el agregado de PQQ al cultivo activó la ruta de oxidación periplasmática de aldosas mediada por la mGDH, confirmando que la producción de glucónico estaba mediada por el cofactor PQQ.

Actividades	Act. enzimática (nmoles DCIP red/min.mg prot)
GDH	224 ± 34
GaDH	328 ± 20

Tabla 3.4 Actividad específica de mGDH y GaDH (nmoles DCIP red/min.mg prot) en células de *B. tropica* provenientes del biorreactor bajo No FBN, glucosa 30 g/l y P soluble 5 horas después del pulso con PQQ.

En los ensayos de pulsos con PQQ a los que se les adicionó previamente cloranfenicol (inhibidor de la síntesis proteica) para evaluar si la apoenzima se encontraba sintetizada previamente o si su síntesis era inducida a partir del pulso con PQQ, no se modificaron los resultados de los pulsos, indicando que en la activación de la holoenzima mGDH *in vivo* no estaría involucrada la síntesis de proteínas.

3.4 CONCLUSIÓN

Como se describió anteriormente, la mayoría de las bacterias que muestran el fenotipo MPS convierten la glucosa extracelular rápida y estequiométricamente a ácido glucónico a través de una mGDH, siendo ésta considerada la principal vía catabólica de la glucosa en estas bacterias. En estos microorganismos la enzima mGDH normalmente se expresa en forma constitutiva, aunque modulada por los requerimientos de carbono y energía, y de otros nutrientes (Luna *et al.*, 2000). El análisis de los resultados de este trabajo indica que:

1. *B. tropica* MTo-293 expresa un fenotipo MPS sólo en presencia de aldosas. En cultivos líquidos con PTC y glucosa, se registró ácido glucónico concomitantemente con el aumento de fósforo soluble, siendo el único producto registrado en el sobrenadante de los cultivos y ligado a la actividad mGDH. La obtención de mutantes fenotípicamente no productores de ácido será necesaria para confirmar si esta vía es la única responsable de la solubilización de estos compuestos.
2. La vía oxidativa directa no es la principal vía de utilización de azúcares de aldosa por esta bacteria, contrariamente a lo que se ha informado para otras bacterias que expresan un fenotipo fuerte de MPS (Goldstein *et al.*, 1995; Lesslie *et al.*, 1984). Sólo bajo condiciones de baja disponibilidad de P y/o FBN (*stress* nutricional y energético, respectivamente) se puede detectar la vía oxidativa directa independientemente de la FCE utilizada, glucosa o glicerol. Condiciones de *stress* energético tal como la FBN son suficientes para activar esta vía periplasmática de oxidación, pero la baja disponibilidad de P contribuye a que bajo FBN se redireccione el flujo de FCE hacia la vía periplasmática.
3. En algunos microorganismos, el fenómeno de respuesta inducible por baja disponibilidad de P implica la regulación de genes específicos y varios de éstos también son inducibles por otras condiciones de *stress* (Bernardelli *et al.*, 2001, Buurman *et al.*, 1994, Goldstein y Liu, 1987; Goldstein *et al.*, 1999). Para *B. tropica* MTo-293 la disponibilidad de P parece desempeñar un papel importante en la regulación de genes relacionados con la expresión de una mGDH activa y al igual que para otros microorganismos parece no estar regulada por la síntesis de la apoenzima sino por la presencia del cofactor PQQ. Los cultivos en biorreactor con PS, N fijado y control de pH condujeron a la expresión de mGDH sólo después del agregado de PQQ exógeno. En estas condiciones, *B. tropica* MTo-293 no sólo fue incapaz de expresar una mGDH activa sino que también necesitó un metabolismo activo para poder producir ácido glucónico. La obtención de mutantes en alguno de los genes que intervienen en la biosíntesis de PQQ y su ensamblaje para dar una mGDH activa será necesaria para conocer claramente los mecanismos bioquímicos y genéticos que regulan la biosíntesis de la holoenzima.
4. La actividad GaDH se registró en todos los cultivos, indicando que es una enzima constitutiva, pero no se registró producción de ácido 2-cetoglucónico a los tiempos ensayados.

Capítulo 4

Caracterización de la colonización de plantas de
trigo y sorgo por *Burkholderia tropica*

Capítulo 4

Caracterización de la colonización de plantas de trigo y sorgo por *Burkholderia tropica*

4.1 RESUMEN

La ausencia de respuesta a la aplicación de inoculantes a base de PGPB incorporados como tratamientos de semillas de gramíneas generalmente es atribuida a la incapacidad de los microorganismos de colonizar eficientemente las raíces de las plantas. En el presente capítulo, se describen ensayos que permitieron caracterizar algunos aspectos de la colonización de *B. tropica* MTo-293 en trigo y sorgo post-inoculación de semillas de estas gramíneas, en diferentes sistemas de cultivo de plantas: desde condiciones gnotobióticas hasta tierra no estéril. En todos los sistemas se cuantificaron las poblaciones superficiales y endofíticas de *B. tropica* MTo-293 en la raíz por el método directo de dilución en placa. En plantas crecidas en condiciones gnotobióticas también se emplearon técnicas microscópicas independientes de cultivo para determinar los sitios de colonización y el carácter endofítico del microorganismo en estudio haciendo uso de las cepas *B. tropica-gus* y *B. tropica-gfp*. Se pudo evidenciar que *B. tropica* MTo-293 fue capaz de: 1- colonizar eficientemente el rizoplasma y los tejidos internos de otras plantas diferentes a su huésped original, presentando un carácter endofítico en plantas de trigo y sorgo crecidas en condiciones gnotobióticas y en tierra estéril; 2- colonizar eficientemente las raíces de ambas gramíneas cuando se inocularon con menos de 10 microorganismos por semilla y fueron crecidas en sistema agarizado estéril, encontrándose una diferencia temporal en la colonización endofítica con respecto a la superficial; 3- colonizar el rizoplasma eficientemente en plantas crecidas en tierra no estéril, con valores de poblaciones del orden de 1.10^6 UFC/gramo de raíz, evidenciando su rizocompetencia, ya que se encontraron valores de poblaciones del mismo orden de otros microorganismos compitiendo por el mismo nicho; 4- colonizar tallos tanto superficial como endofíticamente en todas las condiciones de crecimiento evaluadas. No se encontró colonizando raíces endofíticamente en plantas crecidas en tierra no estéril con las metodologías utilizadas en estos ensayos, considerando necesaria la evaluación de muestras de tejidos a tiempos mayores, así como el empleo de protectores que aumenten la supervivencia en la semilla, entre otros.

Algunos de los resultados de este Capítulo contribuyeron a la publicación de un artículo en 2015: **Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica***. Autores: Bernabeu PR, Pistorio M, Torres-Tejerizo G, Estrada-de los Santos P, Galar ML, Boiardi JL, Luna MF. Scientia Horticulturae. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.014>.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Organismos y condiciones de cultivo

En todos los ensayos del presente Capítulo se utilizó *B. tropica-gfp*, no sólo por su característica de presentar fluorescencia al ser iluminada con luz UV, sino también por su resistencia al antibiótico Tc. También se utilizó la cepa *B. tropica-gus* para los ensayos de microscopía de campo claro. Los microorganismos se hicieron crecer en cultivos en erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio LGI líquido modificado de acuerdo al ensayo: 1- con 10 g/l de glicerol y 1 g/l de EL en los ensayos en condiciones gnotobióticas (semillas desinfectadas en soporte estéril); 2- con 15 g/l de glicerol y 2 g/l de EL en los ensayos condiciones no-gnotobióticas (semillas no desinfectadas en soporte estéril o no estéril). Un volumen apropiado de cada cultivo se utilizó como inóculo para sembrar los medios de cultivo donde se crecieron las bacterias por 48 horas en las mismas condiciones y se utilizaron para inocular semillas de trigo y sorgo en todos los ensayos. Se determinó en forma directa el número de bacterias viables en la suspensión final de los cultivos mediante la técnica de dilución en placa, como se detalló anteriormente. En los ensayos en condiciones no-gnotobióticas, se adicionó Tc (10 mg/ml) al medio LGI agarizado.

Se utilizaron semillas de trigo variedad Baguette 9 (Nidera Semillas), de sorgo variedad Energía (KWS) y de tomate variedad Superman (Seminis).

ENSAYOS EN CONDICIONES GNOTOBIÓTICAS

Con el fin de determinar si *B. tropica* y sus variantes genéticamente modificadas se podían considerar equivalentes, previamente a los ensayos con trigo y sorgo que se describen a continuación, se realizaron ensayos de co-inoculación en plantas de tomate, que contribuyeron a la conclusión y publicación de un artículo, como se describió previamente. El ensayo que fue realizado en el marco de esta Tesis doctoral se detalla en el Anexo 4.

4.2.2 Cuantificación de la población superficial y endofítica de *B. tropica* en tejidos de plantas

Se determinó la población bacteriana superficial y endofítica mediante técnicas dependientes de cultivo con el objetivo de evaluar la eficiencia de colonización de *B. tropica* en raíces y tallos de plantas de trigo y sorgo PI de las semillas, crecidas en condiciones gnotobióticas según el siguiente protocolo:

- 1- Desinfección superficial de las semillas.
- 2- Inoculación de las semillas con *B. tropica-gfp*.
- 3- Crecimiento de las plantas en un soporte agarizado estéril.

4- Cuantificación de *B. tropica* en tejidos con o sin desinfección superficial a distintos tiempos PI, por técnica de dilución en placa.

Para eliminar la carga microbiana asociada a las semillas de trigo y sorgo, las mismas se desinfectaron superficialmente según el siguiente protocolo:

- 3 lavados de 1 minuto cada uno con agua destilada estéril
- 1 lavado de 10 minutos con solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% v/v
- 1 lavado de 1 minuto con agua destilada estéril
- 2 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada estéril

Una vez desinfectadas las semillas, se retiró el líquido excedente y se dejaron airear en condiciones de esterilidad. Luego, se sumergieron en el inóculo bacteriano por 20 minutos y se retiró el líquido excedente. Se realizó un control de semillas no inoculadas, las cuales fueron tratadas de igual manera pero fueron sumergidas en agua destilada estéril en lugar del inóculo bacteriano. Se colocaron entre 6 y 8 semillas en frascos con solución de Fåhraeus estéril agarizada al 0,5% p/v a pH 6,00 y se cultivaron en condiciones de luz y temperatura controladas (ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 26°C) en cámara de cultivo, donde se mantuvieron hasta finalizar el experimento (Figura 4.1). Como control del proceso de desinfección de las semillas, éstas se colocaron en placas con medio LB agarizado a 30°C para la observación de crecimiento bacteriano alrededor de las mismas.



Figura 4.1 Frascos con solución de Fåhraeus agarizada utilizados como sistema de cultivo de plantas crecidas en condiciones controladas.

Para la cuantificación de la población bacteriana asociada a las raíces, tanto del rizoplasma como endofítica, se realizó el recuento en placa de los tejidos macerados de raíces no desinfectadas y desinfectadas, tanto inoculadas como no inoculadas, a distintos días PI. El cálculo de UFC del tejido desintegrado se expresó por gramo de peso fresco de raíz. Las UFC de muestras de tejidos sin desinfectar representaron a la población bacteriana total (las endófitas y las que se encuentran sobre el rizoplasma). Las UFC obtenidas a partir de raíces desinfectadas constituyen la población endofítica.

La diferencia entre la población total y la endofítica corresponde a la población del rizoplasma (Gyaneshwar *et al.*, 2001).

A distintos tiempos PI, por triplicado y en condiciones de esterilidad, se tomaron las raíces se colocaron en tubos estériles previamente tarados. Luego, se pesó el tubo con raíz para determinar el peso de la raíz por diferencia. A todas las raíces se les realizó un lavado de dos minutos con 8 ml de solución fisiológica estéril con Tween 80 (0,1% v/v). Para la determinación de la población del rizoplasma, se realizó solo este lavado. Para el estudio de la población endofítica, se realizó posteriormente un lavado de 5 minutos con solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v (Luna *et al.*, 2010), seguido de tres lavados de dos minutos con solución fisiológica estéril con Tween 80 (Figura 4.2). Se retiró todo el líquido y se adicionó a cada tubo 1 ml de solución fisiológica estéril, como control del último lavado.

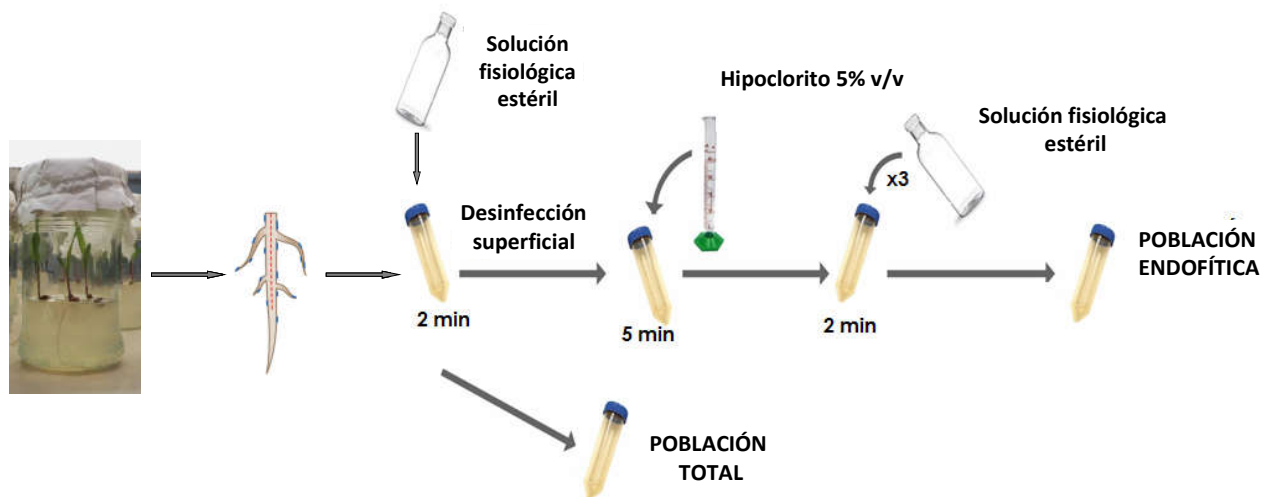


Figura 4.2 Esquema general del tratamiento de los tejidos para la evaluación de las poblaciones total y endofítica de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas.

Se realizaron 3 controles para asegurar la eficiencia del proceso de desinfección (Luna *et al.*, 2012): 1- tejidos desinfectados de plantas inoculadas con *B. tropica-gfp* fueron observadas por microscopía de fluorescencia; 2- tejidos desinfectados de plantas inoculadas se apoyaron sobre placas con medio LGI, luego se retiraron y las placas se incubaron 24 hs a 30°C; 3- un volumen de la solución del último lavado de estos tejidos se sembró en placas con medio LGI y se incubaron 24 hs a 30°C.

Cada raíz se trituró en un mortero desinfectado con alcohol 70% v/v y lavado con solución fisiológica estéril. Una vez macerados los tejidos, se adicionó 1 ml de solución fisiológica estéril y se pasó cada suspensión a tubos estériles, para realizar las diluciones seriadas (1/10) necesarias para llevar a cabo el recuento. Se sembraron 100 µl de las diluciones correspondientes en placas con medio LGI agarizado (por triplicado) y se llevaron a estufa a 30°C durante 24 horas (Figura 4.3).

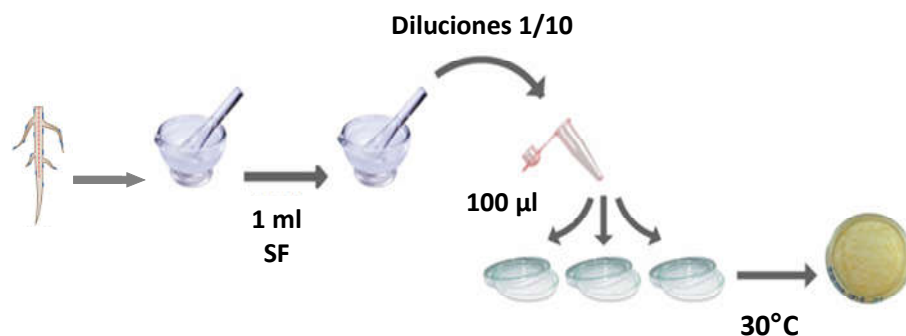


Figura 4.3 Macerado de raíces en mortero y siembra en medio sólido para el recuento de las poblaciones del rizoplano y endofítica.

Para la realización del recuento bacteriano en tallos de trigo y sorgo, se tomó en cada caso una porción de tallo de aproximadamente 5 cm por encima de la raíz (por triplicado), y se procedió de manera similar que para el recuento en raíces, pero con un tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio al 5% v/v de 2 minutos. Como control de desinfección, los tallos fueron apoyados en placas con medio LGI agarizado, como se realizó con las raíces. Posteriormente, los tallos fueron macerados como se mencionó anteriormente, y se procedió al recuento mediante la técnica de dilución en placas con medio LGI agarizado.

Se realizaron tres ensayos independientes para cada especie vegetal. Los valores de las poblaciones obtenidos a cada tiempo se promediaron y se utilizaron para realizar los gráficos de logaritmo de UFC/gramo de tejido en función del tiempo.

4.2.3 Técnicas microscópicas para visualizar las bacterias inoculadas

Se utilizaron tres técnicas microscópicas con el fin de determinar los sitios de colonización de *B. tropica* en raíces de trigo y sorgo PI de las semillas de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas.

4.2.3 a - Microscopía de campo claro

Se realizó la detección histoquímica de la actividad de la enzima β -glucuronidasa (Jefferson *et al.*, 1986) en raíces de plantas de trigo y sorgo inoculadas con la cepa de *B. tropica-gus* a diferentes días PI. Se analizaron 3 raíces de cada especie por día durante la primera semana PI, y se realizaron también controles no inoculados. La mezcla de reacción empleada se detalla en la Tabla 4.1. Se lavó la raíz con buffer Na_2HPO_4 100 mM a pH 7,00, se sumergió en la mezcla reactiva, se incubó a 37°C durante 24 horas, se descartó la mezcla y se lavaron las raíces 3 veces con *buffer* Na_2HPO_4 100 mM a pH 7,00. La actividad de la enzima se manifiesta mediante la aparición de coloración azul. Se observaron las raíces enteras con microscopio de campo claro.

Componente	Concentración (μ l)
Triton X-100 (1% v/v)	100
EDTA 2 mM (en <i>buffer</i> Na ₂ HPO ₄ pH 7,00)	50
Ferricianuro de potasio	100
Proteinasa Sarcosyl 2 g/ml	0,5
<i>Buffer</i> Na ₂ HPO ₄ 100 mM pH 7,00	250
X-Gluc (en N,N-dimetilformamida) 2 mM	100
H ₂ O destilada	400

Tabla 4.1 Composición de la mezcla de reacción para la detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa.

4.2.3 b - Microscopia de epi-fluorescencia

Se observaron raíces de trigo y sorgo utilizando microscopia de epi-fluorescencia para registrar la colonización por la cepa *B. tropica-gfp* empleando un microscopio Leica DM 2500 equipado con una cámara digital Leica DFC300 FX. Para las observaciones de raíces enteras, se analizaron múltiples plantas inoculadas y no inoculadas hasta los 15 días PI, se lavaron con agua destilada y se colocaron entre porta y cubreobjetos para su posterior visualización. Se observaron también raíces de plantas inoculadas desinfectadas superficialmente según fue descrito en el ensayo anterior. Por otro lado, se realizaron cortes transversales de raíces de trigo y sorgo a los 10 días PI. Para la realización de los mismos, las raíces desinfectadas superficialmente se inmovilizaron en medio de montaje para congelación (Biopack) y se llevaron a -20°C. Una hora antes de la realización de los cortes se colocaron a -80°C. Se utilizó un criótomo (Thermo Shandon) para la realización de cortes de 40 μ m de espesor. Los cortes se colocaron entre porta y cubre para la observación microscópica.

4.2.3 c - Microscopía de Escaneo Láser Confocal

Se observaron raíces de trigo y sorgo utilizando un microscopio confocal Leica SP5. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm (láser de argón). Se seleccionó una banda de emisión para detectar la proteína GFP (499-551 nm) y otra para la autofluorescencia del tejido vegetal (624-750 nm). Las imágenes obtenidas fueron posteriormente analizadas con el procesador de imágenes Leica Application Suite.

Se observaron cortes transversales de raíces, realizados como se detalló en el inciso anterior. Los cortes se colocaron entre porta y cubre para la observación microscópica, realizada con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 5 Pascal del Instituto Leloir, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, gentilmente facilitado por la Dra. Ángeles Zorreguieta. Se observaron cortes transversales de raíces a los 10 días PI. Se obtuvieron imágenes en diferentes planos del eje z con intervalos de 1 μ m. Las imágenes consecutivas obtenidas (denominadas *stack*) se analizaron con el procesador de imágenes Imaris (Bitplane).

ENSAYOS EN CONDICIONES NO- GNOTOBIÓTICAS

4.2.4 Ensayo de concentración de inóculo

Se realizaron diluciones seriadas del inóculo con agua destilada para evaluar la concentración de inóculo bacteriano necesaria para una eficiente colonización. Las concentraciones de inóculo ensayadas fueron: inóculo sin dilución (1), y diluciones 1.10^{-2} (2), 1.10^{-4} (3) y 1.10^{-6} (4), y su concentración exacta fue determinada por recuento de UFC/ml en medio LGI agarizado con Tc (10 mg/ml), como se describió previamente. Para la inoculación, se pesaron 150 gramos de semillas no desinfectadas de trigo o sorgo en bolsas de polietileno, se inocularon con 0,9 ml de cada dilución y 2,1 ml de agua destilada estéril (relación utilizada también en la inoculación de semillas en ensayo a campo, que corresponde a 600 ml de inoculante cada 100 kg de semillas) y fueron mezcladas manualmente para que el inoculante quede homogéneamente distribuido sobre las semillas. Las semillas inoculadas se colocaron en frascos con solución de Fåhraeus agarizada en condiciones controladas de luz y temperatura en cámara de cultivo como se describió previamente, hasta la finalización del ensayo. A distintos días PI se cuantificaron por el método de dilución en placa las poblaciones del rizoplasma y endofítica, tal como se describió previamente. Se realizaron controles adicionando agua destilada estéril en lugar del cultivo bacteriano. Se realizaron tres ensayos independientes, tomando en cada uno raíces por triplicado para analizar la población superficial o endofítica.

4.2.5 Cuantificación de la población bacteriana en tejidos de plantas en tierra estéril

Se utilizó la cepa *B. tropica-gfp* debido a la posibilidad de identificarla mediante la adición de Tc al medio de cultivo. Las semillas de trigo y sorgo no fueron desinfectadas superficialmente, y se utilizó el inóculo sin diluir, en la dosis ensayada en el inciso anterior (600 ml/100 kg de semillas).

Se utilizó una mezcla de tierra (Hi-Soil) y sustrato (Agua y sol; 50% tierra fértil, 50% compost y 20% resaca), en relación 1:1, con un pH de 5,70. La mezcla se esterilizó en autoclave durante una hora fraccionada en frascos de vidrio, y posteriormente se colocaron en cada uno entre 5 y 6 semillas de trigo o sorgo (Figura 4.4). Los frascos se colocaron en condiciones controladas de luz y temperatura en cámara de cultivo como se describió previamente. El riego se realizó cada dos días con agua destilada estéril en condiciones de esterilidad.



Figura 4.4 Frascos con tierra estéril utilizados como sistema de cultivo de plantas crecidas en condiciones controladas. Plantas de sorgo a los 4 (izquierda) y 7 días (derecha).

Para la cuantificación de la población bacteriana asociada a las raíces, tanto del rizoplasma como endofítica, se realizó el recuento por método de dilución en placa de los tejidos macerados de raíces no desinfectadas y desinfectadas, tanto inoculadas como no inoculadas, a distintos días PI.

Se tomaron raíces de plantas crecidas en tierra estéril (por triplicado) para el análisis cada tipo de población a distintos tiempos PI. Todas las raíces se lavaron tres veces con solución fisiológica estéril con Tween 80. Luego, para el estudio de la población endofítica, las raíces se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% v/v durante 5 minutos, y se lavaron tres veces con solución fisiológica estéril (Figura 4.5). Todas las raíces se maceraron como se detalló anteriormente. Se analizó la población superficial y endofítica de las raíces de plantas inoculadas y no inoculadas mediante recuento por método de dilución en placa como se describió previamente, en medio LGI agarizado con Tc (10 mg/ml). Se realizaron tres ensayos independientes para cada especie vegetal.

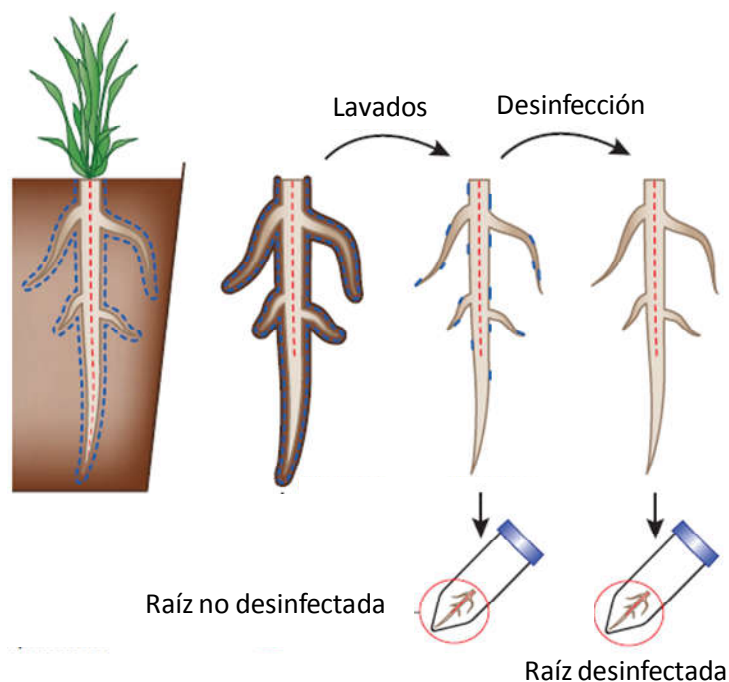


Figura 4.5 Esquema general del procesamiento de las raíces de plantas crecidas en tierra estéril, para la cuantificación de las poblaciones total y endofítica. Imagen adaptada de Hirsch *et al.*, 2012.

4.2.6 Cuantificación de la población bacteriana en raíces de trigo y sorgo en tierra no estéril

Se utilizaron semillas de trigo y sorgo no desinfectadas, y se inocularon con un cultivo de *B. tropica-gfp*, con la dosis ensayada en los incisos anteriores. También se analizaron plantas no inoculadas, tratadas con agua destilada en lugar de inóculo. La mezcla de tierra y sustrato fue colocada en macetas de 1 litro de capacidad. En cada maceta, se colocaron 3 semillas inoculadas o no inoculadas (Figura 4.6), y las mismas fueron colocadas en condiciones controladas de luz y temperatura en cámara de cultivo. El riego se realizó cada dos días con agua destilada.



Figura 4.6 Plantas de sorgo crecidas en macetas en condiciones controladas.

Por duplicado para cada tratamiento, a los 7 días PI se separó la raíz de las plantas y se sumergió en un volumen determinado de solución fisiológica estéril con Tween 80. Se agitó vigorosamente durante 5 minutos, y la suspensión resultante se consideró como la rizosfera (Figura 4.7). Se realizaron diluciones con solución fisiológica de esta suspensión y se sembraron en medio LGI agarizado con o sin Tc (10 mg/ml) como fue detallado anteriormente. Las raíces y los tallos (por duplicado para cada condición) y se lavaron tres veces con solución fisiológica estéril. Para el estudio de la población endofítica, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10% v/v durante 5 minutos y se lavaron tres veces con solución fisiológica estéril (Figura 4.7). Todas las muestras se maceraron como se mencionó anteriormente para el análisis de la población del rizoplasma y endofítica. La siembra de las muestras se realizó en medio LGI agarizado con y sin Tc (10 mg/ml), con el fin de poder analizar la población nativa (en medio sin Tc) y la población de *B. tropica* (en medio con Tc). Además, se analizaron raíces de plantas inoculadas a los 4 y 15 días PI para determinar la población del rizoplasma y endofítica de *B. tropica-gfp* mediante el mismo análisis descrito para los 7 días PI, utilizando medio LGI con Tc. Se realizaron tres ensayos independientes para cada especie vegetal.

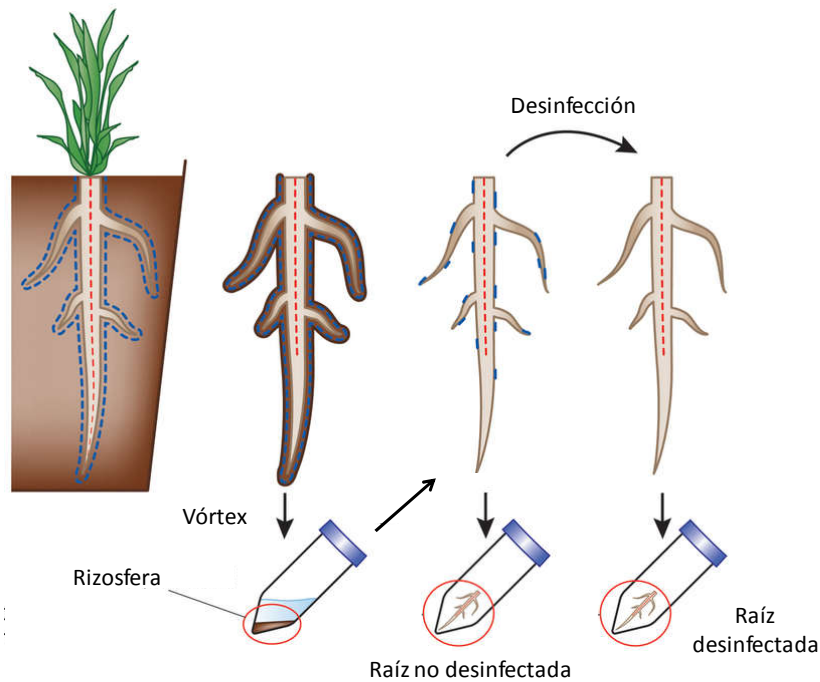


Figura 4.7 Esquema general del procesamiento de las raíces de plantas crecidas en tierra no estéril, para la cuantificación de las poblaciones de la rizosfera y de la raíz. Imagen adaptada de Hirsch *et al.*, 2012.

4.2.7 Identificación de *B. tropica* por técnicas de biología molecular

Con el fin de confirmar la identidad de las colonias halladas en los recuentos en placa de los ensayos realizados en las diferentes condiciones (gnotobióticas, no gnotobióticas), se extrajo el ADN de 2 aislamientos de cada ensayo. Se ensayaron dos técnicas de extracción de ADN (ver Anexo 4) para la posterior realización de la PCR con cebadores específicos para *B. tropica*, diseñados a partir de la secuencia del gen ARNr 16S. Dichos cebadores, denominados Btrop-F (5'-TAATACATCGGAACGTGCCT-3') y Btrop-R (5'-GGCCATATTAGGACCAAGGAT-3'), y las condiciones de amplificación fueron reportados por Wong-Villarreal y colaboradores (2010). Luego de la puesta a punto de las condiciones de la reacción (Ver Anexo 4), se llevó a cabo la PCR con los ADN obtenidos a partir de colonias aisladas obtenidas en el recuento en condiciones gnotobióticas, en tierra estéril y en macetas. Los productos de la PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (PB-L) 1,5% p/v en *buffer* TAE (Tris-Acetato-EDTA) teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml), a 100 voltios durante 30 minutos. La visualización de la amplificación en el gel se realizó por transiluminación ultravioleta (longitud de onda: 260 nm), y se registraron los resultados mediante fotografía de los geles con cámara digital Canon bajo iluminación ultravioleta.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se menciona previamente, la ausencia de respuesta a la aplicación de inoculantes a base de PGPB incorporados como tratamientos de semillas de gramíneas generalmente es atribuida a la incapacidad de los microorganismos de colonizar eficientemente las raíces de las plantas. En el presente Capítulo, se describen ensayos que permitieron caracterizar algunos aspectos de la colonización de *B. tropica* en trigo y sorgo PI de semillas de estas gramíneas, en diferentes sistemas: 1- en plantas crecidas en condiciones gnotobióticas sobre soporte agarizado estéril, utilizando semillas desinfectadas inoculadas por inmersión para asegurar una máxima cantidad de microorganismos adheridos a la semilla; 2- en plantas crecidas en condiciones no-gnotobióticas, en un sistema de crecimiento similar al anterior pero con semillas no desinfectadas y con distintos soportes: a- soporte agarizado estéril; b- mezcla de tierra:sustrato estéril; c- mezcla de tierra:sustrato no estéril. En todos los sistemas se cuantificaron las poblaciones superficiales y endofíticas de *B. tropica* en la raíz por el método clásico dependiente de cultivo de dilución en placa. En plantas crecidas en condiciones gnotobióticas también se emplearon técnicas microscópicas independientes de cultivo para determinar los sitios de colonización y el carácter endofítico del microorganismo en estudio. Se evaluó la concentración de inóculo necesaria para obtener una colonización eficiente inoculando semillas de ambas gramíneas con una dosis similar a la que es utilizada con otros PGPB a campo (600 ml de inóculo/100 kg de semillas).

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el Capítulo anterior, el medio de cultivo utilizado para crecer los inóculos en todos los ensayos fue medio LGI con glicerol y EL: 10 g/l de glicerol y 1 g/l de EL (con un título final del orden de $1 \cdot 10^9$ UFC/ml) para los ensayos en condiciones gnotobióticas; y 15 g/l de glicerol y 2 g/l de EL (con un título final del orden de $1 \cdot 10^{10}$ UFC/ml) para aquellos realizados en condiciones no-gnotobióticas, ya que este medio tiene ventajas para la formulación del inoculante por el mayor título final y la mayor producción de EPS que permitiría una mayor supervivencia bacteriana en la semilla y durante el almacenamiento del producto.

B. tropica y sus dos variantes marcadas con los genes reporteros presentaron un comportamiento similar en el proceso de colonización de las raíces según los resultados del ensayo de co-inoculación en plantas de tomate (el ensayo y los resultados se describen en el Anexo 4). Estos resultados permitieron considerar a la cepa salvaje y a las variantes marcadas con los genes *gus* y *gfp* como equivalentes en los estudios de la colonización de tejidos vegetales.

En ninguno de los ensayos con plantas realizados con cualquiera de las variantes de *B. tropica* MTO-293 se encontraron signos de inhibición del crecimiento ni otros síntomas visibles de enfermedad.

ESTUDIOS EN CONDICIONES GNOTOBIÓTICAS

4.3.1 Colonización del rizoplano y endofítica en tejidos de plantas de trigo y sorgo

El análisis de la colonización en condiciones gnotobióticas es el primer paso en el estudio de la interacción entre las PGPB y las plantas. En estas condiciones de crecimiento se determinó la eficiencia de colonización de *B. tropica* en raíces y tallos de trigo y sorgo por el método de dilución en placa. En raíces no desinfectadas provenientes de semillas no inoculadas (control No Inoculado) de ambas gramíneas, se encontró crecimiento sólo en el 1% de los casos, indicando que la desinfección de las semillas fue satisfactoria y que, si bien las semillas tenían bacterias cultivables asociadas (observadas por triturado de semillas desinfectadas y siembra en placas, información obtenida previamente en el laboratorio) su crecimiento se observó muy rara vez en el medio utilizado, no afectando el estudio en condiciones gnotobióticas. En las muestras de raíces desinfectadas provenientes de semillas no inoculadas tampoco se observó crecimiento bacteriano.

B. tropica pudo ser aislada de tejidos no desinfectados tanto de raíces como de tallo de ambas gramíneas PI de las semillas por inmersión y crecimiento en condiciones gnotobióticas, sugiriendo que los exudados de la semilla y de la raíz proveyeron los nutrientes necesarios para sostener su crecimiento. En el 100% de las plantas analizadas se encontró colonización para todos los tiempos ensayados y a *B. tropica* como único microorganismo (por observaciones macroscópicas de las colonias y por PCR con cebadores específicos, ver al final de este Capítulo). En casos aislados crecieron colonias contaminantes. Se observó que *B. tropica* fue capaz de colonizar eficientemente el rizoplano de las raíces de ambas especies vegetales: los valores promedio de las poblaciones superficiales de raíces de trigo y sorgo fueron del orden de 1.10^8 UFC/gramo de raíz y de 1.10^9 UFC/gramo de raíz, respectivamente (Figura 4.8), observándose un leve aumento de la población acorde con la edad de las plantas hasta el final del experimento (21 días). Estos valores fueron semejantes a los reportados para otras PGPB creciendo en las mismas condiciones (Compant *et al.*, 2005b; De Souza *et al.*, 2015; Luna *et al.*, 2012) y para *B. tropica* colonizando plantas de tomate (Bernabeu *et al.*, 2015).

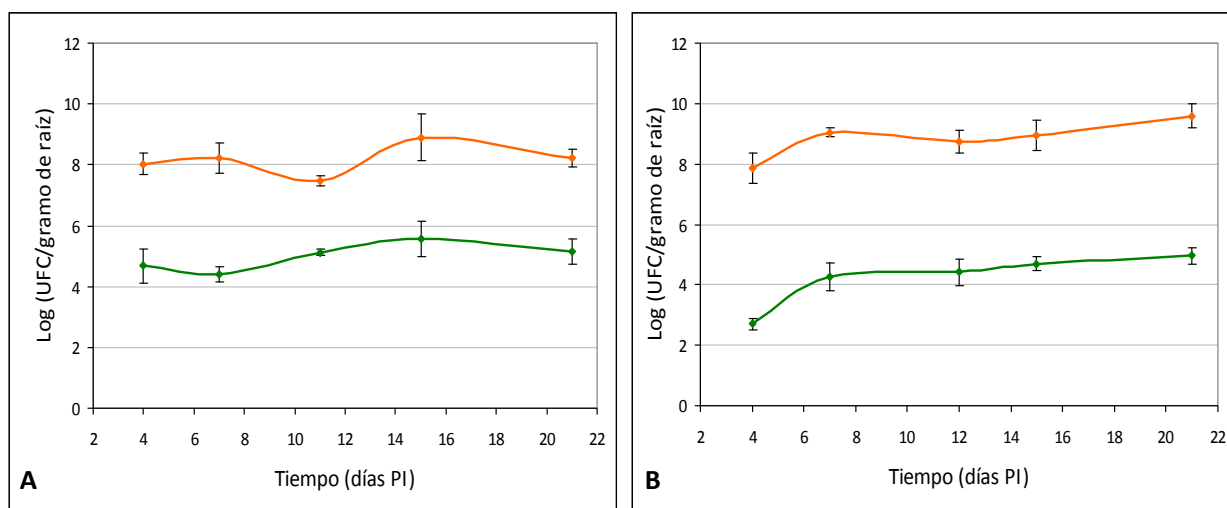


Figura 4.8 Población del rizoplano (línea naranja) y endofítica (línea verde) en raíces de trigo (**A**) y sorgo (**B**) de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas. Los puntos representan los promedios del logaritmo de las poblaciones bacterianas y las barras representan la desviación estándar de estos promedios.

La efectividad de la desinfección de las raíces para el estudio de la población endofítica quedó evidenciada debido a que: 1- no se observó crecimiento en placas de LGI agarizado en las que se apoyaron las raíces desinfectadas de plantas inoculadas; 2- no se observó crecimiento en el control del último lavado; 3- no se registró fluorescencia en tejidos desinfectados observados por microscopía. Basados en estos resultados, se puede asumir que el protocolo de desinfección de raíces utilizado fue suficiente para eliminar las bacterias superficiales asociadas a las raíces, acorde a lo reportado por Dong y colaboradores (2003). La realización de una desinfección satisfactoria es la que permite diferenciar las poblaciones estudiadas. La desinfección de los tallos analizados también fue efectiva, quedando esto evidenciado por la ausencia de crecimiento en las placas en las que se apoyaron los tallos desinfectados y en las correspondientes al último lavado.

Se registró un eficiente establecimiento de *B. tropica* como bacteria endófito en ambas gramíneas creciendo en condiciones gnotobióticas: se observaron colonias correspondientes a *B. tropica* al analizar por recuento en placa las raíces desinfectadas superficialmente de ambas gramíneas, evidenciando la capacidad de este microorganismo de colonizar tejidos internos de estas especies vegetales (Figura 4.8, líneas verdes). Se encontró colonización endofítica a todos los tiempos ensayados en el 100% de las plantas analizadas. Los valores promedio de la población endofítica en raíces fueron del orden de 1.10^5 UFC/gramo de raíz y 1.10^4 UFC/gramo de raíz para trigo y sorgo, respectivamente, que variaron en el tiempo concomitantemente con la población del rizoplano pero con valores significativamente menores. Estos valores también fueron comparables con los reportados para otras PGPB endofitas (Andreote *et al.*, 2009; Hallmann *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2010) e incluso para *B. tropica* en raíces de tomate (Bernabeu *et al.*, 2015) en las mismas condiciones de crecimiento de las plantas.

Al analizar las poblaciones bacterianas en tallo, se registró a *B. tropica* colonizando tanto tejidos superficiales como internos de ambas gramíneas crecidas en condiciones gnotobióticas. Las poblaciones superficial y endofítica tuvieron el mismo comportamiento: ambas poblaciones en trigo aumentaron a lo largo del experimento con valores que oscilaron entre 1.10^6 - 1.10^8 UFC/gramo de tallo y de 1.10^4 - 1.10^7 UFC/gramo de tallo, respectivamente; y para sorgo se mantuvieron estables en el tiempo que duró el experimento con valores promedio del orden de 1.10^6 UFC/gramo de tallo la población superficial, y 1.10^5 UFC/gramo de tallo la endofítica (Figura 4.9). En general, los valores de población endofítica en tallo son menores en uno o dos órdenes de magnitud que los encontrados en el interior de tejidos internos de las raíces (James *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2010; Zinniel *et al.*, 2002), a diferencia de lo que ocurre con *B. tropica* para estas gramíneas, ya que la población endofítica de tallo se mantuvo por encima de la endofítica de las raíces o fue semejante para trigo y sorgo, respectivamente.

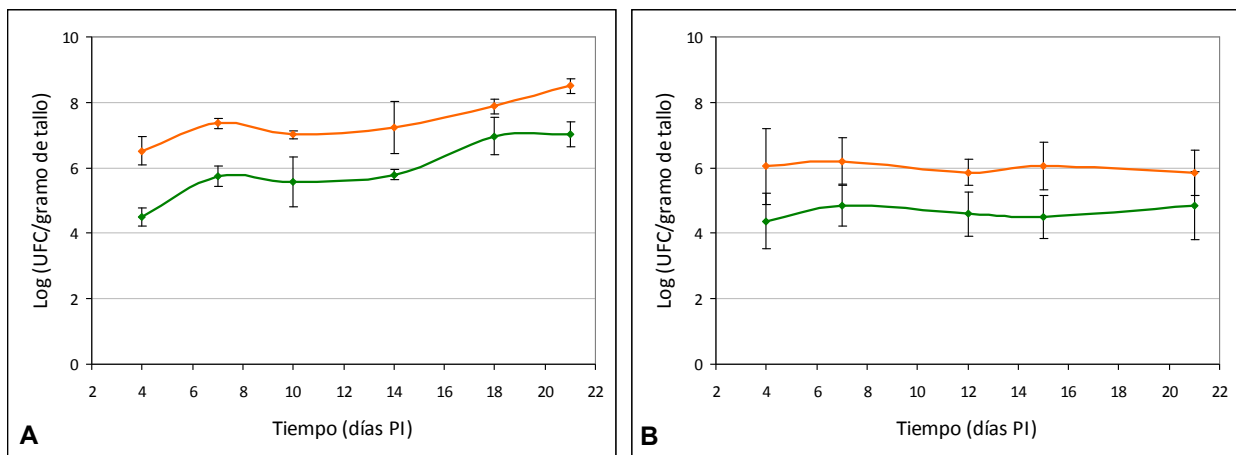


Figura 4.9 Población superficial (línea naranja) y endofítica (línea verde) de *B. tropica* en tallos de trigo (A) y sorgo (B) de plantas inoculadas crecidas en condiciones gnotobióticas. Los puntos representan los promedios del logaritmo de las poblaciones bacterianas y las barras representan la desviación estándar de estos promedios.

Si bien se encuentran microorganismos que habitan normalmente la epidermis de los tejidos aéreos (Taurian *et al.*, 2010) no es común la evaluación de la colonización superficial de tallo en plantas inoculadas y crecidas en estas condiciones. La presencia de *B. tropica* colonizando superficialmente los tejidos aéreos podría deberse a una colonización iniciada desde la semilla inoculada hacia la superficie externa del brote del tallo y una proliferación posterior en la superficie ya que en estas condiciones las plantas no se encuentran expuestas a factores bióticos ni abióticos adversos. En general, se propone la colonización de los tejidos aéreos a partir del ascenso de las bacterias desde la raíz por los haces vasculares (Hardoim *et al.*, 2008; Lodewyckx *et al.*, 2002). De acuerdo a los resultados obtenidos, puede especularse que los microorganismos podrían también colonizar los

tejidos aéreos desde afuera del tallo hacia el interior por ejemplo a través de los estomas (Zinniel *et al.*, 2002), y contribuir al aumento de la población endofítica en estos tejidos.

Los resultados obtenidos en los estudios de colonización en condiciones gnotobióticas indican que *B. tropica* es capaz de colonizar eficientemente tejidos superficiales e internos de raíces y tallos de ambas gramíneas, siendo el término endófito putativo el indicado para nombrar a *B. tropica* de acuerdo los resultados de estos ensayos.

4.3.2 Visualización microscópica de la colonización superficial, sitios de ingreso y colonización de tejidos internos

B. tropica-gus y *B. tropica-gfp* pudieron ser localizadas *in situ* por microscopía de campo claro y epifluorescencia, respectivamente, en raíces de ambas gramíneas crecidas en condiciones gnotobióticas, avalando los resultados obtenidos por la metodología cultivo dependiente de recuento en placa. Se observaron raíces enteras de trigo y sorgo a distintos días PI que presentaron autofluorescencia propia del tejido vegetal, pero pudo ser diferenciada de la fluorescencia generada por la proteína GFP observándose claramente la presencia de *B. tropica-gfp* sobre las raíces de ambas gramíneas. En raíces no inoculadas o inoculadas pero desinfectadas superficialmente (Figuras 4.10 A y 4.11 A) sólo se observó la autofluorescencia del tejido vegetal. A los 4 días PI se observó colonización sobre la superficie de la raíz en ambas gramíneas, con bacterias aisladas o formando hileras ubicadas sobre la línea de unión de las células de la epidermis (Figuras 4.10 B y 4.11 B y C), principalmente en la zona de pelos radicales jóvenes y la parte superior de la zona de elongación de la raíz. Posteriormente esas zonas de la superficie radical fueron extensamente colonizadas (Figuras 4.10 C y E y 4.11 D y E) tal como ha sido reportado para otras PGPB (Compant *et al.*, 2010, Elbeltagy *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 1997; Zachow *et al.*, 2015). Como se describió en el Capítulo 2 de este trabajo, *B. tropica* tiene la capacidad de crecer formando *biofilm* en superficies abióticas. La formación de *biofilm* sobre la superficie de raíces ha sido reportada previamente para otras PGPB en plantas creciendo en condiciones gnotobióticas (Chen *et al.*, 2012; Rudrappa *et al.*, 2007). Observando las Figuras 4.10 C, E y G y 4.11 B y D que muestran la colonización superficial de raíces de trigo y sorgo por *B. tropica* se podría interpretar que está formando estructuras tipo *biofilm* en donde la matriz podría estar formada por EPS producido por las bacterias a partir de los sustratos provenientes de los exudados radicales, junto con otros materiales que las plantas producen, ya que las raíces se lavaron vigorosamente antes de la observación asegurando que las mismas corresponden a una estructura adherida fuertemente a la superficie, tal como lo es un *biofilm*. No obstante, sería necesaria la obtención de mutantes no formadores de *biofilm*, tal como se detalla en el Capítulo 6, para realizar estudios de colonización que muestren su comportamiento y se comparen

con los presentados en este Capítulo, así como ensayos de formación de *biofilm* sobre las raíces en sistemas continuos en cámara, que puedan contribuir a la confirmación de esta hipótesis.

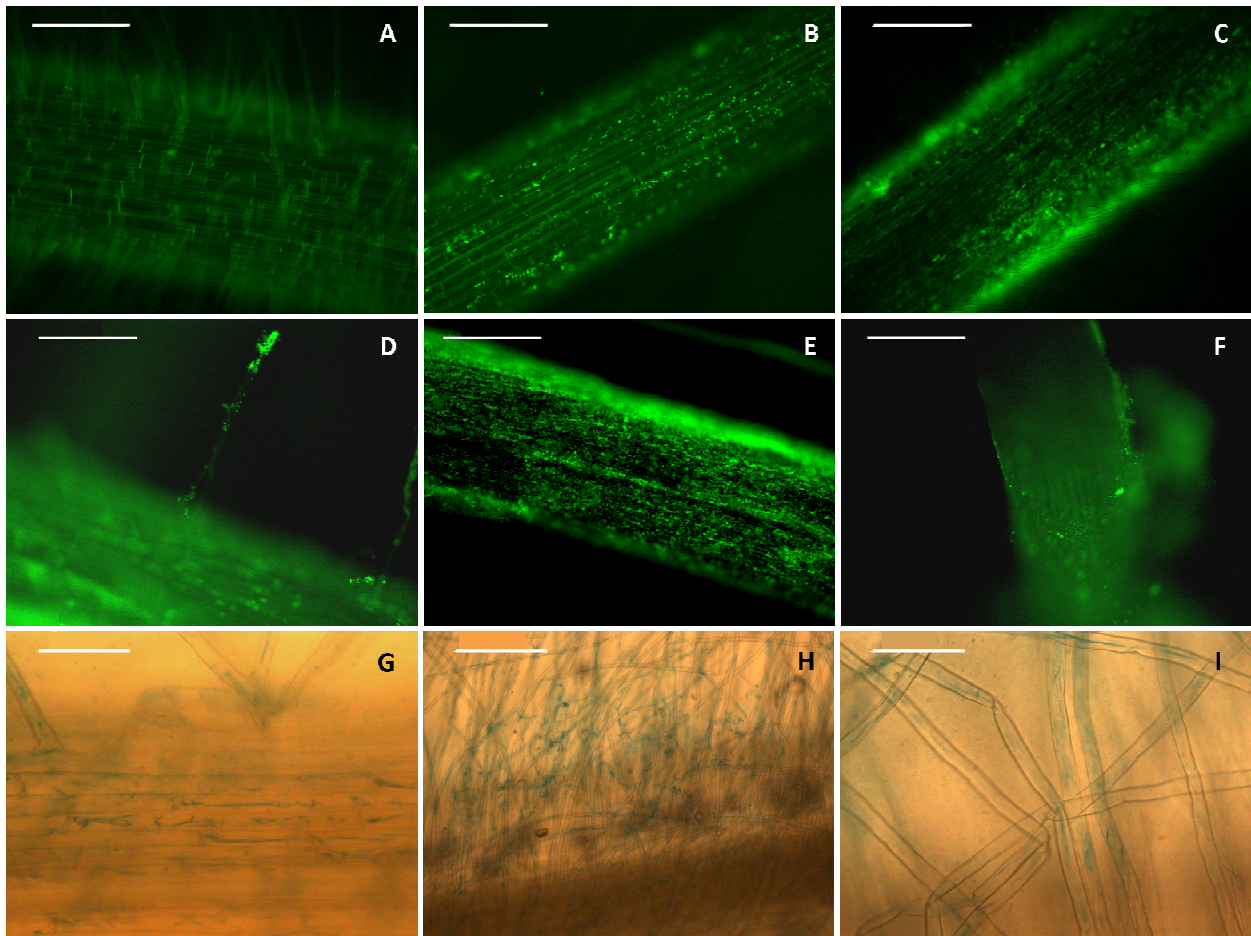


Figura 4.10 Colonización del rizoplano de raíces de trigo inoculadas con *B. tropica-gfp*: Raíz no inoculada (**A**); raíz inoculada a los 4 días PI (**B**); raíz inoculada a los 7 días PI (**C**); pelos radicales colonizados (**D**) y superficie de una raíz de 15 días PI (**E**); ápice (**F**). Colonización del rizoplano (**G**) y de los pelos radicales (**H e I**) por *B. tropica-gus*. Barras de escala: **A, B, C, E, F y H**: 200 μ m. **D, G e I**: 50 μ m.

En relación a los posibles sitios de ingreso de las bacterias, fue posible observar bacterias adheridas sobre la superficie de los pelos radicales en ambas gramíneas (Figuras 4.10 D, H e I y 4.11 J, K y L), en el caso de trigo colonizando todo el pelo desde la base y en sorgo, en la zona de la punta del pelo. También se observó la colonización del ápice pero sólo en el 2% de las raíces de trigo observadas y con muy pocos microorganismos (Figura 4.10 F). No se observó colonización en la zona de emergencia de las raíces laterales en ninguna de las dos gramíneas. Ha sido reportado que *B. tropica* fue capaz de colonizar no solo los pelos radicales sino también el ápice y la zona de emergencia de raíces laterales de plantas de tomate crecidas en condiciones gnotobióticas pero inoculando brotes (Bernabeu *et al.*, 2015), indicando que el patrón de colonización para este microorganismo es variable y podría depender de la forma de inoculación y/o de la especie vegetal analizada. Los pelos radicales son células epidérmicas especializadas que contribuyen a aumentar la superficie expuesta

de la raíz para realizar la absorción de nutrientes y también liberación de exudados, de tal forma que los pelos radicales y la zona que los rodea son propicios para el crecimiento de microorganismos. Mercado-Blanco y Prieto (2012) han propuesto a los pelos radicales como la vía de entrada a los tejidos internos de los microorganismos endófitos, pudiendo ser esto posible para *B. tropica* creciendo en condiciones gnotobióticas.

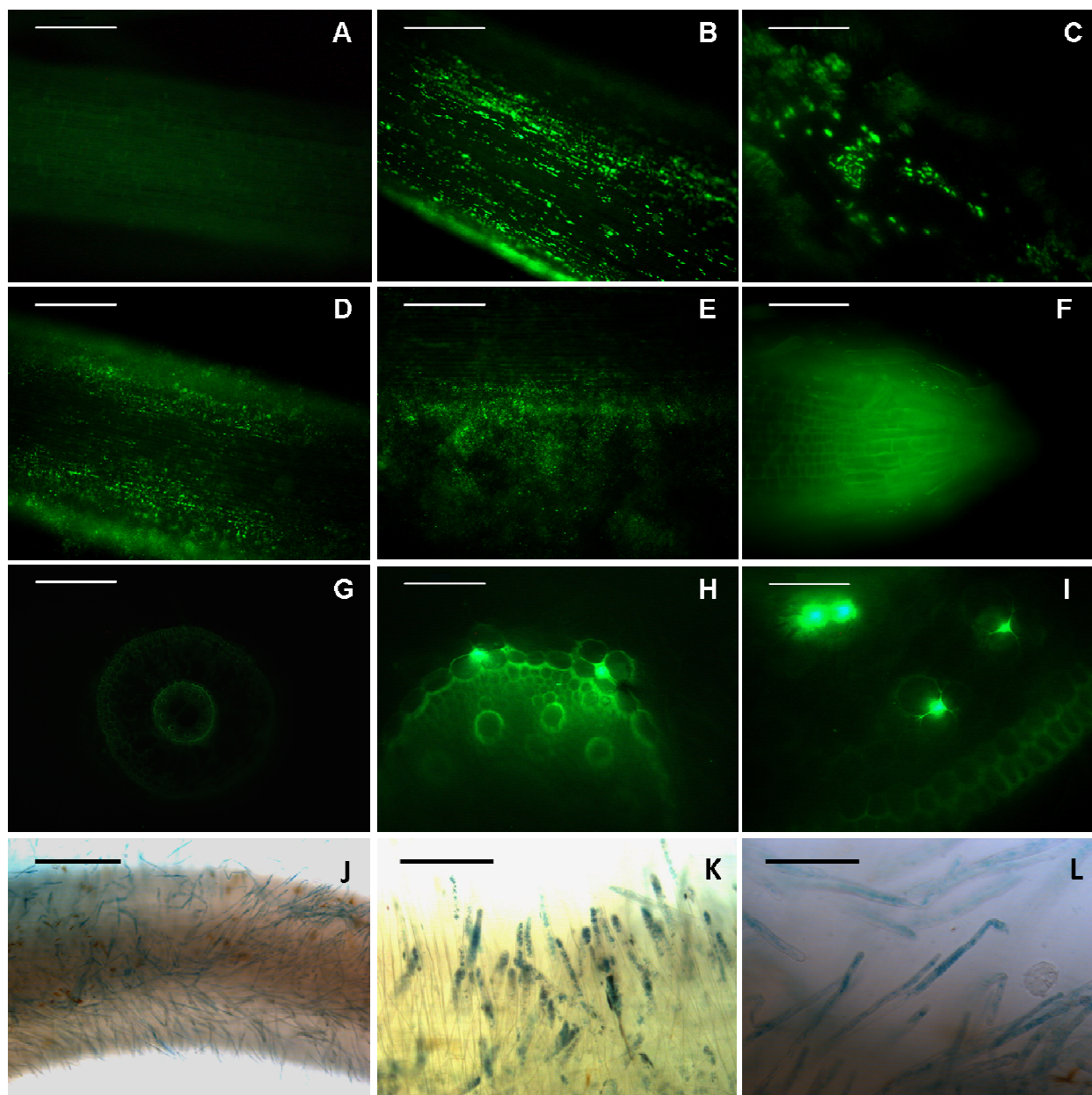


Figura 4.11 Colonización superficial y endófitica en raíces de sorgo inoculadas con *B. tropica-gfp*: Raíz no inoculada (A); superficie de raíz inoculada a los 4 días PI (B y C); superficie de raíz inoculada a los 7 días PI (D y E); ápice de raíz a los 7 días PI (F); corte transversal de raíz no inoculada (G); corte transversal de raíz inoculada a los 10 días PI (H e I). Colonización de los pelos radicales por *B. tropica-gus* (J, K y L) Barras de escala: A, B, D, E, G y J: 200 μm . C, F, H, I, K y L: 50 μm .

Cuando se analizaron cortes transversales de ambas gramíneas en raíces desinfectadas superficialmente a distintos días PI por MEF se observaron focos de fluorescencia en los espacios intercelulares en la corteza, algunos cercanos al cilindro central de la raíz en el caso de muestras de sorgo (Figura 4.11 H e I). Los espacios intercelulares son usualmente colonizados por las bacterias endófitas (Gyaneshwar *et al.*, 2001; Hurek *et al.*, 1994) desde donde pueden movilizarse por los tejidos internos de la raíz invadiendo el apoplasto y llegando algunas incluso a atravesar la barrera de la endodermis y colonizar los haces vasculares. Desde allí podrían moverse a lo largo de la raíz para colonizar los tejidos aéreos (Hardoim *et al.*, 2008; Lodewyckx *et al.*, 2002). Cuando se realizaron cortes transversales de tejidos de trigo y se observaron por MEF no fue posible localizar a los microorganismos colonizando internamente las raíces desinfectadas de esta gramínea.

Mediante MEF se observa la superposición de planos que hacen que los focos de fluorescencia se saturen. Por este motivo, se observaron cortes también mediante MELC, con el fin de poder determinar la presencia inequívoca de *B. tropica* en los tejidos internos de estas plantas.

Se observaron cortes transversales de raíces de trigo y sorgo a diferentes días PI en un microscopio Carl Zeiss LSM 5 Pascal. De todas las muestras analizadas sólo se pudo registrar evidencia de colonización de tejidos internos en muestras de raíces de sorgo desinfectadas de 10 días PI en las que se observó fluorescencia correspondiente a la GFP en los espacios intercelulares formados por células de la corteza (Figura 4.12 A y B).

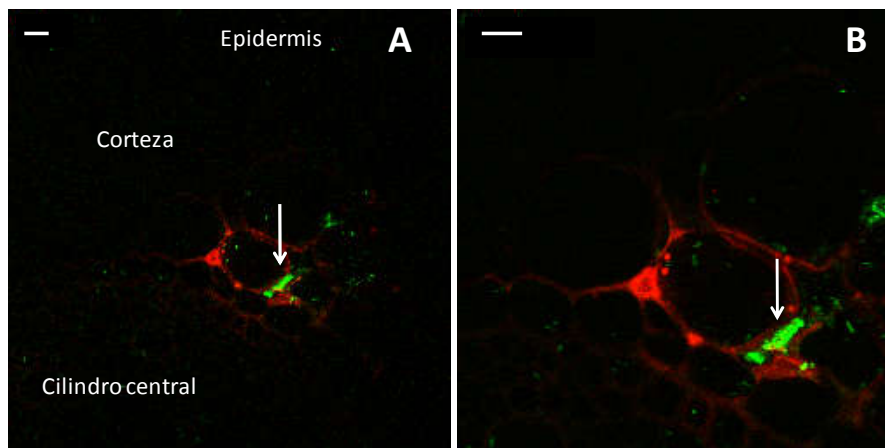


Figura 4.12 Imagen obtenida por MELC donde se observan bacterias colonizando el espacio intercelular (A) y ampliación de la zona colonizada (B). Barras: 10 μ m.

La utilización del microscopio confocal permitió la obtención de imágenes secuenciales a lo largo del eje Z (*stack*) del corte transversal de la raíces de sorgo con las que se pudo construir una imagen tridimensional. La distancia entre las imágenes obtenidas fue de 1 μ m. Estas imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Imaris (Bitplane), con el fin de obtener la estructura que se observa en la Figura 4.13.

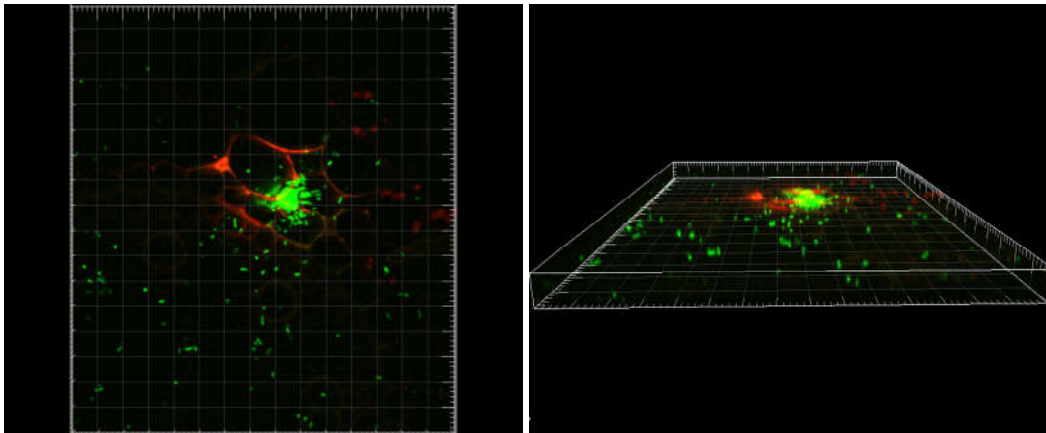


Figura 4.13 Reconstrucción del *stack* de imágenes obtenidas por MELC a partir del corte transversal de una raíz de sorgo inoculada con *B. tropica* con el programa Imaris.

Estas imágenes confirmarían que las zonas con alta densidad de fluorescencia que se observaron mediante MEF (Fig. 4.11 H e I) corresponderían a los espacios intercelulares de raíces de sorgo colonizados por *Burkholderia-gfp*. La colonización de los espacios intercelulares y su arreglo tridimensional fue también reportada por Compant y colaboradores (2008) en el estudio de la interacción entre *Burkholderia phytofirmans* y plantas de vid, así como por Liu y colaboradores (2006) en el estudio de la interacción de *Bacillus megaterium* y plantas de maíz y arroz. Los espacios intercelulares fueron también registrados como sitios de colonización en otras interacciones planta-bacteria (Cocking *et al.*, 2006; Gyaneshwar *et al.*, 2001; Hao y Chen, 2017; Taulé *et al.*, 2016; Thomas y Sekhar, 2014), tal como fue observado para *B. tropica* en plantas de sorgo.

Se pudo evidenciar que *B. tropica* es un endófito verdadero en plantas de sorgo, de acuerdo a los criterios propuestos por Reinhold-Hurek y Hurek (1998). No obstante, es aceptado por la comunidad científica que si existen controles adecuados de desinfección, es suficiente el aislamiento de la bacteria inoculada de tejidos desinfectados para decir que tiene un carácter endofítico en las plantas que coloniza, ya que: 1- si no tiene ese carácter no se hubiera aislado de tejidos desinfectados adecuadamente y 2- es realmente difícil encontrar por técnicas microscópicas a los microorganismos colonizando tejidos internos debido a que están en menor número que en los tejidos superficiales y distribuidos a lo largo del vegetal en bajas densidades (Bernabeu *et al.*, 2015; Luna *et al.*, 2012). Por lo tanto, se puede concluir que *B. tropica* presenta un carácter endofítico en plantas de trigo y sorgo en condiciones gnotobióticas.

ESTUDIOS EN CONDICIONES NO-GNOTOBIÓTICAS

4.3.3 Número de bacterias por semilla necesarias para una colonización eficiente

Hasta el momento, se demostró que cuando se inoculan por inmersión semillas desinfectadas de trigo y sorgo con una suspensión de 1.10^{10} UFC/ml de *B. tropica*, ésta es capaz de colonizar

eficientemente raíces de trigo y sorgo de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas. El siguiente ensayo fue determinar la cantidad mínima de microorganismos por semilla necesarios para lograr una colonización eficiente en un sistema de crecimiento no-gnotobiótico, en el cual las semillas no fueron desinfectadas. Además, la inoculación no se realizó por inmersión, sino con un volumen o dosis de inoculante/Kg de semilla que comúnmente es utilizado en la aplicación a campo con otras PGPB con el agregado de un volumen de agua contribuya a la distribución homogénea de las bacterias y que asegure que todas las semillas queden impregnadas con el inóculo pero que no haya líquido excedente.

Se realizó el recuento de bacterias viables en el inóculo de cada una de las 4 concentraciones utilizadas. Los valores obtenidos se detallan en la Tabla 4.2 para el ensayo con semillas de trigo y sorgo, respectivamente. Con ese dato se calculó la cantidad de bacterias que habría por semilla para cada concentración, considerando para ello que en un gramo de semillas hay un promedio de 25 semillas de trigo y sorgo, con el fin de comparar este valor con los reportados previamente.

Concentración	UFC/ml inóculo	Bacterias/semilla*
1	$3,1 \cdot 10^{10}$	$7,7 \cdot 10^6$
2	$2,5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^4$
3	$7,4 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^2$
4	$5,1 \cdot 10^3$	<10

Tabla 4.2 Valores promedio de concentración de inóculo y cantidad de bacterias por semilla de trigo y sorgo. *dato calculado considerando que hay 250 semillas en 10 gramos.

Se evaluó la eficiencia de colonización cuantificando la población del rizoplano y endofítica de *B. tropica* en raíces de trigo y sorgo PI de las semillas con las distintas concentraciones de inóculo y los resultados se muestran en las Figuras 4.14 A y B y 4.15 A y B, respectivamente.

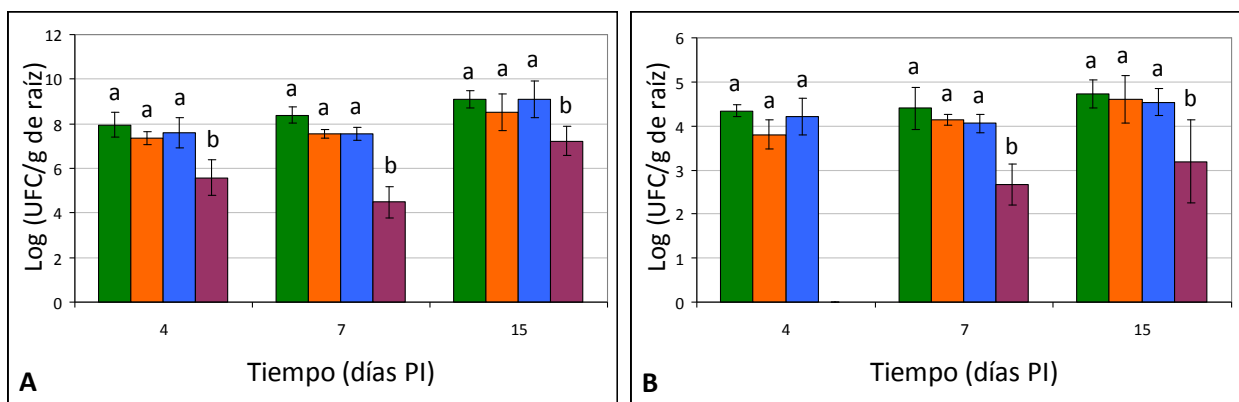


Figura 4.14 Población del rizoplano (A) y endofítica (B) a los distintos tiempos PI en raíces de plantas de trigo inoculadas con cultivos de distinto recuento inicial. Letras distintas representan diferencias significativas (Prueba LSD a $p < 0,05$). Concentración: 1 (verde), 2 (naranja), 3 (azul), 4 (púrpura).

Los resultados obtenidos muestran que cuando se inocularon semillas de trigo con concentraciones de inóculo que aseguraron la presencia de un número superior a 100 bacterias por semilla (concentraciones 1, 2 y 3) se observó colonización eficiente de tejidos tanto internos como externos para todos los tiempos PI ensayados. En cambio, cuando la cantidad de bacterias por semilla fue menor a ese valor, del orden de 10 bacterias por semilla (concentración 4, dato calculado), el análisis de los datos indicó que ambas poblaciones, del rizoplano y endofítica, presentaron valores de UFC/gramo de raíz significativamente menores que los de las otras concentraciones a todos los tiempos ensayados, e incluso a tiempos cortos (4 días PI) las bacterias no lograron ingresar a los tejidos internos. Sin embargo, a partir de los 7 días fue posible obtener bacterias endófitas también de las raíces provenientes de semillas inoculadas con la concentración más baja de inoculante, aunque el valor fue significativamente menor que el resto.

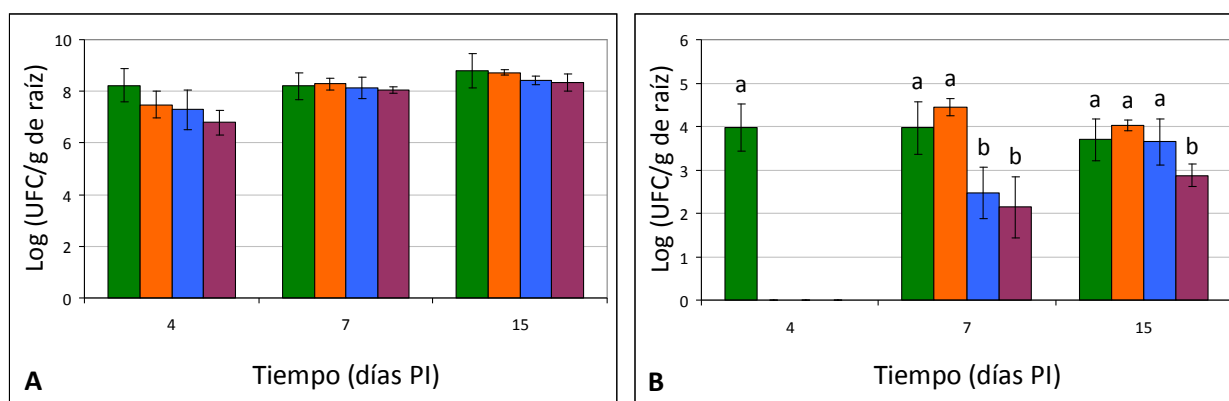


Figura 4.15 Población del rizoplano (A) y endofítica (B) a los distintos tiempos PI en raíces de plantas de sorgo inoculadas con cultivos de distinto recuento inicial. Letras distintas representan diferencias significativas (Prueba LSD a $p < 0,05$). Concentración: ■ 1 ■ 2 ■ 3 ■ 4

Cuando se inocularon semillas de sorgo con diferentes concentraciones de inóculo los resultados muestran que la colonización del rizoplano a los 4 días PI fue disminuyendo proporcionalmente a la concentración de inóculo en la semilla, aunque no de forma significativa. Esto se correlaciona con una eficiente colonización endofítica para la concentración 1 y la ausencia de esta colonización en las concentraciones 2, 3 y 4 en ese tiempo. No obstante, a los 7 días se encontró población endofítica en todos los tratamientos, alcanzando valores del orden de $1 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^4$ UFC/gramo, y a los 15 días valores en promedio semejantes a los registrados desde el inicio del ensayo para la mayor de las concentraciones (concentración 1).

Para ambas gramíneas los resultados al inocular semillas desinfectadas inoculadas por inmersión con la concentración 1 en condiciones gnotobióticas fueron similares a los hallados en la inoculación de semillas no desinfectadas inoculadas con la dosis de 600 ml/100kg de semillas y la concentración 1. Por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron con esta última condición.

El número de bacterias presentes en el inóculo, que se traduce en UFC/semilla, afectó la colonización endofítica de las raíces, pero a tiempos mayores *B. tropica* fue capaz de ingresar y colonizar los tejidos internos. Si este resultado se debe a una densidad de población umbral de bacterias que deben colonizar la superficie de la raíz (¿señales del tipo QS?) para luego poder ingresar a los tejidos internos, pareciera que no fuera este el único requisito, ya que en ambas gramíneas existen valores de colonización superficiales semejantes y no hay igual respuesta en la colonización endofítica.

4.3.4 Colonización de *B. tropica* en raíces de plantas de trigo y sorgo crecidas en tierra estéril

Estos ensayos en tierra estéril permitieron evaluar la capacidad de colonización de las raíces, PI de semillas, en un sustrato natural libre de microorganismos. Los resultados obtenidos luego de realizar la cuantificación de las poblaciones del rizoplasma y endofíticas mostraron valores del orden de los hallados en condiciones gnotobióticas (Figura 4.16 A y B).

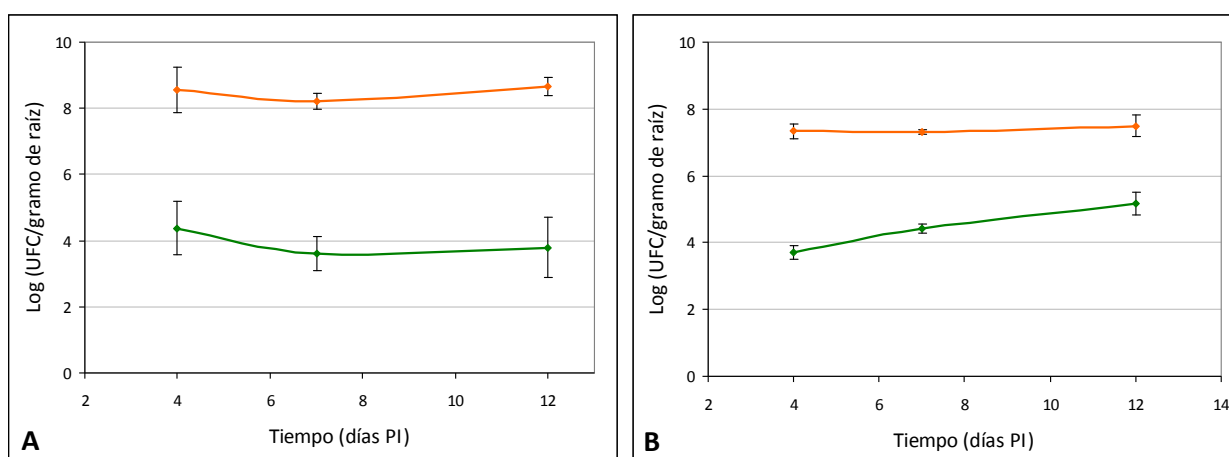


Figura 4.16 Colonización de *B. tropica* del rizoplasma (línea naranja) y endofítica (línea verde) de raíces de trigo (A) y sorgo (B) de plantas creciendo en tierra estéril. Los puntos representan los valores medios del logaritmo de las poblaciones bacterianas de *B. tropica* creciendo en medio selectivo con T_c y las barras representan la desviación estándar de estos valores medios, calculados a partir de por lo menos 3 repeticiones en cada tiempo.

Esto indicaría que *B. tropica* fue capaz de colonizar el rizoplasma y los tejidos internos de las raíces de ambas gramíneas al crecer en un sustrato natural libre de otros microorganismos, y de mantener ese crecimiento en el tiempo que duró el ensayo.

En los controles sin inocular se encontró crecimiento bacteriano en muestras de tejidos superficiales pero no en muestras de tejidos desinfectados en medios de crecimiento sin antibiótico. El número de bacterias contaminantes fue mucho menor en muestras de tejidos inoculados con *B. tropica*, no obstante la evaluación de la colonización se realizó en medio selectivo con T_c. Al no haber realizado desinfección en las semillas, puede estimarse que los microorganismos que pudieran estar

presentes en la superficie de las mismas no afectaron la colonización de *B. tropica* en los tejidos internos y externos.

4.3.5 Colonización de *B. tropica* en raíces de plantas de trigo y sorgo crecidas en tierra no estéril

El estudio de la colonización del microorganismo en sustratos no estériles en condiciones de crecimiento controladas permite estudiar la capacidad de competencia del mismo en presencia de otros microorganismos. Ensayos de colonización en tierra no estéril en macetas con semillas no desinfectadas se llevaron a cabo para evaluar la capacidad de colonización del microorganismo en estudio en una escala que fuera fácil de analizar y reproducible en el laboratorio, inoculando con una dosis similar a la que es utilizada con otros PGPB a campo (600 ml de inóculo/100 kg de semillas).

A los 7 días PI se analizó la población superficial y endofítica en raíces y tallos de plantas de trigo y sorgo no inoculadas e inoculadas, realizando la siembra de las muestras en medio LGI agarizado sin y con Tc, con el fin de cuantificar la microflora nativa presente en el caso de las no inoculadas, y de determinar qué porcentaje de esa población total correspondía a *B. tropica* en el caso de las plantas inoculadas, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.17.

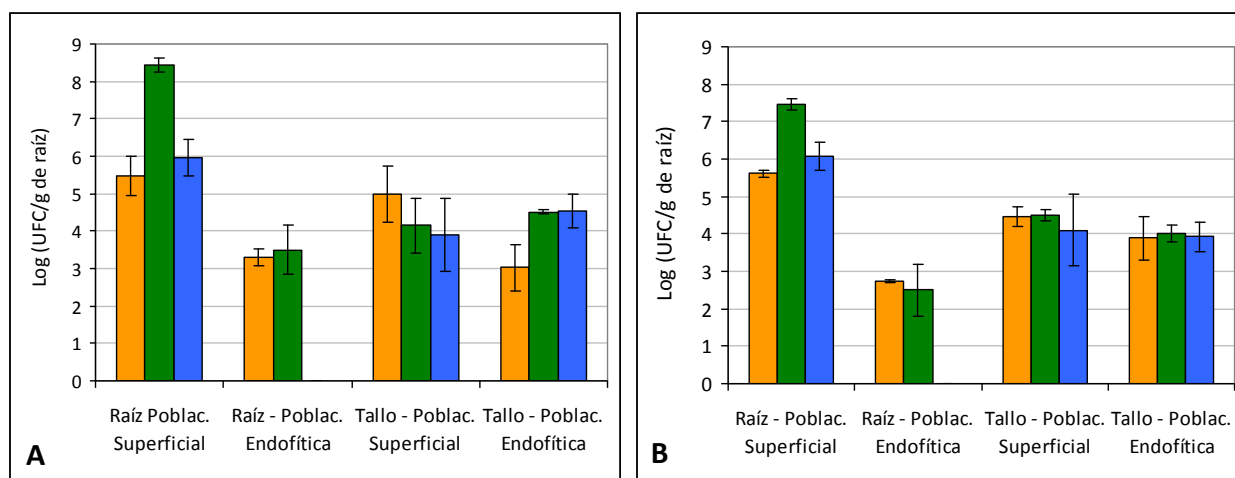


Figura 4.17 Población superficial y endofítica en raíces y tallos de plantas de trigo (A) y sorgo (B) no inoculadas e inoculadas a los 7 días PI, crecidas en medio LGI en presencia y ausencia de Tc.

■ No inoculadas ■ Inoculadas sin Tc ■ Inoculadas con Tc

En las muestras de tejidos de ambas gramíneas se pudo observar un comportamiento similar de *B. tropica*:

- No se registró crecimiento en placas con Tc de las muestras de raíces o tallos (desinfectadas o no) de plantas no inoculadas, indicando que no hubo microorganismos nativos resistentes a dicho antibiótico.
- La población del rizoplasma en plantas no inoculadas (no desinfectadas y crecidas en placas sin Tc) fue del orden de 1.10^5 - 1.10^6 UFC/gramo de raíz, evidenciando la presencia de microorganismos

nativos en cantidades acordes a lo reportado para poblaciones naturales en ese ambiente. La población endofítica en plantas no inoculadas (desinfectadas y crecidas en placas sin Tc) fue del orden de 1.10^2 - 1.10^3 UFC/gramo de raíz, indicando que hay una población endófito nativa también del orden de lo reportado para poblaciones endófitas naturales.

- La población del rizoplano en plantas inoculadas (no desinfectadas) alcanzó valores cercanos a 1.10^7 - 1.10^8 UFC/gramo de raíz (microorganismos nativos + *B. tropica*) en placas sin Tc y de 1.10^6 UFC/gramo de raíz (*B. tropica*) en placas con Tc, representando entre el 1-10% de la población total del rizoplano.

- La población endofítica en plantas inoculadas (desinfectadas) y sin Tc, fue del orden de 1.10^2 - 1.10^3 UFC/gramo de raíz, coincidiendo con el valor de la población endofítica en plantas no inoculadas. No se encontró población endofítica correspondiente a *B. tropica* en raíces inoculadas (desinfectadas y con Tc), y no hubo crecimiento en las placas donde se apoyaron las raíces desinfectadas. Por lo tanto, en plantas no inoculadas y en inoculadas, la población endofítica correspondería a la flora nativa (no dieron positivas para PCR de *B. tropica*).

Se realizaron ensayos a los 4 y 15 días con raíces de ambas gramíneas de plantas inoculadas y crecidas en Tc y en ambos casos no se encontró población endofítica correspondiente a *B. tropica*.

- Con respecto a los resultados de las poblaciones de tallos en ambas gramíneas se podría hipotetizar: 1- La población superficial de *B. tropica* en tallo es del mismo orden que la endofítica y es suficiente para ingresar a los tejidos internos directamente desde la superficie del tallo. 2- si *B. tropica* se encuentra colonizando los tejidos internos de las raíces en concentraciones no detectables por las metodologías utilizadas a los tiempos evaluados, podría ser que no hubiera población superficial de tallo y que toda la población del mismo fuera endófito y colonizara por traslocación desde la raíz, encontrando en este nicho un sitio propicio para su crecimiento.

Por otro lado, en su paso por la planta en estas condiciones, la bacteria podría volverse viable pero no cultivable y por ello registrar esa aparente ausencia de colonización, siendo necesarias técnicas de biología molecular para su detección.

4.3.6 Identificación de *B. tropica* por técnicas de biología molecular

Si bien en los ensayos en condiciones no-ghotobióticas se utilizaron medios con Tc para poder seleccionar el microorganismo en estudio, también se identificó *B. tropica* por medio de técnicas de biología molecular. Se realizó la PCR de 2 aislamientos de cada uno de los ensayos en los diferentes sistemas estudiados según se detalló anteriormente con los cebadores Btrop-F/Btrop-R. Se obtuvo en todos los casos amplificación correspondiente al gen 16S de *B. tropica* (Figura 4.18). Teniendo en cuenta este resultado junto con la visualización de fluorescencia de las colonias en la luz UV y el

crecimiento en Tc, se puede asumir que en todos los resultados anteriores las colonias aisladas correspondían a la cepa inoculada de *B. tropica*.

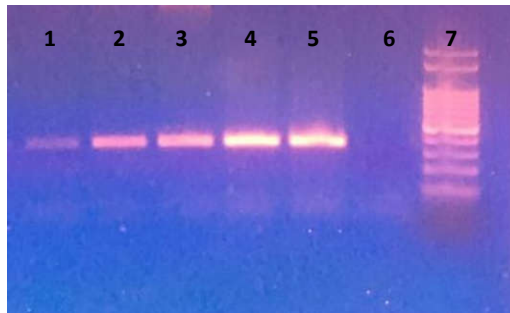


Figura 4.18 Gel de agarosa 1,5% en el que se observa la amplificación en las muestras analizadas: Aislamiento de plantas crecidas en maceta **(1)**; aislamiento de plantas crecidas en tierra estéril **(2)**; aislamiento de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas **(3)**; control positivo (cultivo líquido de *B. tropica*) **(4)**; control positivo (cultivo líquido de *B. tropica-gfp*) **(5)**; blanco de reacción **(6)**; marcador de peso molecular de 100 pb **(7)**.

4.4 CONCLUSIONES

En el presente capítulo se evaluó la capacidad de *B. tropica* MTo-293 para colonizar tejidos de plantas de trigo y sorgo post-inoculación de semillas y crecimiento en condiciones gnotobióticas. Posteriormente, se modificó el sistema de estudio exponiendo al microorganismo a factores adversos que naturalmente puede encontrar cuando es aplicado sobre semillas en el campo, como por ejemplo otros microorganismos con los que debe competir por los sustratos y por el nicho ecológico que pretende colonizar.

El desarrollo de sistemas en condiciones gnotobióticas es clave para iniciar el estudio de la interacción PGPB-planta, donde plantas y bacterias crecen en ausencia de factores bióticos o abióticos adversos. Los resultados obtenidos con *B. tropica* inoculada en semillas desinfectadas de trigo y sorgo y crecimiento en condiciones gnotobióticas, evidenciaron que:

1. *B. tropica* MTo-293 fue capaz de colonizar eficientemente otras plantas diferentes a su huésped original: después de la inoculación de semillas de trigo y sorgo con *B. tropica* MTo-293, colonizó eficientemente el rizoplano y los tejidos internos de las plantas crecidas en condiciones gnotobióticas, siendo esto evidenciado tanto por técnicas dependientes de cultivo, con poblaciones comparables a las reportadas para otras PGPB, como por observaciones realizadas mediante técnicas microscópicas utilizando variantes isogénicas de *B. tropica* MTo-293, una de ellas construida durante este trabajo de Tesis (*B. tropica-gfp*). *B. tropica* MTo-293 fue detectada sobre la superficie de la raíz de ambas gramíneas ubicándose en hileras sobre la unión de las células de la epidermis y en otras zonas de la superficie de la raíz principalmente en la zona de pelos radicales jóvenes, los cuales también fueron colonizados superficialmente. En raíces de sorgo inoculadas en condiciones gnotobióticas fue posible encontrar a *B. tropica* MTo-293 colonizando los espacios intercelulares formados por células de la corteza. Teniendo en cuenta la definición de microorganismo endófito detallada anteriormente, los resultados obtenidos permiten afirmar que *B. tropica* MTo-293, bacteria aislada de tejidos desinfectados de plantas de maíz, caña de azúcar y teosinte, presentó un carácter endofítico en plantas de trigo y sorgo.

Una vez estudiada la capacidad de colonización en los tejidos vegetales de la bacteria inoculada y su localización en condiciones gnotobióticas, resulta de importancia el estudio de la capacidad de colonización en sustratos naturales, estériles y no estériles. Cuando *B. tropica* MTo-293 fue inoculada en semillas no desinfectadas de trigo y sorgo con una dosis similar a la que es utilizada con otros PGPB a campo (600 ml de inóculo/100 kg de semillas) y crecimiento en condiciones no gnotobióticas, se evidenció que:

2. *B. tropica* MTo-293 colonizó eficientemente las raíces de ambas gramíneas cuando fue inoculada en bajas concentraciones (<10 bacterias/semilla) sobre las semillas no desinfectadas y éstas fueron

crecidas en sistema agarizado estéril, encontrándose una diferencia temporal en la colonización endofítica.

3. *B. tropica* MTo-293 fue capaz de colonizar raíces de trigo y sorgo cuando las plantas fueron crecidas en tierra estéril, con valores de poblaciones superficiales y endofíticas similares a los hallados en condiciones gnotobióticas.

4. *B. tropica* MTo-293 colonizó eficientemente el rizoplaneo en plantas crecidas en tierra no estéril, con valores de poblaciones del orden de 1.10^6 UFC/gramo de raíz, valores semejantes a los encontrados para otras PGPB colonizando este ambiente, y evidenciando su capacidad de rizocompetencia, ya que se encontraron valores de poblaciones del mismo orden de otros microorganismos compitiendo por el mismo nicho. *B. tropica* MTo-293 no se encontró colonizando raíces endofíticamente con las metodologías utilizadas en estos ensayos. Así como un determinado estado fisiológico del microorganismo es indispensable para que éste sea rizocompetente, también lo es para poder colonizar eficientemente los tejidos internos. Diversos factores como el pH del medio, la motilidad, la formación de *biofilm* y la expresión de enzimas líticas de la pared celular vegetal, entre otras características, mecanismos normalmente regulados por el proceso de QS dependiente de la densidad de microorganismos (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Suarez-Moreno *et al.*, 2012), pueden estar mediando el ingreso de *B. tropica* MTo-293 a los tejidos. La evaluación de muestras de tejidos a tiempos mayores, así como el empleo de protectores que aumenten la supervivencia de *B. tropica* MTo-293 en la semilla, entre otros, pueden ser ensayos que contribuirían a explicar mejor este fenómeno.

5. *B. tropica* MTo-293 fue capaz de crecer endofíticamente en tallos en todas las condiciones de crecimiento evaluadas.

Para determinar si esta colonización de *B. tropica* MTo-293 en etapas tempranas del crecimiento de las plantas, post-inoculación de las semillas con dosis semejantes a las utilizadas en el campo, se ve reflejada en un efecto promotor del crecimiento en las gramíneas en estudio, es necesario realizar ensayos en invernadero o a campo, y evaluar indicadores de crecimiento, rendimiento, u otros parámetros que muestren indirectamente que la colonización fue eficiente también en esas condiciones.

4.5 ANEXO 4

4.5.1 Ensayo de co-inoculación de plantas de tomate con *B. tropica* y sus variantes genéticamente modificadas

Con el fin de determinar si las tres cepas utilizadas eran equivalentes al ser inoculadas, se realizaron ensayos de co-inoculación en plantas de tomate. Se realizaron cultivos de las tres cepas en estudio en medio LGI modificado con 5 g/l de glucosa y 1 g/l de EL durante 24 horas. Con este cultivo se sembró otro que sirvió como inóculo para los brotes de tomate. Los caldos crecidos se centrifugaron y se resuspendieron en agua destilada estéril, siendo llevados a una DO_{560} final de 1. Se realizó el recuento en placa de cada resuspendido utilizados, así como de las mezclas, con el fin de determinar las UFC/ml de cada inóculo. Por otro lado, semillas de tomate fueron desinfectadas mediante un lavado con hipoclorito de sodio 5% seguido de tres lavados con agua destilada, y luego fueron puestas a germinar entre papeles de filtro estériles, manteniendo la humedad de los mismos mediante el agregado de agua destilada en condiciones de esterilidad. Pasados 4 o 5 días, los brotes se inocularon por inmersión durante 30 minutos con cada uno de los resuspendidos de las cepas, y con mezclas del resuspendido de *B. tropica* con cada cepa marcada con el gen reportero. Luego de la inoculación, las semillas se colocaron en frascos con solución de Fåhraeus agarizada al 0,5% p/v, y se llevaron a cámara de cultivo con luz y temperatura controladas. A los 10 días PI, se realizó el recuento de la población bacteriana del rizoplano y endofítica en raíces, mediante el protocolo que se detalla en el inciso 4.2.2 del presente Capítulo.

En las muestras inoculadas con mezclas, fue posible diferenciar a la cepa *B. tropica* de las marcadas mediante la adición de Tc (10 µg/ml), ya que las cepas marcadas con los genes *gfp* y *gus* son resistentes a dicho antibiótico.

Las poblaciones tanto endofítica como superficial en plantas de tomate inoculadas con *B. tropica*, *B. tropica-gfp* y *B. tropica-gus*, presentaron valores similares al realizar recuentos en raíces a los 10 días PI. Los valores hallados para la población endofítica fueron del orden de 10^5 UFC/gr de raíz, mientras que en el caso de la población del rizoplano, se hallaron valores cercanos a 10^7 UFC/gr.

Los valores obtenidos en el ensayo de co-inoculación de plantas de tomate demostraron que las tres cepas analizadas presentaron un comportamiento similar en el proceso de colonización de plantas de tomate. Estos resultados permitieron que la cepa salvaje y las marcadas con los genes *gus* y *gfp* pudieran ser consideradas como equivalentes en el estudio de la colonización de tejidos vegetales.

4.5.2 Puesta a punto del protocolo de extracción de ADN

Con el fin de comprobar que los microorganismos obtenidos a partir del recuento en placa correspondían al microorganismo inoculado, fue necesario poner a punto una técnica de extracción de ADN a partir de colonias aisladas que permitiera la obtención de ADN apto para ser amplificado mediante PCR. Se ensayaron dos protocolos de extracción de ADN:

Protocolo 1:

- Se tomaron bacterias de los cultivos en placa y se resuspendieron en 100 μ l de sarcosil 0,1% en TE. En cuanto a los cultivos líquidos, se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 100 μ l de sarcosil 0,1% en TE.
- Centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos y descartar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento en 1 ml de NaCl 1M y homogeneizar (este lavado puede repetirse varias veces).
- Centrifugar 2 minutos y descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 250 μ l 20% sacarosa en TE + 250 μ l 5 mg/ml lisozima en TE
- Incubar a 37°C durante 60 minutos.
- Agregar 50 μ l 5% sarcosil 10 mg/ml proteinasa K en TE. Mezclar con cuidado.
- Incubar a 37°C durante 60 minutos.

Protocolo 2:

- Se tomó una pequeña cantidad de muestra de las colonias crecidas en medio sólido LGI y se la colocó en un tubo eppendorf.
- Realizar 3 lavados agregando 500 μ l de NaCl 1M, con posterior centrifugación de 2 minutos y descartar del sobrenadante cada vez.
- Al *pellet* obtenido realizarle un último lavado con 1 ml de agua bidestilada.
- Luego de una centrifugación de 2 minutos y posterior descarte del sobrenadante, adicionar 200 μ l de agua bidestilada y hervir durante 6 a 8 minutos.
- Centrifugar las muestras, tomar el sobrenadante que contiene el ADN que se extrajo de las células bacterianas y colocar en nuevos tubos eppendorf.

Una vez extraído el ADN, se midió la concentración obtenida mediante la utilización de un equipo Nanodrop, y se estimó la pureza del mismo al obtener la relación de absorbancia 260/280 de las muestras.

Los dos protocolos mostraron resultados similares. Una vez realizadas las extracciones de ADN, las suspensiones obtenidas se midieron con el equipo Nanodrop, con el fin de determinar la cantidad de

ADN obtenida, así como la pureza del mismo. Se realizó también la medición de la absorbancia a 260 nm, ya que a esa longitud de onda absorben las bases aromáticas de la estructura del ADN. Purinas y pirimidinas presentan un pico de absorbancia a 260 nm, siendo este valor importante en la cuantificación. Por otro lado, se mide también la absorbancia a 280 nm, ya que a esta longitud de onda normalmente se miden las proteínas y los compuestos fenólicos. La relación entre estas dos medidas de absorbancia da idea de la pureza de la muestra, ya que indica la contaminación por presencia de proteínas. Las muestras con ADN relativamente puro presentan un valor de relaciones de absorbancia 260/280 de entre 1,8 y 2,1.

Las muestras obtenidas con los dos protocolos utilizados presentaron buenas cantidades de ADN (en general cercanas a los 200 ng/ μ l), con relaciones de absorbancia 260/280 cercanas a 1,9 y curvas definidas, lo que implica una pureza de ADN aceptable para ser utilizada en las técnicas de biología molecular que se realizarían posteriormente. Por lo tanto, debido a la simpleza del método, se decidió utilizar en los ensayos posteriores el protocolo 2.

Los cebadores utilizados, denominados Btrop-F y Btrop-R, fueron reportados por Wong-Villarreal y colaboradores (2010), y fueron probados con el ADN extraído de cultivos líquidos de *B. tropica* y *B. tropica-gfp*. Se evaluaron distintas concentraciones de ADN (entre 50 y 200 ng/ μ l), con el fin de determinar la concentración necesaria para obtener una eficiente amplificación. El protocolo y ciclado utilizado fue los reportados por Wong-Villarreal, y la observación de los amplicones fue realizada como se detalla en el inciso 4.2.7 de este Capítulo. Se obtuvo amplificación luego de la realización de la PCR con los cultivos de *B. tropica* y *B. tropica-gfp*, en todas las concentraciones de ADN analizadas. El amplicón obtenido fue de 486 pb, tal como había sido reportado previamente.

Capítulo 5

Evaluación de *Burkholderia tropica* como
inoculante para mejorar la productividad de
cultivos de trigo y sorgo

Capítulo 5

Evaluación de *Burkholderia tropica* como inoculante para mejorar la productividad de cultivos de trigo y sorgo

5.1 RESUMEN

Cuando un microorganismo con características de promover el crecimiento vegetal *in vitro* se pretende utilizar como potencial inoculante en prácticas agrícolas, es necesario determinar su habilidad para colonizar las plantas inoculadas como requisito indispensable para luego poder comprobar los efectos beneficiosos de su acción *in vivo*, en invernadero y a campo. No obstante, es necesario evaluar aspectos prácticos fundamentales para su posible uso, entre los que se pueden mencionar: 1- la posibilidad de lograr una viabilidad bacteriana prolongada en formulaciones líquidas, como habitualmente se emplean estos promotores de crecimiento; 2- la compatibilidad con los agroquímicos normalmente utilizados por los productores; 3- la habilidad para sobrevivir sobre la superficie de las semillas inoculadas. Además es necesario estudiar la universalidad de su acción investigando si el efecto promotor se expresa en diferentes especies vegetales. En este capítulo se describe el comportamiento de *B. tropica* MTo-293 en los aspectos eminentemente prácticos arriba mencionados necesarios para considerar su uso como inoculante y también su efecto sobre la productividad de cultivos de trigo y sorgo a campo cuando es aplicada sobre la semilla. Fue posible formular un inoculante que mantiene la viabilidad bacteriana por períodos relativamente prolongados de tiempo. También se determinó que *B. tropica* MTo-293 aplicada sobre semillas de ambas gramíneas en dosis comúnmente utilizadas para otras PGPB permanece viable por 48 hs y fue capaz de colonizar eficientemente el rizoplasma. Fue compatible con un fungicida de amplio uso en los cultivos ensayados. Se pudo observar un efecto promotor de crecimiento vegetal que trajo aparejado una mejora consistente (aunque no estadísticamente significativa) en el rendimiento en un cultivo de interés agronómico como es el trigo.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Organismos y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *B. tropica* para el estudio de supervivencia en medios líquidos y los ensayos de promoción de crecimiento a campo, y *B. tropica-gfp* para el ensayo de supervivencia en semilla. Los inóculos para cada ensayo se realizaron como se mencionó anteriormente, en medio LGI modificado con 15 g/l de glicerol y 2 g/l de EL.

Se utilizaron semillas de trigo variedad Baguette 9 (Nidera Semillas) y sorgo variedad Energía (KWS).

5.2.2 Supervivencia en formulaciones líquidas

Se realizaron 4 tratamientos, que incluyeron el agregado de distintos aditivos para evaluar su contribución a la supervivencia de las bacterias en el envase. Cada aditivo se formuló en solución acuosa al doble de concentración (2X) y se adicionó a un volumen igual de cultivo bacteriano de 48 horas. Los tratamientos se describen a continuación:

- *B. tropica* sin aditivo (SA)
- *B. tropica* + alcohol polivinílico (APV) (10 g/l). Fórmula general: $(C_2H_4O)_n$. Este polímero tiene la propiedad de formar películas, por lo que es utilizado como emulsionante y adhesivo (Sekisui Speciality Chemical)
- *B. tropica* + goma xantano (GX) (3 g/l). Fórmula general: $C_{35}H_{49}O_{29}$. Es un polisacárido extracelular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459, utilizado como estabilizante, emulsionante y espesante (Sidley Chemical)
- *B. tropica* + gelatina (10 g/l). La gelatina está compuesta en un 78 a 90% de proteína proveniente de la hidrólisis del colágeno y entre 1 y 2% de sales minerales, y es utilizada como gelificante (Parafarm)

Cada una de las 4 formulaciones se envasó en bolsas de polietileno estériles (150 ml por bolsa) y fue mantenida a 20-25°C. A distintos tiempos post-ensado, se tomó muestra de cada formulado y se realizaron dos determinaciones: 1- cuantificación de las UFC/ml: se realizaron diluciones seriadas y recuento en placa en medio LGI agarizado tal como se mencionó en anteriormente y medidas de pH de los formulados; 2- evaluación de la eficiencia de colonización del rizoplasma y endofítica: a los 7 días PI por el método de dilución en placa, inoculando por inmersión semillas de trigo desinfectadas tal como se detalló anteriormente. Se realizaron dos ensayos independientes de cada experimento.

5.2.3 Supervivencia en semilla

Se realizaron 8 tratamientos para evaluar la viabilidad en función del tiempo de las bacterias inoculadas sobre las semillas de trigo y sorgo no desinfectadas, tratadas con protector o fungicida aplicados en las dosis comúnmente empleadas a campo para otras PGPB.

- Inóculo bacteriano (I): 600 ml de inóculo con 1.10^{10} UFC/ml / 100 kg de semillas.
- Fungicida (F): (Carbendazim (2-metaxicarbamoil-bencimidazol) 18,75% + Tiram (tetrametil thiuram disulfuro) 18,75%): 250 ml / 100 kg de semillas.
- Protector (P): (Sacarosa 80% p/v y jarabe de maltosa 1:1): 140 ml / 100 kg de semillas.

Se realizaron controles adicionando agua destilada estéril en lugar del cultivo bacteriano. En la Tabla 5.1, se detallan los distintos tratamientos.

Tratamientos	Fungicida	Inóculo	H ₂ O	Protector
1 (I)	-	1,5	3,5	-
2 (I + F)	0,625	1,5	2,875	-
3 (I + P)	-	1,5	3,125	0,375
4 (I + P + F)	0,625	1,5	2,5	0,375
5	-	-	5,0	-
6	0,625	-	4,375	-
7	-	-	4,625	0,375
8	0,625	-	4,0	0,375

Tabla 5.1 Tratamientos del ensayo de supervivencia en semillas. Los valores corresponden al volumen (ml) de cada componente para tratar 250 g de semillas.

Se pesaron 250 gramos de cada semilla para cada tratamiento y se colocaron en bolsas de polietileno. Inóculo, agua y protector fueron mezclados previamente a su aplicación. Para las mezclas que contenían fungicida, primero se adicionó el mismo, se dejó airear 20-30 minutos y luego se agregó la mezcla de aditivos. Se agitaron las bolsas hasta que todas las semillas se impregnaron con la mezcla e inmediatamente fueron usadas para determinar el número inicial de bacterias por semilla (tiempo cero) o bien, se airearon y se transfirieron a bolsas de papel madera, donde fueron conservadas a 20-25°C hasta ser analizadas. A distintos tiempos (0, 4, 24 y 48 hs) se realizaron dos determinaciones: 1- cuantificación de las UFC/semilla: 10 gramos de semillas de cada bolsa (por duplicado) se colocaron en erlenmeyers con 100 ml de solución fisiológica con Tween 80 0,1% v/v en agitación durante 30 minutos a 250 rpm, para remover las bacterias pegadas a las semillas. Se tomaron 10 ml de la suspensión resultante (por duplicado) para realizar una primera dilución con un volumen representativo, y se realizaron las posteriores diluciones seriadas en solución fisiológica. Se sembraron en medio LGI agarizado con Tc y, se determinaron las UFC/ml por recuento en placa. Con este valor, y teniendo en cuenta que en los 10 gramos analizados la cantidad de semillas es alrededor de 250, se calculó el número de bacterias viables por semilla; 2- determinación de la eficiencia de

colonización del rizoplasma y endofítica de las bacterias pegadas a la semilla: las semillas inoculadas se colocaron en solución de Fåhræus agarizada para analizar la colonización a los 7 días de crecimiento, como se describió previamente. Se realizaron tres ensayos independientes para cada tipo de semilla.

5.2.4 Promoción de crecimiento a campo

5.2.4 a - Sitios experimentales y campañas

Los ensayos de promoción de crecimiento se realizaron en tres sitios experimentales diferentes de la Provincia de Buenos Aires, con distintas características edafoclimáticas:

- Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow, Tres Arroyos, sur de la Provincia de Buenos Aires (Latitud S: 38° 20' 38". Longitud O: 60° 28' 16". Altitud 212 m.s.n.m.). Suelo franco arcilloso, con limitación de profundidad por manto de tosca a 0,60 metros. 18,8 ppm de P disponible, 4,5% de materia orgánica, un pH de 6,00 y 0,179% de nitrógeno total.
- Campo productor en la localidad de Necochea: sudeste de la Provincia de Buenos Aires (Latitud S: 38° 37' 15". Longitud O: 58° 55' 04". Altitud 14 m.s.n.m.). Suelo franco arcillo arenoso, con limitación de profundidad por manto de tosca a 1,3 metros. 13,6 ppm de P disponible, 6,45% de materia orgánica, un pH de 5,80 y 0,281% de nitrógeno total.
- Campo productor en la localidad de Chivilcoy: centro - oeste de la Provincia de Buenos Aires (Latitud S: 35° 04' 16". Longitud O: 59° 55' 15". Altitud 48 m.s.n.m.). Suelo franco arcillo limoso, con limitación de profundidad por manto de tosca >1,8 metros. 30 ppm de P disponible, 3,39% de materia orgánica, pH de 6,00 y 0,201% de nitrógeno total.

Previo a la siembra todas las semillas fueron tratadas con fungicida (igual calidad y cantidad que en el punto 5.2.3), se dejaron airear y luego se inocularon con la mezcla de formulado bacteriano sin aditivos (Tratamiento SA, punto 5.2.2) y el protector (igual calidad y cantidad que en el punto 5.2.3). Los tratamientos no inoculados recibieron el mismo tratamiento que los inoculados. En todos los casos, no pasaron más de 5 días entre el envío del inoculante (refrigerado) y su utilización. La dosis de inóculo utilizada en todas las campañas fue de 600 ml de formulado sin dilución previa por cada 100 kg de semillas. Se utilizaron semillas de trigo variedad Baguette 9, y las semillas de sorgo fueron variedad Malon en la campaña 2012-2013 y variedad Energía en la campaña 2015-2016.

Se realizaron en total 6 campañas (4 de trigo y 2 de sorgo) (Tabla 5.2). La siembra se realizó en Junio/Julio para trigo y en Octubre/Noviembre para sorgo, y la cosecha en Noviembre/Diciembre para trigo y Enero/Febrero para sorgo. Se midió el rendimiento como kg de grano producidos por hectárea al momento de la cosecha, a la madurez fisiológica.

	Campaña	Cultivo	Ubicación
1	2011 - 2012	Trigo	Tres Arroyos
2	2012 - 2013	Trigo	Tres Arroyos
3	2012 - 2013	Sorgo	Tres Arroyos
4	2013 - 2014	Trigo	Necochea
5	2014 - 2015	Trigo	Tres Arroyos
6	2015 - 2016	Sorgo	Chivilcoy

Tabla 5.2 Campañas realizadas entre los años 2012 y 2016.

5.2.4 b - Tratamientos

Los tratamientos realizados en cada campaña se adecuaron a las especificaciones y requerimientos de cada sitio experimental, y se detallan en la tabla 5.3. Se realizó en todos los casos un diseño en bloques completos al azar con 3 repeticiones por tratamiento.

Tratamientos	Campañas					
	1 Trigo	2 Trigo	3 Sorgo	4 Trigo	5 Trigo	6 Sorgo
Testigo Absoluto	X	X	X	-	X	X
Testigo + P	X	X	-	X	X	X
Testigo + N	-	X	-	-	X	X
Testigo + P + N	X	X	X	-	X	X
<i>B tropica</i>	X	-	X	-	X	X
<i>B tropica</i> + P	-	X	-	X	X	X
<i>B. tropica</i> + N	-	X	-	-	X	X

Tabla 5.3 Tratamientos realizados en las seis campañas analizadas en el presente trabajo. P: fertilización fosforada. N: fertilización nitrogenada.

En cada caso, la fertilización con P y N se realizó según requerimientos del sitio experimental. La composición y cantidad de fertilizante utilizado en cada campaña se detalla en la tabla 5.4. La fertilización fosforada se realizó al momento de la siembra. En el caso del trigo, la fertilización nitrogenada se realizó en el macollaje. En las campañas de sorgo, la misma fue adicionada en la etapa V6, correspondiente a la floración.

Fertilización	Campañas					
	1 Trigo	2 Trigo	3 Sorgo	4 Trigo	5 Trigo	6 Sorgo
Fuente de P	80 kg/ha FDA	90 kg/ha FDA	90 kg/ha FDA	40 y 80 kg/ha FMA	90 kg/ha FDA	180 kg/ha FDA
Fuente de N	130 kg/ha Urea	130 kg/ha Urea	130 kg/ha Urea	-	80 kg/ha UAN	150 l/ha Solmix

Tabla 5.4 Fertilización fosforada y nitrogenada utilizada en cada campaña. FDA: fosfato diamónico. FMA: fosfato monoamónico. UAN: urea – nitrato de amonio. Solmix: mezcla líquida de nutrientes.

5.2.4 c - Análisis microbiológico de las plantas

Plantas enteras tomadas al final de cada ensayo (al momento de la cosecha) de cada uno de los tratamientos de todas las campañas fueron enviadas refrigeradas al CINDEFI, donde se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Por duplicado para cada tratamiento, se separó la raíz de las plantas, y se sumergió en un volumen determinado de solución fisiológica estéril con Tween 80. Se agitó vigorosamente durante 5 minutos, y la suspensión resultante se consideró como la rizosfera (Figura 5.1). Se realizaron diluciones con solución fisiológica de esta suspensión y se sembraron en medio LB agarizado como fue detallado anteriormente, con el fin de obtener aislamientos de los microorganismos presentes en la muestra.

No se analizó la población del rizoplasma debido al gran tamaño de las raíces y a la dificultad en la realización de los lavados para eliminar la tierra adherida a las mismas. Por lo tanto, se desinfectaron las raíces para analizar la población endofítica. Las raíces fueron lavadas tres veces con solución fisiológica estéril, y posteriormente desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v durante 10 minutos. La desinfección fue seguida de tres lavados con solución fisiológica con Tween 80 con agitación vigorosa (Figura 5.1). Se realizaron controles de desinfección apoyando las raíces desinfectadas en medio LB agarizado. Los tejidos se maceraron en morteros con 1 ml de solución fisiológica como se detalló en ensayos anteriores, y la suspensión resultante se sembró en medio LB agarizado luego de realizar las diluciones apropiadas.

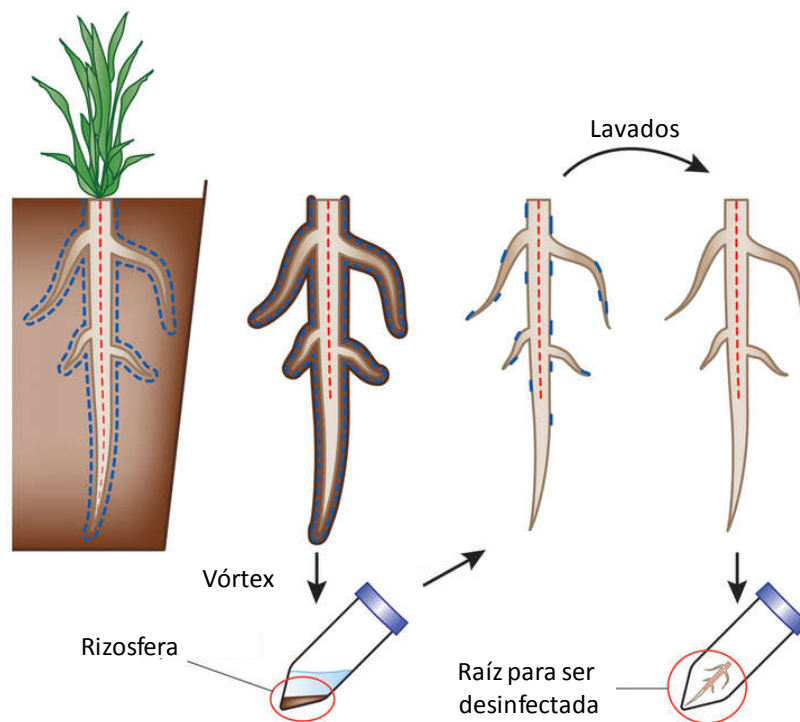


Figura 5.1 Metodología de tratamiento de las muestras de raíces de plantas de campo. Imagen adaptada de Hirsch *et al.*, 2012.

En las campañas de trigo y sorgo 2012-2013, se separó una porción de tallo de aproximadamente 5 cm por encima de la zona de diferenciación con la raíz. Los mismos fueron desinfectados al igual que las raíces, se realizaron los mismos controles de desinfección, y posteriormente se retiró la primera capa de tejido en condiciones de esterilidad. Los tallos se maceraron como se describió anteriormente, y se realizaron las diluciones necesarias para el recuento en medio LB agarizado. Las placas sembradas con las diluciones de la rizosfera y los macerados de raíces y tallos se llevaron a estufa a 30°C durante 24 horas.

Los macerados de tejidos y la rizosfera fueron también sembrados en viales con 5 ml de medio BAZ semisólido (Tabla 5.5) (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001) con ácido azelaico, utilizado como FCE por la mayoría de las especies conocidas del género *Burkholderia*, con el agregado de 200 µg cicloheximida a cada vial para impedir el crecimiento de hongos. Los viales sembrados se llevaron a estufa a 30°C durante 7 días. El crecimiento en los viales con BAZ se caracteriza por un viraje del indicador (azul de bromotimol) hacia el color azul (amarillo-pH ácido; azul-pH básico) y la formación de una película en la superficie para los microorganismos que pueden crecer fijando nitrógeno en vida libre.

Componente	Concentración (g/l)
Ácido azelaico	2,0
K ₂ HPO ₄	0,4
KH ₂ PO ₄	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,002
FeCl ₃	0,01
Azul de bromotimol	0,075
Agar	2,3
pH	6,00

Tabla 5.5 Composición del medio BAZ (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001).

A partir de las colonias que crecieron de las muestras sembradas en medio LB y de las películas en los viales de medio BAZ se realizaron estriados por agotamiento en medio LB agarizado y luego los aislamientos fueron repicados en LB (Figura 5.2). A cada aislamiento se le realizó la extracción de ADN seguida de la PCR con los cebadores Btrop-F/Btrop-R, según el protocolo detallado en el Capítulo 4.

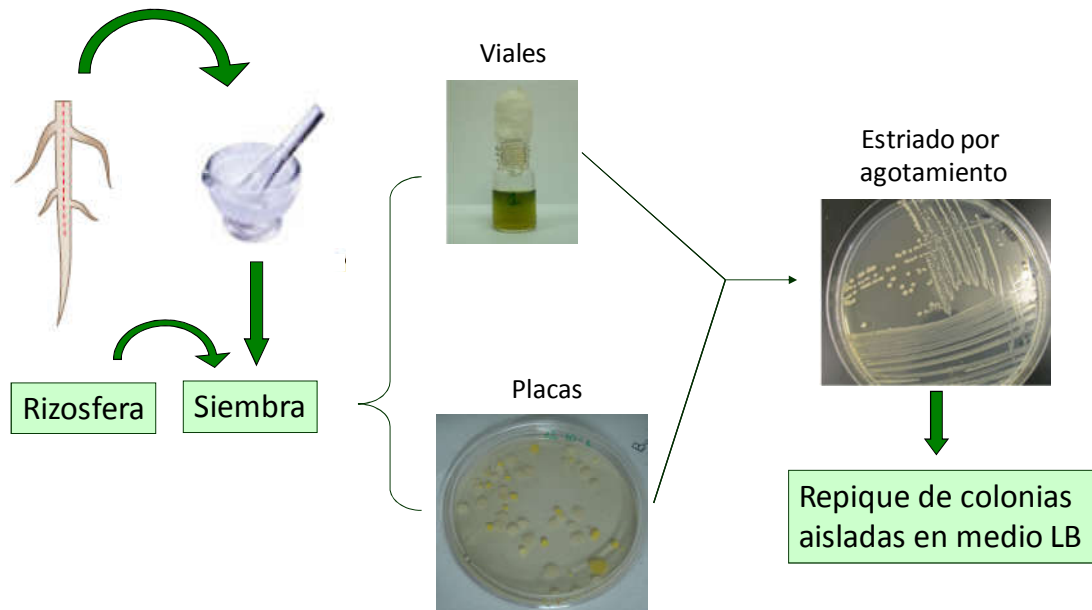


Figura 5.2 Esquema del aislamiento de microorganismos de rizosfera/tejidos de plantas de muestras de campo.

5.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron con el programa SigmaStat 3.5. Se realizó un análisis de la varianza (*One Way Analysis of Variance*, ANOVA) seguido de la prueba LSD para $p < 0,05$ cuando fue aplicable. En los ensayos a campo, se utilizó $p < 0,1$.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSION

La concentración celular alcanzada en los cultivos de 48 hs en medio LGI con glicerol (15 g/l) y EL (2 g/l) que se emplearon como inóculos en todos los ensayos fue del orden de 1.10^{10} UFC/ml, tal como se mostró en el Capítulo 4.

5.3.1 Supervivencia en formulaciones líquidas

Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar y mejorar la supervivencia de *B. tropica* en función del tiempo de envasado con el agregado de distintos aditivos que pudieran contribuir al mantenimiento de la viabilidad. Se determinó la viabilidad de *B. tropica* con los aditivos ensayados mediante el método de dilución en placa realizado a distintos tiempos post-ensado (Figura 5.3).

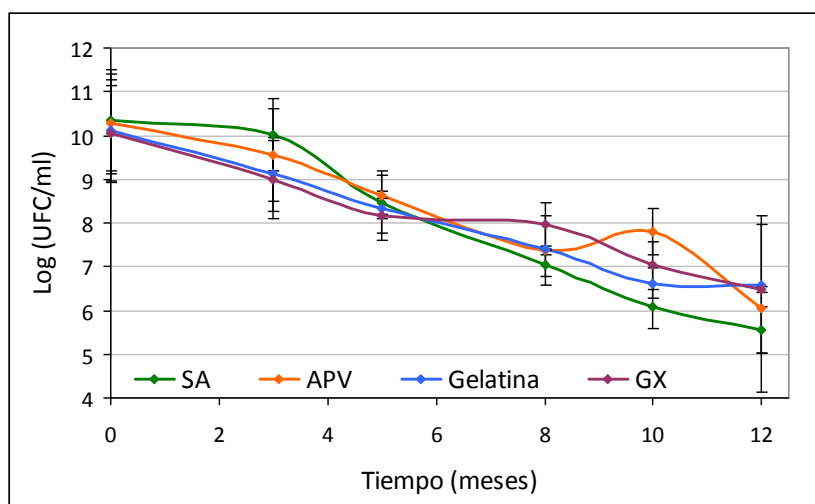


Figura 5.3 Microorganismos viables expresados en UFC/ml en los tratamientos ensayados a distintos tiempos post-ensado.

Se obtuvieron recuentos de bacterias viables del orden de 1.10^8 UFC/ml a los 6 meses post-ensado para todas las mezclas. Este recuento es un valor adecuado para un inoculante comercial (según Anexo 1 de la Resolución 264-2011, SENASA). Los aditivos ensayados no lograron una mejora significativa de la viabilidad comparados con el cultivo bacteriano sin el agregado de aditivos. Por tanto, fue posible mantener una adecuada concentración de bacterias viables para un potencial producto comercial.

Se midió el pH de los cultivos envasados en todos los tiempos analizados. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 5.4.

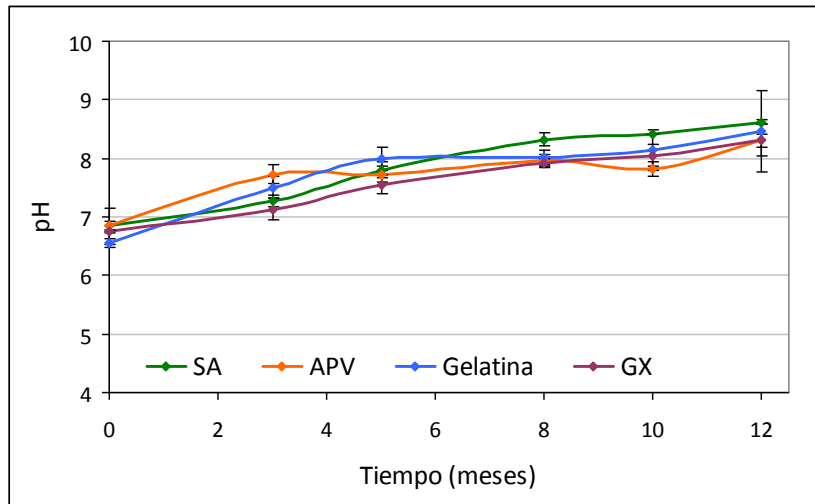
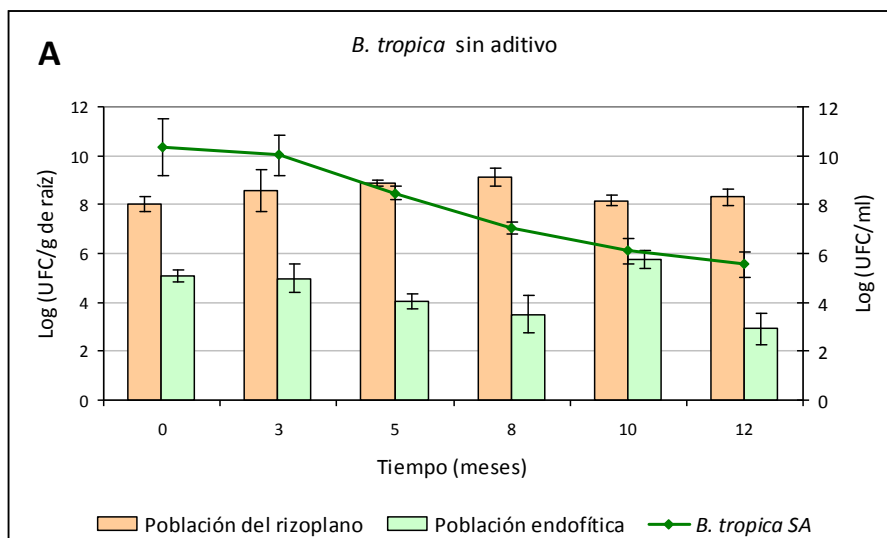


Figura 5.4 Valores de pH de los tratamientos ensayados a los tiempos post-ensavado analizados.

El pH inicial de cada formulado fue de aproximadamente 6,8-7,00 (pH final del cultivo) y aumentó hasta valores cercanos a 8,50 al finalizar el ensayo. Este aumento en el valor de pH probablemente se deba a la lisis celular, teniendo en cuenta que el pH de crecimiento se encuentra entre 4,50 y 7,00 (Reis *et al.*, 2004).

Paralelamente, se analizó la efectividad de la colonización del rizoplano y endofítica en raíces de plantas de trigo a los 7 días PI inoculadas con muestras de cada tratamiento a los mismos tiempos que se realizaron los recuentos de células viables (Figura 5.5 A, B, C y D). No se encontraron diferencias significativas entre los valores hallados de colonización del rizoplano de cada tratamiento en el tiempo, así como tampoco de la colonización endofítica de cada tratamiento.



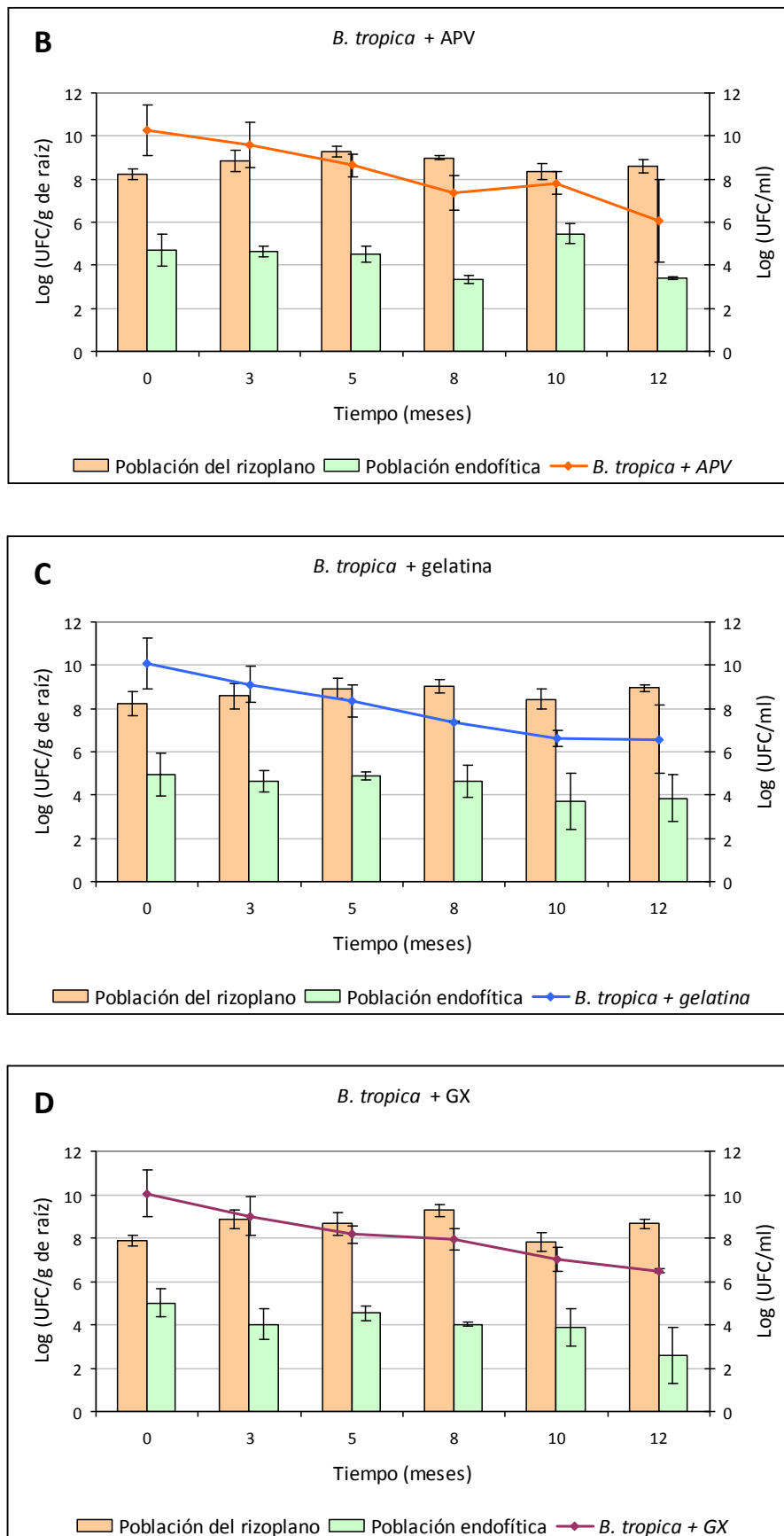


Figura 5.5 Población bacteriana del rizoplano y endofítica en raíces de plantas inoculadas con *B. tropica* envasada sin aditivo (A), con APV (B), con gelatina (C) y GX (D) a los 7 días PI y recuento de viables en el envase de cada tratamiento.

Se obtuvo una eficiente colonización tanto del rizoplasma como endofítica en los tiempos ensayados. Por lo tanto, se pudo concluir que la disminución en la viabilidad de *B. tropica* en el tiempo en los cultivos envasados no afectó su capacidad de colonización de tejidos vegetales.

5.3.2 Supervivencia en semillas

Este ensayo fue realizado para determinar la viabilidad de *B. tropica* en función del tiempo luego de ser inoculada en semillas de trigo y sorgo con el agregado de protector y de fungicida. Para ello se llevaron a cabo dos determinaciones: 1- cuantificación de las UFC/semilla y 2- determinación de la eficiencia de colonización del rizoplasma y endofítica de las bacterias pegadas a la semilla.

En relación a la cuantificación de UFC/semilla, no hubo crecimiento en los tratamientos 5, 6, 7 y 8, los cuales corresponden a los controles sin inocular. Se observó que la supervivencia de *B. tropica* en ambas semillas disminuyó con el tiempo PI independientemente del tratamiento (Figura 5.6 A y B). Las concentraciones iniciales (a tiempo cero) expresadas en UFC/semilla, que resultan de remover las bacterias inoculadas y pegadas en las semillas, fueron diferentes entre tratamientos, posiblemente porque tanto el protector como el fungicida actuaron inmediatamente de una manera positiva o negativa, respectivamente sobre la viabilidad de la bacteria. Una marcada disminución en la viabilidad ocurrió en las primeras 4 horas PI:

- en semillas de trigo la viabilidad de *B. tropica* disminuyó aproximadamente entre 1 y 2 órdenes de magnitud en muestras sin protector (Tratamientos 1 y 2) en comparación con aquellas semillas tratadas con protector (Tratamientos 3 y 4), en las cuales la disminución de viabilidad fue menor.
- en semillas de sorgo la viabilidad de *B. tropica* disminuyó de manera semejante en todos los casos, independientemente del tratamiento, aún en presencia de protector.
- la presencia de fungicida disminuyó la viabilidad de las bacterias sobre las semillas de trigo en mayor grado que en las semillas de sorgo (Tratamientos 1 y 2).

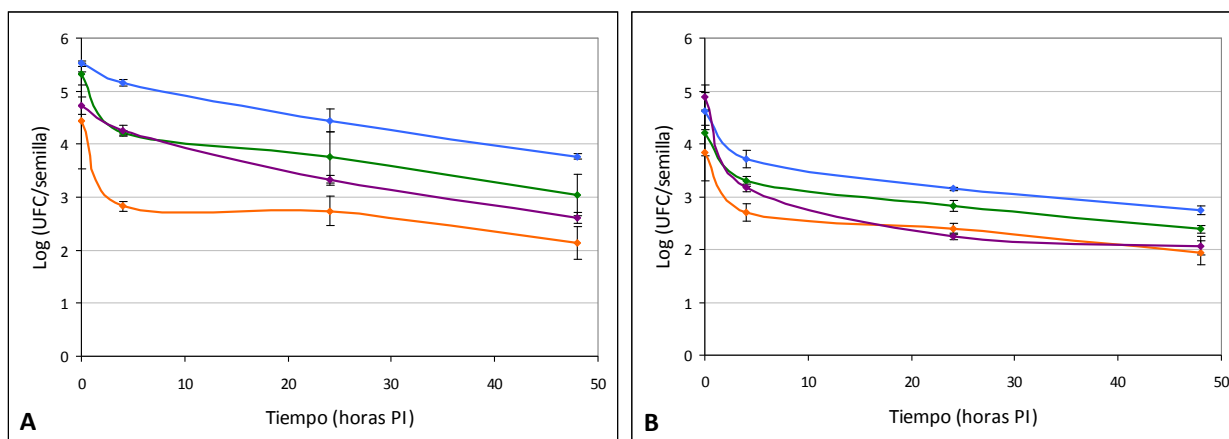


Figura 5.6 Supervivencia de *B. tropica* en semillas de trigo **(A)** y sorgo **(B)** a distintos tiempos PI utilizando diferentes tratamientos. Se representan el promedio de los valores obtenidos en cada punto.

- Tratamiento 1 (I)
- Tratamiento 2 (I + F)
- Tratamiento 3 (I + P)
- Tratamiento 4 (I + F + P)

Independientemente del tratamiento y del tiempo PI, la viabilidad bacteriana disminuyó como consecuencia del *stress* causado probablemente por la desecación a la que se exponen sobre la superficie de la semilla, datos que concuerdan con los reportados para otros microorganismos (Herridge, 2001; Salema *et al.* 1982; Singleton *et al.*, 2002). La adición del protector (Tratamientos 3 y 4) contribuyó al incremento de la supervivencia bacteriana sobre las semillas de trigo a las 48 hs (aproximadamente 1.10^4 UFC/semilla), tanto en presencia como en ausencia de fungicida, pero este efecto no se observó en semillas de sorgo (aproximadamente 1.10^3 UFC/semilla).

A las 0, 24 y 48 horas PI las semillas también se colocaron en frascos en condiciones controladas de crecimiento y se determinó a los 7 días la eficiencia de colonización del rizoplasma y endofítica de las bacterias pegadas a la semilla de trigo y sorgo, como se muestra en las Figuras 5.7 A-B y 5.8 A-B, respectivamente).

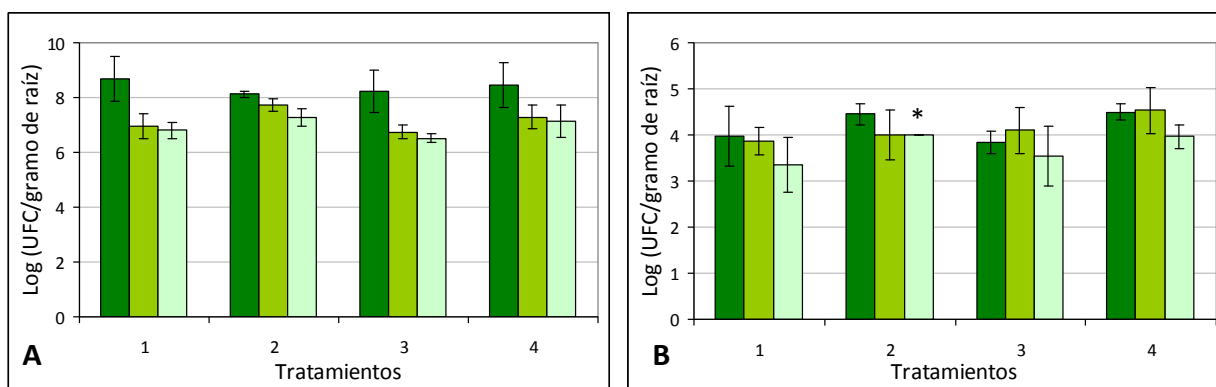


Figura 5.7 Población del rizoplasma **(A)** y endofítica **(B)** de raíces de trigo de los 4 tratamientos a los 7 días de crecimiento, de semillas puestas a crecer a las 0, 24 y 48 horas PI. *en este tiempo no hubo colonización endofítica en el 100% de las muestras analizadas. ■ 0 hs ■ 24 hs ■ 48 hs

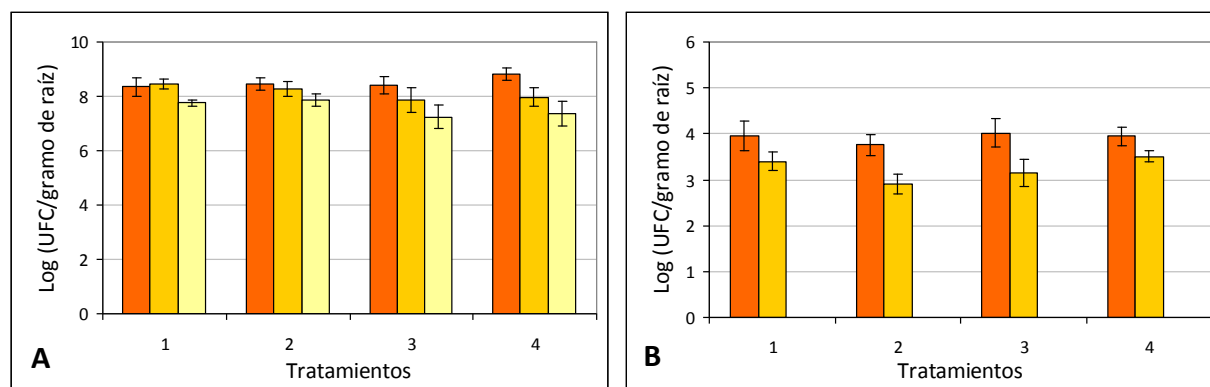


Figura 5.8 Población del rizoplaneo (A) y endofítica (B) de raíces de sorgo de los 4 tratamientos a los 7 días de crecimiento, de semillas puestas a crecer a las 0, 24 y 48 horas PI. ■ 0 hs ■ 24 hs ■ 48 hs

En ningún caso se observó crecimiento en los tratamientos de los testigos sin inocular en placas con Tc. En plantas de trigo se observó que, independientemente del tratamiento y de la disminución de bacterias viables en las semillas hasta alcanzar valores del orden de 1.10^2 UFC/semilla (Tratamiento 2), las bacterias remanentes fueron suficientes para colonizar eficientemente los tejidos vegetales a los 7 días de crecimiento. Si bien a las 48 horas PI, la población del rizoplaneo disminuyó en promedio un orden de magnitud para todos los tratamientos, esto no afectó la colonización endofítica. En raíces de sorgo, a todos los tiempos analizados se observó que la población del rizoplaneo fue similar, pero se vio afectada la colonización endofítica: a las 48 horas, independientemente del tratamiento, no se observó colonización endofítica, mientras que a los otros tiempos se registró colonización endofítica. Esto podría deberse a que el número de bacterias de la superficie no es suficiente para ingresar a los tejidos (estrictamente a las 48 hs fue cercano pero menor a 1.10^8 UFC/gramo de raíz). No obstante, al igual que lo sugerido en el Capítulo 4, el estado fisiológico o metabólico del microorganismo puede estar relacionado con su capacidad de ingreso a los tejidos, siendo útil el análisis a tiempos mayores.

5.3.3 Promoción de crecimiento a campo

Se analizó en cada campaña el rendimiento expresado en kg de grano/hectárea, y se analizaron las diferencias entre los promedios de los valores obtenidos en los tratamientos y el porcentaje que representan.

5.3.3 a - Efectos de la inoculación en trigo

Campaña 2011 - 2012

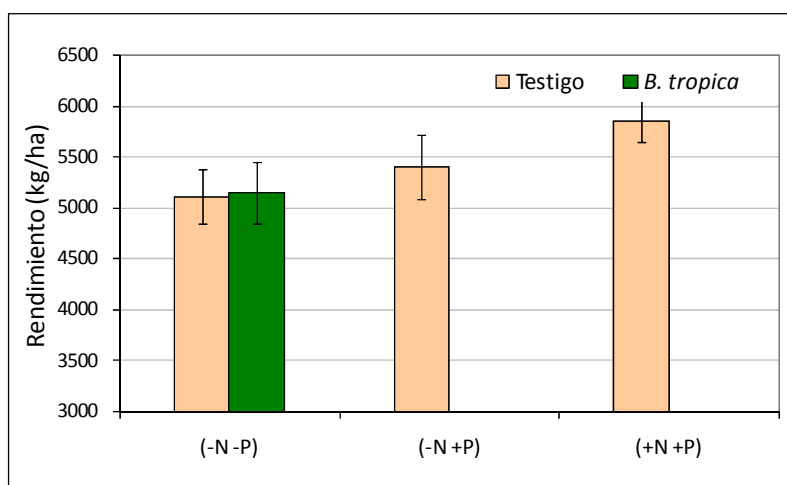


Figura 5.9 Rendimiento en grano.

Tratamiento	Promedio (kg/ha)	Diferencia con testigo absoluto (kg/ha)	Diferencia con testigos fertilizados (kg/ha)
Testigo 1 (-N -P)	5107		
Testigo 2 (-N +P)	5397	290 (5,7 %)	-254 (4,7%)
Testigo 3 (+N +P)	5847	740 (14,5 %)	-704 (-12%)
<i>B. tropica</i> (-N -P)	5143	36 (0,7 %)	

Tabla 5.6 Valores promedio de rendimiento de cada tratamiento. Diferencias entre los tratamientos y los testigos.

Campaña 2012 - 2013

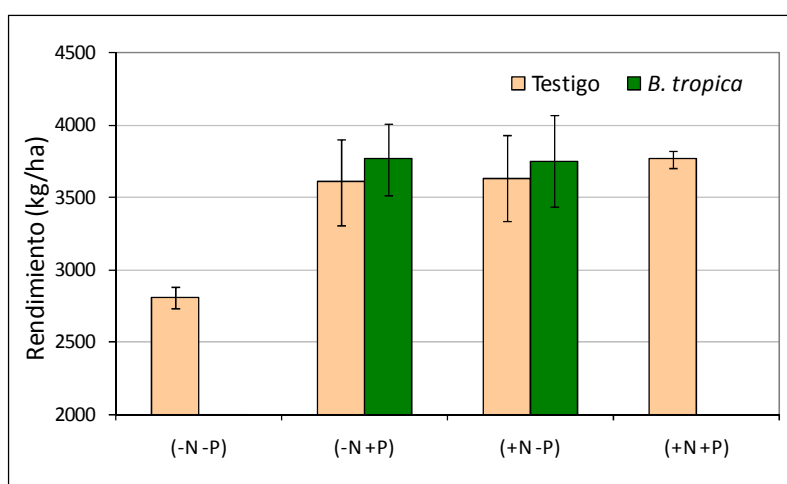


Figura 5.10 Rendimiento en grano.

Tratamiento	Promedio (kg/ha)	Diferencia con testigo absoluto (kg/ha)	Diferencia con testigo de cada tratamiento (kg/ha)
Testigo 1 (-N -P)	2806		
Testigo 3 (-N +P)	3602	796 (28,7 %)	
Testigo 2 (+N -P)	3630	824 (29,4 %)	
Testigo 4 (+N +P)	3763	957 (34,1 %)	
<i>B. tropica</i> (-N +P)	3761	948 (34 %)	159 (4,4%)
<i>B. tropica</i> (+N -P)	3749	955 (33,6 %)	119 (3,3%)

Tabla 5.7 Valores promedio de rendimiento de cada tratamiento. Diferencias entre los tratamientos y los testigos.

Campaña 2013 - 2014

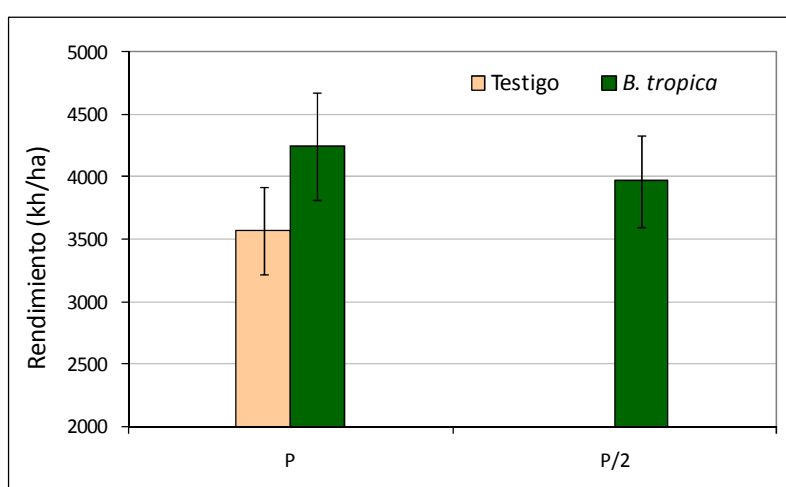


Figura 5.11 Rendimiento en grano.

Tratamientos	Promedio (kg/ha)	Diferencia con el testigo (kg/ha)
Testigo + P	3573	
<i>B. tropica</i> + P/2	3969	396 (11%)
<i>B. tropica</i> + P	4249	676 (19%)

Tabla 5.8 Valores promedio de rendimiento de cada tratamiento. Diferencias entre los tratamientos y los testigos.

Campaña 2014-2015

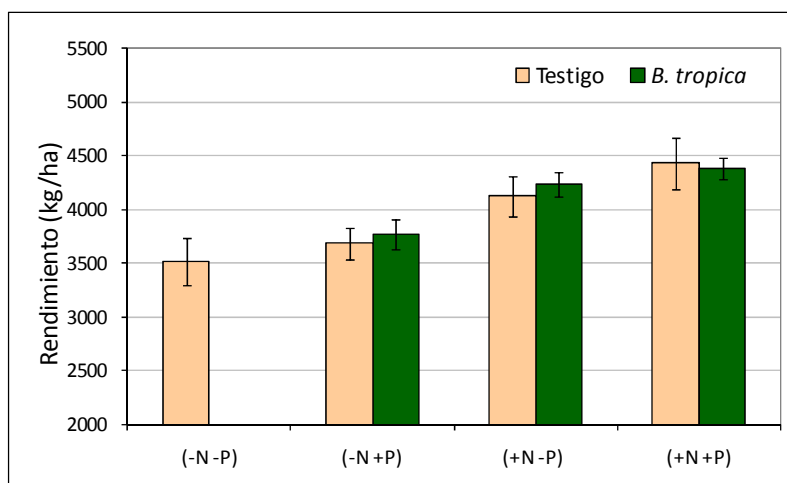


Figura 5.12 Rendimiento en grano.

Tratamientos	Promedio (kg/ha)	Diferencia con el testigo absoluto (kg/ha)	Diferencia con el testigo correspondiente (kg/ha)
Testigo 1 (-N -P)	3513,6		
Testigo 2 (-N +P)	3683,6	170 (4,8%)	
Testigo 3 (+N -P)	4121	607,4 (17,3%)	
Testigo 4 (+N +P)	4429,3	915,7 (26%)	
<i>B. tropica</i> (-N +P)	3767,3	253,7 (7,2%)	83,7 (2,3%)
<i>B. tropica</i> (+N -P)	4234,3	720,7 (20,5%)	113,3 (2,8%)
<i>B. tropica</i> (+N +P)	4379,3	865,6 (24,6%)	-50 (-1,1%)

Tabla 5.9 Valores promedio de rendimiento de cada tratamiento. Diferencias entre los tratamientos y los testigos.

En general, hubo una respuesta positiva a la inoculación de trigo con *B. tropica* con respecto a los testigos no inoculados. Aunque esta mejora en la producción de grano no fue estadísticamente significativa, los resultados muestran un mayor rendimiento para los tratamientos inoculados y representan una contribución importante para el agricultor. La FBN, la solubilización de fósforo, así como un efecto aditivo de éstas y otras propiedades de promoción del crecimiento vegetal que presentan estas PGPB pueden ser los mecanismos por los cuales estos microorganismos contribuyen al aumento de rendimiento en estos cultivos.

5.3.3 b - Efectos de la inoculación en sorgo

Campaña 2012 – 2013

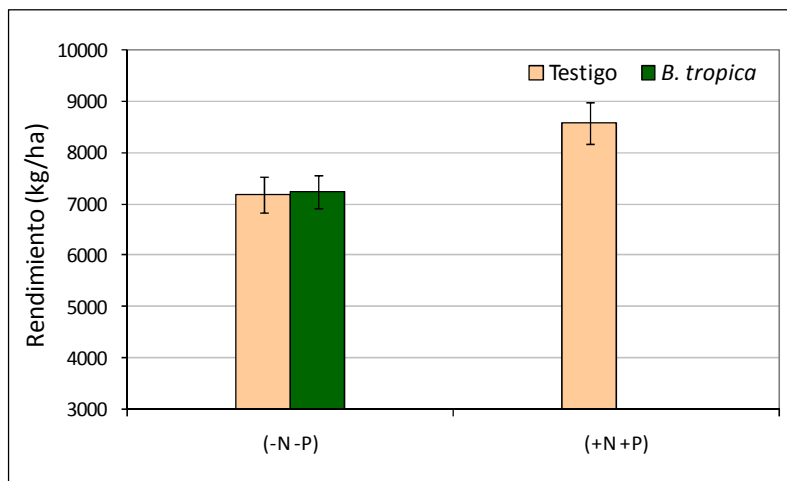


Figura 5.13 Rendimiento en grano.

Tratamiento	Promedio (kg/ha)	Diferencia con testigo absoluto (kg/ha)	Diferencia con testigo fertilizado (kg/ha)
Testigo 1 (-N -P)	7181		
Testigo 2 (+N +P)	8575	1394 (19,4%)	
<i>B. tropica</i> (-N -P)	7257	76 (1%)	-1318 (-15,4%)

Tabla 5.10 Valores promedio de rendimiento de cada tratamiento. Diferencias entre los tratamientos y los testigos.

Campaña 2015 – 2016

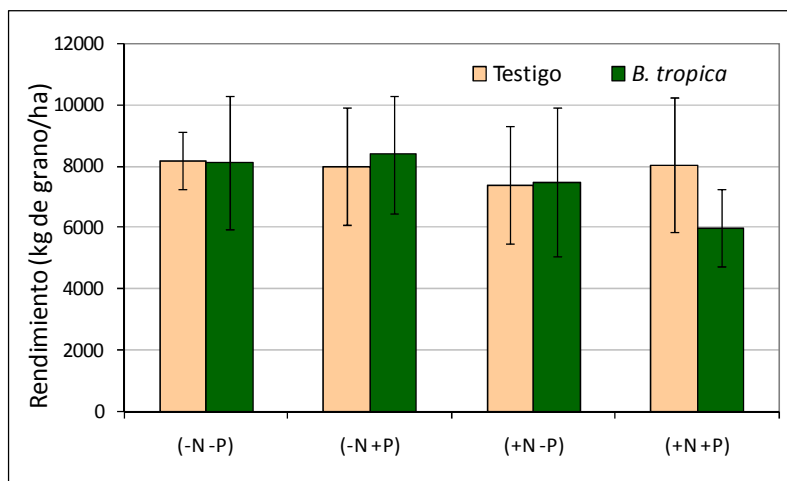


Figura 5.14 Rendimiento en grano.

Tratamientos	Promedio (kg/ha)	Diferencia con testigo absoluto (kg/ha)	Diferencia con el testigo correspondiente (kg/ha)
Testigo 1 (-N -P)	8188,4		
Testigo 2 (-N +P)	7997,3	-191,1 (2,3%)	
Testigo 3 (+N -P)	7399,9	-788,5 (-9,6%)	
Testigo 4 (+N +P)	8042,2	-146,2 (-1,8%)	
<i>B. tropica</i> (-N -P)	8114,8	-73,6 (-0,9%)	-73,6 (-0,9%)
<i>B. tropica</i> (-N +P)	8384,8	196,4 (2,4%)	387,5 (4,8%)
<i>B. tropica</i> (+N -P)	7481,2	-707,2 (-8,6%)	81,3 (1,1%)
<i>B. tropica</i> (+N +P)	5997,3	-2191,1 (-26,7%)	-2044,9 (-25,4%)

Tabla 5.11 Valores promedio de rendimiento de cada tratamiento. Diferencias entre los tratamientos y los testigos.

Los rendimientos obtenidos en las dos campañas de sorgo no mostraron una respuesta positiva a la inoculación con *B. tropica* con respecto a los testigos no inoculados, en incluso en la campaña de sorgo 2015-2016 no hubo respuesta a la fertilización. Podría ser relevante la realización de nuevos ensayos con este cultivo en zonas con mayor escasez de nutrientes, donde al igual que otras PGPB, el microorganismo en estudio pudiera ejercer sus efectos promotores, para poder tener resultados concluyentes sobre el efecto de la inoculación.

5.3.3 c – Análisis microbiológico de las plantas

Mediante los recuentos en medio LB agarizado, se buscó obtener en cada caso el número de UFC/gramo de la población total cultivable en la rizosfera, así como también del interior de las raíces y tallos. La población total de la rizosfera y endofítica (en raíces y tallos) en plantas inoculadas y no inoculadas, dieron en promedio los valores que se muestran en la Tabla 5.12.

Muestra	UFC totales/gramo
Rizosfera	1.10^6
Raíz	1.10^4
Tallo	1.10^3

Tabla 5.12 Valores de población bacteriana cultivable total en la rizosfera y en raíces y tallos desinfectados de las plantas provenientes de campañas a campo.

Los valores de población endofítica en raíz y tallo fueron similares a los encontrados en el recuento en tierra no estéril en plantas no inoculadas para microorganismos totales cultivables (Capítulo 4, inciso 4.3.5). La totalidad de los aislamientos, tanto de la rizosfera como de las raíces y tallos desinfectados a partir de las placas de LB agarizado, como de los viales con medio BAZ se muestran en la Tabla 5.13.

Campaña	Número de aislamientos
Trigo 2012 - 2013	56
Sorgo 2012 - 2013	17
Trigo 2013 - 2014	37
Trigo 2014 - 2015	52
Sorgo 2015 - 2016	11

Tabla 5.13 Número de aislamientos totales realizados en cada campaña.

Después de realizar la PCR con los cebadores BTropF/BTropR, no se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras analizadas. Se realizó en cada caso el control positivo con *B. tropica* MTO-293, obteniendo en todos los casos la banda de amplificación correspondiente. Por lo tanto, no se pudo identificar a *B. tropica* como uno de los microorganismos presentes en las muestras analizadas.

Si bien es difícil comparar ambos sistemas debido a la complejidad del crecimiento en condiciones a campo, es necesario tener en cuenta que los valores de poblaciones en tierra no estéril presentados en el Capítulo 4 fueron obtenidos a los 7 días PI, mientras que los recuentos de los ensayos a campo fueron realizados al finalizar los cultivos, es decir, aproximadamente entre los 4 y 5 meses PI. La respuesta a campo observada en trigo inoculado, puede ser debida probablemente a la acción de *B. tropica* en estadios tempranos del cultivo cuando su concentración pudo ser mayor, al igual que lo reportado para otros microorganismos como *Azospirillum* sp. (Cassán y Diaz-Zorita, 2016).

En este trabajo, se realizó la búsqueda del microorganismo inoculado utilizando metodologías dependientes de cultivo seguidas de técnicas de biología molecular para su identificación, pero será necesario la puesta a punto de metodologías independientes de cultivo, mediante la extracción de ADN a partir de los ambientes/tejidos a analizar, para lograr identificar a los microorganismos de una manera más directa y más sensible, considerando también que pueden estar viables pero haberse tornado no cultivables, y con un diseño que contemple la toma de muestras en distintos estadios del cultivo.

5.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se han descrito aspectos eminentemente prácticos sobre la supervivencia de *B. tropica* MTo-293 en diferentes formulados envasados y sobre las semillas luego de ser inoculadas, la compatibilidad con fungicidas y la eficiencia de colonización de raíces de plantas de trigo y sorgo post-inoculación de las semillas, necesarios para considerar su uso como PGPB para el mejoramiento de la productividad de cultivos de trigo y sorgo. Los resultados obtenidos evidencian que:

1. Es posible formular un inoculante a base de *B. tropica* MTo-293 que mantenga la viabilidad bacteriana por períodos relativamente prolongados de tiempo, sin perder la capacidad de colonizar eficientemente raíces de trigo. Sería necesario continuar ensayando formulaciones que mejoren esta *performance*.
2. *B. tropica* MTo-293 aplicada sobre semillas de ambas gramíneas a razón de 1.10^6 UFC/semilla almacenadas a 20-25°C permanece viable por 48 hs y fue capaz de colonizar eficientemente el rizoplasma (evaluado en condiciones de cultivo controladas) y presentó variabilidad en la colonización de los tejidos internos.
3. *B. tropica* MTo-293 es compatible con un fungicida de amplio uso en los cultivos ensayados, que fue mejor tolerado en presencia del protector en el caso del trigo. La adición del protector también contribuyó al incremento de la supervivencia bacteriana sobre las semillas de trigo sin fungicida.
4. Se pudo observar un efecto promotor de crecimiento vegetal que trajo aparejado una mejora consistente en el rendimiento en un cultivo de gran interés agronómico como es el trigo. Este resultado también pone en evidencia que en condiciones donde la bacteria tuvo que enfrentarse a un ambiente adverso, la colonización debió ser efectiva, ya que a pesar de no haber podido aislar al microorganismo en estudio de las muestras provenientes de campo, se observó el efecto promotor del crecimiento en los ensayos. Por lo tanto, la aplicación de una formulación a base de *B. tropica* MTo-293 en semillas de trigo demostró ser un enfoque factible para mejorar la productividad de este cultivo. Con respecto al sorgo, no se logró aislar el microorganismo en estudio de muestras de campo y no hubo respuesta a la inoculación. El estudio de protectores que aseguraran una mayor viabilidad del microorganismo podría mejorar dicha respuesta.

Es difícil estimar el éxito de la inoculación con PGPB ya que tal como se ha mencionado previamente, éste depende de diversos factores como la competitividad de la bacteria frente a la flora nativa, el sitio agroecológico, las condiciones ambientales, el manejo de los cultivos, entre otros. Han sido reportados diversos estudios de inoculación de trigo con PGPB, en presencia y ausencia de fertilización nitrogenada y fosforada, y las respuestas halladas fueron variables según el microorganismo utilizado tal como se detalló en el Capítulo 1. En el caso de la inoculación con *B. tropica* en trigo y sorgo, no se han reportado hasta el momento ensayos de promoción de crecimiento a campo. El análisis de los resultados del presente trabajo indica que la interacción *B.*

tropica-trigo mostró una respuesta positiva a la inoculación si bien, debido a la variabilidad y la falta de testigos adecuados en el diseño de los ensayos presentados en este trabajo, no se puede relacionar en forma directa la respuesta a la inoculación con la fertilización, y aunque los aumentos de rendimiento obtenidos puedan tener un impacto moderado en la producción es importante destacar más su estabilidad que su magnitud. Para ello, es necesario continuar con los experimentos de campo en temporadas sucesivas, más zonas de experimentación, y un diseño que permita un análisis comparativo para poder establecer una relación directa entre la inoculación y la fertilización. Podría ser relevante, la realización de nuevos ensayos con estos cultivos en zonas con mayor escasez de nutrientes, donde al igual que otras PGPB, el microorganismo en estudio pudiera expresar mejor su capacidad de promoción del crecimiento a campo. Esta última observación estaría relacionada con los análisis sobre la expresión de la ruta de oxidación de aldosas mediada por la mGDH, la solubilización de compuestos insolubles de fósforo y la provisión de energía extra para llevar a cabo la FBN, que en este trabajo se ha demostrado que se activan en condiciones de *stress* nutricional y energético.

Capítulo 6

Genes de *Burkholderia tropica* relacionados con la
rizocompetencia y la promoción del
crecimiento vegetal

Capítulo 6

Genes de *B. tropica* relacionados con la colonización y promoción del crecimiento vegetal

6.1 Genes de las PGPB involucrados con la interacción con las plantas

En capítulos anteriores del presente trabajo se han presentado y discutido resultados de ensayos enfocados en caracterizar algunos aspectos de la colonización y promoción del crecimiento de plantas de trigo y sorgo por *B. tropica* MTo-293 empleando métodos dependientes e independientes de cultivo. Como otra aproximación para elucidar las bases moleculares de estas interacciones *B. tropica*-gramíneas, es muy útil la construcción de mutantes defectivos en alguno de los aspectos que podrían estar implicados en la colonización, seguida de un análisis de la habilidad de colonización de estos mutantes en competición con la cepa salvaje. Se han reportado diversos estudios empleando esta metodología y se han dilucidado varias características necesarias de las PGPB relacionadas con la eficiencia de colonización, tales como la formación y secreción de EPS (Böhm *et al.*, 2006; Buschart *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2010), la expresión de un sistema de QS (Ishida *et al.*, 2010), la formación de *biofilm* (Meneses *et al.*, 2011), la presencia de flagelos (Angus *et al.*, 2014), producción de hormonas como el ácido indolacético (Zúñiga *et al.*, 2013), entre otras. La construcción de mutantes es una herramienta que también se utiliza para determinar cuál es el posible mecanismo de promoción del crecimiento vegetal que los microorganismos pueden estar expresando *in vivo*. Existen diversas estrategias para la construcción de estos mutantes que dependen de la información disponible del microorganismo en estudio. Cuando no se cuenta con la secuencia del gen que se desea estudiar, puede realizarse una mutación al azar mediante la utilización de transposones (Boucher *et al.*, 1985) seguida de un *screening* para seleccionar los mutantes obtenidos. Otra forma de obtener un mutante es realizando el alineamiento de secuencias del gen de interés de especies filogenéticamente relacionadas con el microorganismo en estudio mediante el uso de herramientas bioinformáticas (Chenna *et al.*, 2003). Luego de ello, se diseñan cebadores que permitan la amplificación de una región del gen que se pretende mutar y ese amplicón se inserta en un plásmido con resistencia a algún antibiótico y se realiza el bloqueo del gen en el microorganismo en estudio, proceso llamado inactivación génica o *knock out* génico, y los mutantes se seleccionan por su crecimiento en presencia del antibiótico. El éxito de esta metodología depende de la similitud entre los genes que se utilizan para el diseño de los cebadores y el gen del microorganismo en estudio, ya que la variabilidad de las secuencias puede hacer que los cebadores diseñados no se apareen en la región de interés. Si se dispone de la información del genoma del microorganismo, esta estrategia de mutación es mucho más específica ya que el diseño de los cebadores se hace en base a la secuencia exacta del gen que se

pretende mutar. Para realizar este tipo de estudios, es necesario en principio seleccionar el o los genes que se pretenden silenciar. Como se describió previamente, las PGPB presentan ciertas características que las hacen rizocompetentes y colonizadoras eficientes de los tejidos internos en el caso de las PGPB endófitas, a través de la modulación de la expresión de diversos genes que han sido estudiados en varios de estos microorganismos (Glick, 2012; Hardoim *et al.*, 2008; Hardoim *et al.*, 2015; Lugtenberg y Kamilova, 2009). En la Tabla 6.1 se muestran algunos de estos genes relacionados con la rizocompetencia y la promoción del crecimiento vegetal.

Característica	Función	Genes
Rizocompetencia	Motilidad y quimiotaxis	<i>mcp, che, mot, fli</i>
	Regulador global	<i>yhbH, hfq, miaA</i>
	Adaptación nutricional	<i>pca, pta</i>
	Adaptación al stress	<i>bcp</i>
	Quorum sensing	<i>lasI, lasR</i>
	Formación de EPS y <i>biofilm</i>	<i>bce, eps, wsp</i>
	Enzimas líticas	<i>eglA</i>
	Enzimas degradadoras de AHLs	<i>aiiC</i>
	Enzimas degradadoras de DSF	<i>carAB</i>
	Metabolitos fungicidas	<i>prnD</i>
	Pili tipo IV	<i>pilS, pilR</i>
Promoción del crecimiento vegetal	Modulación de etileno	<i>acdS, rtxC</i>
	Resistencia Sistémica Inducida	<i>srfA, operón pps</i>
	Producción de fitohormonas	<i>ipdC, nit, nthAB</i>
	Producción de HCN	<i>hcnABC</i>
	Producción de acetoína y 2,3-butanediol	<i>budABC</i>
	Síntesis de óxido nítrico	<i>nirK</i>
	FBN	<i>nif</i>
	Solubilización de fosfatos	<i>gdh, gcd</i>
	Producción de sideróforos	<i>fhu, fcu</i>

Tabla 6.1 Genes involucrados en la rizocompetencia y la promoción del crecimiento vegetal. Adaptado de Hardoim *et al.*, 2008, Hardoim *et al.*, 2015 y Bruto *et al.*, 2014.

Habiendo tenido la posibilidad de secuenciar el genoma del microorganismo en estudio, se realizó la búsqueda de genes que pudieran estar implicados con algunas de las características relacionadas con el proceso de colonización y con la promoción del crecimiento vegetal. Estos genes hallados tendrán en principio un carácter putativo, ya que su función será dada por la similitud con genes reportados para otros microorganismos pero no por la evaluación directa de la misma.

6.2 Secuenciación, ensamble y anotación del genoma de *B. tropica* MTo-293

Se realizó la extracción del ADN de *B. tropica* MTo-293 mediante el kit *Accuprep Genomic DNA*, según especificaciones del fabricante. El análisis del ADN y su posterior ensamble y anotación fueron realizados en colaboración con el Dr. Mariano Pistorio y el Dr. Gonzalo Torres-Tejerizo (Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, IBBM-CONICET-UNLP). El ADN total se analizó mediante el uso de un secuenciador *MySeq Illumina* en la Universidad de Aarhus, Dinamarca (*Department of Environmental Science – Environmental microbiology and biotechnology*). Se realizó una biblioteca utilizando el kit *Nextera DNA Library Prep Kit* (Illumina Inc). El tamaño de los insertos en dicha biblioteca fue de 520 ± 191 bases. El resultado de la secuenciación fueron 477419 lecturas, completando un total de 95604658 bases secuenciadas. Las lecturas obtenidas a partir de la secuenciación fueron ensambladas y anotadas. El ensamble se realizó mediante el programa *GS de novo Assembler software* (*gsAssembler*, versión 2.8, Roche) y generó 2064 *contigs* mayores a 500 pb. De los mencionados *contigs*, 1643 fueron ordenados en 1070 *scaffolds* (Figura 6.1). El genoma estimado fue de gran tamaño, aproximadamente 7,9 Mb, tal como ha sido reportado para las especies del género *Burkholderia* (Martinez-Aguilar *et al.*, 2008) y de acuerdo a esta estimación la cobertura obtenida fue de 12X. En general, el tamaño del genoma se correlaciona con el número de posibles estilos de vida de un microorganismo, de tal forma que cuanto mayor es el número de genes que posee, mayor es la capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales, como por ejemplo, diferentes especies vegetales (Mitter *et al.*, 2013). El genoma presenta un contenido GC de 64,81%. La anotación del genoma, es decir la predicción de los genes que se encuentran en el mismo, se realizó con el programa *Prokka* (*Prokaryotic Genome Annotation System*, <http://vicbioinformatics.com/>), que predijo 7761 CDS (del inglés *coding DNA sequence*, o secuencias de ADN codificantes), 48 ARNt y 3 ARNr.

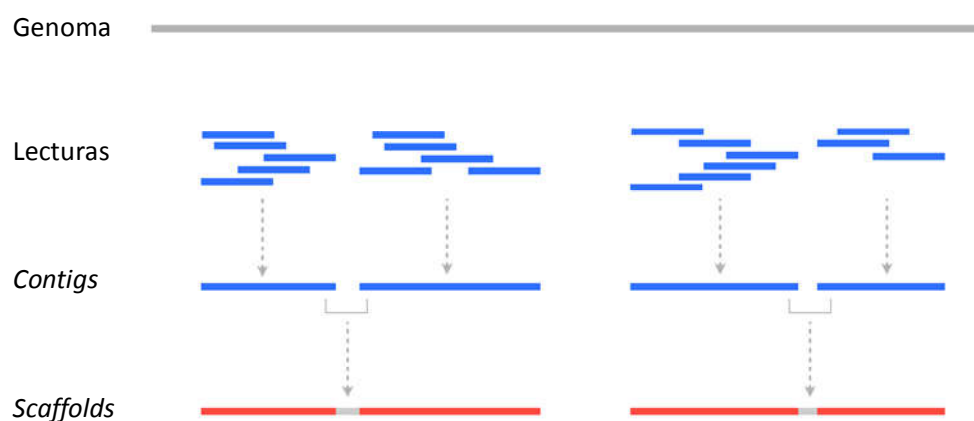


Figura 6.1 Ordenamiento de las lecturas en *contigs* y *scaffolds*.

6.3 Búsqueda de genes en el genoma de *B. tropica* MTo-293

Se realizó una búsqueda bibliográfica de algunos genes relacionados con rizocompetencia y la promoción de crecimiento vegetal que han sido reportados para diferentes PGPB, además de los genes relacionados con la virulencia de las especies patógenas del género *Burkholderia*. La búsqueda de estos genes en el genoma de *B. tropica* MTo-293 se realizó de dos formas, según la información disponible de cada gen: 1- mediante la información obtenida a partir de la anotación del genoma, que predijo la cantidad y la identidad de los genes putativos presentes o 2- alineando la secuencia del gen de interés buscada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) con el genoma de *B. tropica* MTo-293, por BLAST (de las siglas en inglés de *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), determinando así su presencia o ausencia. Cuando se encontraron los genes, se obtuvo la secuencia de cada uno mediante la utilización del programa Unipro UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012), que se utilizó posteriormente para realizar una nueva búsqueda contra todas las secuencias de la base de datos, con el fin de encontrar el gen que presentara mayor similitud con el presente en el genoma de *B. tropica* MTo-293, e identificar a qué microorganismo pertenece (*Best hit*) y con qué porcentaje de identidad, considerando valores mayores al 70%.

El gen que codifica para el ARNr 16S es ampliamente utilizado para la identificación de grupos taxonómicos de organismos, relaciones entre especies e identificación de las mismas. Debido a esto, antes de iniciar la búsqueda de los genes relacionados con la rizocompetencia y la promoción del crecimiento, se analizó este gen. El gen ARNr 16S de *B. tropica* MTo-293 presentó una longitud de 1521 pb. Su secuencia se observa en la Figura 6.2. Al comparar esta secuencia con la que está registrada en la base de datos, se confirmó la identidad de *B. tropica* MTo-293.

```

AGGTGATCCAGCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATGAA
TCCTGCCGTGGTGACCGTCTCTTGC GGTTAGACTAGCCACTTCTGGCAAACCCACTCC
CATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCC
GCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGAT
CGTTTTCTGGGATTGGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTTCCGACCATTTGATG
ACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCACCTTCTCCGG
TTTGTACCGGCAGTCTCCCTGGAGTGCTTTCGCTAGCAACTAGGGACAAGGGTTGCGCT
CGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT
GTTACGGCTCCCTTTCGGGCACTTCCACCTCTCAGCGAATTCCGTACATGTCAAGGGTAG
GTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCG
TCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCAATTCACGCGTTA
GCTACGTTACCAAGTCAATGAAGACCCGACAACCAAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGACCCA
GGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGG
AATTACCCCCCTCGCCATACTCAAGCGATGCAGTCAACATGCAGTTCCCAGGTTGAG
CCCGGGGATTTACATCGGTCTTACATCACCGCTGCGCACGCTTTACGCCCAAGTAATTC
GATTAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTGTCTAT
TCTTCCGGTACCGTCATCCCCCGGCATATTAGGACCAAGGATTTCTTCCGGACAAAAGT
GCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCAACACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCAT
TGTCAAAATTCCTTCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGT
GGCTGGTGTCTCTCAGACCAAGTACGGATCGTGCCTTGGTGAAGCTTTACCTCACCAA
CTAGCTAATCCGCCATCGGCCGCCCTATAGCGCGAGGTCGAAGATCCCCGCTTTCATC
CGTAGATCGTATGCGGTATTAATCCGGCTTTCGCCGGGCTATCCCCCACTACAGGACAGT
TCCGATGTATTACTCACCGTTTCGCCACTGCCACCAAGGTGCAAGCACCGTGTGCGGTT
CGACTTGCATGTGAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTCT
    
```

Figura 6.2 Secuencia del gen ARNr 16S de *B. tropica* MTo-293.

6.4 Genes relacionados con la rizocompetencia de *B. tropica* MTo-293

Para que una PGPB pueda ejercer sus efectos promotores del crecimiento vegetal, es necesario que tenga la capacidad de colonizar el rizoplano de forma eficiente para luego también poder ingresar al interior de los tejidos si presenta un carácter endofítico en las plantas que coloniza. Como se describió previamente en este trabajo, existen diversas características que les confieren a los microorganismos ventajas competitivas que los hacen más rizocompetentes. Para una eficiente colonización del rizoplano, el primer paso es el acercamiento de la bacteria a las raíces. Para que esto ocurra, es necesaria la presencia de flagelos y la respuesta quimiotáctica a los exudados de las raíces, favoreciendo así la colonización radical (Hardoim *et al.*, 2008). Una vez establecida esta respuesta, la capacidad de utilizar los nutrientes presentes en este ambiente tan complejo y de crecer rápidamente aumentan la competitividad de los microorganismos. Como ha sido mencionado anteriormente, el fenómeno de QS y la formación de *biofilm* se encuentran también relacionados directamente con la rizocompetencia.

6.4.1 Genes de quimiotaxis y motilidad

La quimiotaxis hacia los exudados radicales ha sido reportada para varias PGPB (Compant *et al.*, 2005a; Oku *et al.*, 2012; Pedraza *et al.*, 2010), y se ha identificado que algunos de los genes relacionados con este proceso son los genes *che* y *mcp* (Hardoim *et al.*, 2008). Han sido encontrados 11 genes putativos *che* y 2 genes *mcp* en el genoma de *B. tropica* MTo-293, tal como se detallan en la Tabla 6.2.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>cheA-1</i>	2355	Proteína de quimiotaxis CheA	<i>B. metallica</i> FL-6-5-30-S1-D7	78
<i>cheA-2</i>	1086	Proteína de quimiotaxis CheA	<i>B. phymatum</i> STM815	90
<i>cheB</i>	1119	Regulador de respuesta a quimiotaxis	<i>B. stagnalis</i> MSMB735WGS	87
<i>cheC</i>	624	CheY-P fosfatasa CheC	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	80
<i>cheD</i>	804	Quimiorreceptor glutamina deamidasa CheD	<i>B. caribensis</i> MBA4	86
<i>cheR-</i>	1023	Proteína de quimiotaxis metiltransferasa	<i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2	85
<i>cheV</i>	954	Proteína de quimiotaxis CheV	<i>B. glumae</i> LMG 2196	85
<i>cheW</i>	540	Proteína de quimiotaxis CheW	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	92
<i>cheY-1</i>	366	Proteína de quimiotaxis	<i>B. glumae</i> PG1	89

		CheY		
<i>cheY-3</i>	396	Proteína de quimiotaxis CheY	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	92
<i>mcpB</i>	1662	Proteína de quimiotaxis McpB	<i>B. stagnalis</i> MSMB735WGS	81
<i>mcp2</i>	771	Proteína de quimiotaxis	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	90

Tabla 6.2 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la quimiotaxis, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

La presencia de flagelos polares en *B. tropica* ha sido observada mediante técnicas microscópicas (Reis *et al.*, 2004), pero aún no se ha profundizado sobre el tipo de motilidad que presenta este microorganismo. Ha sido reportado que en la formación de flagelos de algunas PGPB están implicados una gran cantidad de genes denominados *fli*, *flg* y *flh* (Sourjik *et al.*, 1998), que se encuentran relacionados a la síntesis y el ensamblaje de los flagelos (Klausen *et al.*, 2003; Pratt y Kolter, 1998; O’Toole y Kolter, 1998). En el genoma de *B. tropica* MTo-293 se encontraron 16 genes *fli*, 24 genes *flg* y 7 genes *fli* (Tabla 6.3).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>fliA</i>	732	Factor sigma FliA	<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929	88
<i>fliC</i>	1230	Flagelina tipo A	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	89
<i>fliD</i>	708	Proteína flagelar (asociada al <i>hook</i>)	<i>B. multivorans</i> MSMB1640WGS	77
<i>fliE</i>	336	Proteína flagelar del complejo <i>hook</i> -cuerpo basal FliE	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	85
<i>fliF</i>	786	Proteína flagelar M-ring	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	81
<i>fliG</i>	996	Proteína flagelar de <i>motor switch</i> FliG	<i>B. seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	89
<i>fliI</i>	1716	ATP-sintasa específica de flagelos	<i>B. caribensis</i> MBA4	89
<i>fliJ</i>	459	Proteína flagelar FliJ	<i>B. caribensis</i> MWAP64	82
<i>fliL</i>	501	Proteína flagelar FliL	<i>B. xenovorans</i> LB400	77
<i>fliM</i>	1008	Proteína flagelar de <i>motor switch</i> FliM	<i>Paraburkholderia caribensis</i> Bcrs1W	90
<i>fliN</i>	471	Proteína flagelar de <i>motor switch</i> FliN	<i>B. glumae</i> LMG 2196	89
<i>fliO</i>	612	Proteína flagelar FliO	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	86
<i>fliP-1</i>	651	Precursor de proteína de biosíntesis de flagelo FliP	<i>B. glumae</i> LMG 2196	88
<i>fliP-2</i>	855	Precursor de proteína de biosíntesis de flagelo FliP	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	90

<i>fliQ</i>	264	Proteína de biosíntesis de flagelo FliQ	<i>B. oklahomensis</i> 1974002358	82
<i>fliR</i>	792	Proteína de biosíntesis de flagelo FliR	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	77
<i>flgB</i>	504	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgB	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	81
<i>flgC</i>	426	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgC	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	87
<i>flgD</i>	723	Proteína de modificación del cuerpo basal FlgD	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	75
<i>flgE</i>	1236	Proteína flagelar del <i>hook</i> FlgE	<i>B. ubonensis</i> MSMB2035	80
<i>flgF</i>	759	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgF	<i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0	82
<i>flgG</i>	789	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgG	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	86
<i>flgH-1</i>	714	Proteína flagelar de L-ring	<i>B. ubonensis</i> MSMB22	82
<i>flgH-2</i>	726	Proteína flagelar de L-ring	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	78
<i>flgI</i>	1200	Proteína flagelar de L-ring	<i>Burkholderia mallei</i> Bahrain1	84
<i>flgJ</i>	1017	Hidrolasa FlgJ	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	79
<i>flgK</i>	1998	Proteína flagelar asociada al <i>hook</i>	<i>B. seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	74
<i>flgL</i>	1242	Proteína flagelar asociada al <i>hook</i>	<i>B. seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	72
<i>flgB</i>	504	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgB	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	81
<i>flgC</i>	426	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgC	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	87
<i>flgD</i>	723	Proteína de modificación del cuerpo basal FlgD	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	75
<i>flgE</i>	1236	Proteína flagelar del <i>hook</i> FlgE	<i>B. ubonensis</i> MSMB2035	80
<i>flgF</i>	759	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgF	<i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0	82
<i>flgG</i>	789	Proteína flagelar del cuerpo basal FlgG	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	86
<i>flgH-1</i>	714	Proteína flagelar de L-ring	<i>B. ubonensis</i> MSMB22	82
<i>flgH-2</i>	726	Proteína flagelar de L-ring	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	78
<i>flgI</i>	1200	Proteína flagelar de L-ring	<i>Burkholderia mallei</i> Bahrain1	84
<i>flgJ</i>	1017	Hidrolasa FlgJ	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	79
<i>flgK</i>	1998	Proteína flagelar asociada al <i>hook</i>	<i>B. seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	74
<i>flgL</i>	1242	Proteína flagelar asociada al <i>hook</i>	<i>B. seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	72
<i>flhA</i>	2100	Proteína de biosíntesis de flagelos FlhA	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	86
<i>flhB</i>	1287	Proteína de biosíntesis de	<i>B. ubonensis</i> MSMB22	82

		flagelos FlhB		
<i>flhC-1</i>	600	Regulador transcripcional flagelar FlhC	<i>B. caribensis</i> MWAP64	87
<i>flhC-3</i>	624	Regulador transcripcional flagelar FlhC	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	83
<i>flhC-4</i>	747	Regulador transcripcional flagelar FlhC	<i>B. phymatum</i> STM815	82
<i>flhD-1</i>	321	Regulador transcripcional flagelar FlhD	<i>Paraburkholderia</i> sp. SOS3	82
<i>flhD-3</i>	318	Regulador transcripcional flagelar FlhD	<i>Paraburkholderia</i> sp. SOS3	81

Tabla 6.3 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la síntesis y ensamblaje de flagelos, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.4.2 Genes relacionados con la persistencia en la rizosfera y el rizoplano

Como fue mencionado anteriormente, existen procesos relacionados con la rizocompetencia que implican la regulación global y la adaptación nutricional al ambiente y al *stress*. Rediers y colaboradores (2003) estudiaron los genes que normalmente se activan cuando *Pseudomonas stutzeri* coloniza plantas de arroz. Los resultados indicaron que dos genes de regulación global *hfq* y *miaA* están directamente relacionados con la colonización. El gen *hfq* codifica para una proteína de unión al ARN relacionada con la estabilidad del ARNm en respuesta al *stress* ambiental y a cambios en la concentración de metabolitos del ambiente (Wilson *et al.*, 2007). Por otro lado, el gen *miaA* codifica para una isopentenilpirofosfato transferasa que cataliza la modificación de algunos ARNt. La mutación de este gen ha tenido efectos negativos en el crecimiento celular y en el proceso de traducción, debido a que esta directamente relacionada con la expresión del factor de respuesta a *stress* RpoS (Thompson y Gottesman, 2014). Por otro lado, Rediers y colaboradores (2003) también reportaron la expresión del gen *pta* durante el proceso de colonización de *P. stutzeri*. Este gen codifica para una proteína que cataliza la conversión de acetilfosfato en acetil coenzima A, y esta involucrado en la adaptación nutricional del microorganismo (Hardoim *et al.*, 2008). Se encontró que el gen *bcp*, relacionado con la respuesta al *stress* oxidativo (Flores-Cruz y Allen, 2009) también se expresó durante el proceso de colonización (Rediers *et al.*, 2003). Ha sido reportado que el gen *yhbH* codifica para el factor σ^{54} involucrado en la regulación génica frente a la disponibilidad de nutrientes, y estaría también relacionado con la transición entre el crecimiento planctónico y la formación de *biofilm* (Oosthuizen *et al.*, 2002; Rediers *et al.*, 2003). Se han encontrado ocho genes putativos en el genoma de *B. tropica* MTo-293 relacionados con estos procesos (Tabla 6.4).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>hfq-1</i>	495	Regulador global	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	93
<i>hfq-2</i>	237	Regulador global	<i>B. oklahomensis</i> 1974002358	92
<i>miaA</i>	975	Regulador global	<i>B. ambifaria</i> MC40-6	84
<i>pta</i>	942	Adaptación nutricional	<i>Cupriavidus nantongensis</i> X1	91
<i>bcp-1</i>	633	Respuesta al stress	<i>B. phymatum</i> STM815	91
<i>bcp-2</i>	564	Respuesta al stress	<i>B. xenovorans</i> LB400	85
<i>bcp-3</i>	318	Respuesta al stress	<i>B. glumae</i> PG1	87
<i>yhbH</i>	1269	Respuesta al stress	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	87

Tabla 6.4 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la persistencia en la rizosfera y el rizoplano, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.4.3 Genes relacionados al Quorum Sensing

El proceso de QS o sistema de autoinducción involucra la expresión diferencial de ciertos genes en función de la densidad de la población de un cultivo de microorganismos y de determinadas características ambientales. Las bacterias que tienen la capacidad de utilizar este mecanismo pueden producir y secretar autoinductores, que son moléculas señal que utilizan para comunicarse con otras células, mientras actúan en comunidad (Liu *et al.*, 2007; Miller y Bassler, 2001). En las bacterias Gram negativas, como la estudiada en este trabajo, las moléculas señal secretadas son normalmente AHLs (De Maeyer *et al.*, 2011; Fuqua *et al.*, 2001). Existen distintos tipos de mecanismos de QS, que varían en cada género y especie. Algunos de estos mecanismos son más sencillos, e implican la presencia de sistemas homólogos al sistema *luxI/luxR* hallado en *Vibrio fischeri* para la generación de bioluminiscencia (Fuqua *et al.*, 2001; Miller y Bassler, 2001). Este sistema implica la expresión del gen *luxI*, productor de la AHL, y de *luxR*, regulador transcripcional del sistema. Al aumentar la densidad celular, la expresión de AHL alcanza un valor umbral necesario para la expresión del regulador, que activa la expresión de los genes que regula. Otros microorganismos, en cambio, presentan una regulación de la expresión génica más compleja, que implica más de un sistema de QS. Un ejemplo es *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta dos sistemas: *lasI/lasR* y *rhlI/rhIR* (Smith e Iglewski, 2003; Miller y Bassler, 2001; Schuster *et al.*, 2002). Estos sistemas regulan genes necesarios para la colonización del hospedador, como por ejemplo la formación de *biofilm*. El regulador transcripcional *LasR* activa genes relacionados con la expresión de enzimas líticas y la formación de *biofilm*. La activación del sistema *LasI/LasR* genera en *P. aeruginosa* la posterior activación del sistema *RhlI/RhIR*. Se encontró que *B. tropica* MTo-293 presentó genes de la familia *lasI/lasR*. Se trata de reguladores transcripcionales que tienen la capacidad de regular la síntesis de AHL involucradas en dicho fenómeno, mediante la expresión del gen *lasI*, que codifica para una AHL-sintasa. Dicho gen

tiene 426 pb, y un 80% de identidad con un gen similar presente en *B. unamae* MTI-641T. La proteína que codifica pesa 131909.67 Da. Se encontraron también dos sitios de regulación transcripcional del gen *lasI*. No se encontraron genes de QS similares a los otros sistemas descritos anteriormente.

6.4.4 Genes relacionados con la producción de EPS y la formación de biofilm

Ferreira y colaboradores (2010) han reportado genes implicados en la formación y secreción de EPS así como su distribución en el genoma de especies patógenas y benéficas del género *Burkholderia*. Mediante el análisis de los genomas de cuatro especies benéficas, *B. xenovorans*, *B. phymatum*, *B. phytofirmans* y *B. graminis* se logró conocer la disposición de los genes implicados en la secreción de EPS y su distribución en el genoma (Ferreira *et al.*, 2010). Los genes descritos en este trabajo fueron denominados *bce* y están relacionados con los distintos pasos de la síntesis de EPS y las proteínas necesarias para secretarlo (Ferreira *et al.*, 2011). Los genes putativos de formación de EPS presentes en *B. tropica* MTo-293 hallados se detallan en la Tabla 6.5.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>bceA</i>	1212	GDP-D-manosa pirofosforilasa	<i>B. caribensis</i> MWAP64	84
<i>bceC</i>	1419	UDP Glucosa 6-deshidrogenasa	<i>B. ubonensis</i> MSMB0783	84
<i>bceF</i>	2229	Tirosina kinasa wzc	<i>B. phymatum</i> STM815	79
<i>bceG</i>	945	N-glicosil transferasa	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	79
<i>bceI</i>	1566	Proteína transmembrana	<i>B. phymatum</i> STM815	83
<i>bceJ</i>	1224	D-inositol 3-fosfato glicosiltransferasa	<i>B. caribensis</i> MBA4	82
<i>bceK</i>	1161	Manosilfructosa-fosfato sintasa	<i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2	81
<i>bceM</i>	957	GDP-6-desoxi-D-talosa 4-deshidrogenasa	<i>B. thailandensis</i> 2002721643	76
<i>bceN</i>	1044	GDP-manosa 4,6-dehidratasa	<i>B. caribensis</i> Bcrs1W	84
<i>bceQ</i>	960	Proteína de biosíntesis de EPS	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	79
<i>bceR</i>	2499	Glicosiltransferasa	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	78
<i>bceS</i>	1161	Aciltransferasa	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	77
<i>bceT</i>	525	UTP--glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	<i>Burkholderia</i> sp. RPE64	84
<i>bceU</i>	1140	Acetiltransferasa	<i>B. caribensis</i> MWAP64	74

Tabla 6.5 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la formación y secreción de EPS, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

Por otro lado, otros genes implicados en la biosíntesis y secreción de EPS fueron encontrados en el genoma de *B. tropica* MTo-293. Ha sido reportado que los genes *eps* están involucrados en la capacidad de formación de *biofilm* de *Bacillus subtilis*, particularmente en la producción y secreción de EPS (Nagorska *et al.*, 2010). En el genoma de *B. tropica* MTo-293, han sido encontrados los genes putativos *eps* que se detallan en la Tabla 6.6.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>epsE-2</i>	1497	Proteína del sistema de secreción tipo II	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	87
<i>epsE-3</i>	1326	Proteína del sistema de secreción tipo II	<i>B. xenovorans</i> LB400	79
<i>epsF-1</i>	1218	Proteína del sistema de secreción tipo II	<i>B. caribensis</i> Bcrs1W	87
<i>epsF-2</i>	1221	Proteína del sistema de secreción tipo II	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	79
<i>epsH</i>	750	Glicosiltransferasa	<i>B. glumae</i> LMG 2196	78
<i>epsM</i>	531	Proteína del sistema de secreción tipo II	<i>B. thailandensis</i> 2002721643	78

Tabla 6.6 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la formación y secreción de EPS, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

Ha sido reportado que los genes *wsp* modulan la formación de *biofilm* mediante la regulación de los niveles de diguanilato cíclico (di-GMP-cíclico) (Hickman *et al.*, 2005). También ha sido reportado que los genes *bdIA* y *bdcA* son un reguladores de la dispersión del *biofilm* en *Pseudomonas aeruginosa* y *Rhizobium meliloti* (Ma *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2006). Los genes encontrados en el genoma de *B. tropica* MTo-293 se muestran en la Tabla 6.7.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>wspC</i>	747	Metiltransferasa	<i>B. oklahomensis</i> 1974002358	73
<i>bdIA</i>	1698	Proteína de dispersión de <i>biofilm</i>	<i>Dyella japonica</i> A8	78
<i>bdcA</i>	714	Proteína mediadora de dispersión de <i>biofilm</i> de unión a di-GMP-cíclico	<i>B. glumae</i> PG1	80

Tabla 6.7 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la formación de *biofilm*, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

En el transcurso de este trabajo, previamente al conocimiento de la secuencia del genoma de *B. tropica* MTo-293, se intentó construir un mutante deficiente en la producción de EPS a través de la

estrategia de mutación dirigida seleccionando al gen *bceR* por ser determinante en la formación de EPS (Ferreira *et al.*, 2010). Al no contar con la secuencia de este gen en *B. tropica* MTo-293, se realizaron alineamientos comparativos de este gen con varias *Burkholderia* spp. benéficas, se seleccionaron regiones conservadas dentro del mismo, se diseñaron cebadores que permitieran amplificar esa región para luego introducirla en un plásmido suicida, y posteriormente generar un *knock out* génico. El diseño de los cebadores, la estrategia de mutación y la metodología utilizada se detallan en el Anexo 6. A pesar de haber diseñado los cebadores en base al alineamiento del gen *bceR* de diversas especies del género *Burkholderia* benéficas y también de *B. vietnamiensis*, no se logró amplificar la región de interés con los cebadores diseñados. Después de conocer la secuencia del genoma de *B. tropica* MTo-293 y la secuencia exacta del gen *bceR*, se pudo confirmar que los cebadores diseñados no hibridaron con la región que se deseaba amplificar.

6.4.5 Genes involucrados en la adhesión a semillas

Han sido descritos varios genes presentes en bacterias colonizadoras de tejidos vegetales necesarios para la adhesión de las mismas a la semilla (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Estos genes tienen distintas funciones, como la expresión de lipopolisacáridos, proteínas de adhesión de membrana y de bombas de flujo, o incluso en el transporte de péptidos. Han sido encontrados varios genes reportados para estas funciones en el genoma de *B. tropica* MTo-293, que se detallan en la Tabla 6.8.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>cstA</i>	528	Proteína A de inanición de carbono	<i>B. stabilis</i> ATCC BAA-67	86
<i>kefC</i>	2016	Proteína KefC de sistema de flujo de potasio regulada por glutatión	<i>B. caribensis</i> MBA4	86
<i>kefF</i>	672	Proteína KefF de sistema de flujo de potasio regulada por glutatión	<i>B. cenocepacia</i> DDS 22E-1	81

Tabla 6.8 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la adhesión a semillas, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.4.6 Genes de enzimas líticas de la pared celular vegetal: pectinasas

Algunas bacterias endófitas poseen la capacidad de sintetizar enzimas líticas de la pared celular vegetal, que utilizan para ingresar activamente a los tejidos internos de las plantas. Las enzimas más estudiadas para este proceso son las pectinasas y las celulasas (Compant *et al.*, 2010; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006). En el Capítulo 2 de este trabajo, ha sido demostrado que *B. tropica* presentó actividad

pectinasa, aunque los ensayos realizados no permitieron determinar a qué tipo de pectinasa corresponde. Las pectinasas pueden clasificarse en tres grandes grupos según el sustrato y la forma en que lo degradan: protopectinasas, esterases y enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) (Alkorta *et al.*, 1998; Jayani *et al.*, 2005; Kashyap *et al.*, 2001). Ha sido reportado que en los microorganismos que presentan este tipo de enzimas, la expresión de la misma es altamente regulada, y que los genes implicados en la degradación de las sustancias pécticas solo son activados en su presencia. El gen *kdgR* ha sido previamente reportado como el responsable del metabolismo de la pectina en *Erwinia chrysanthemi* (Nasser *et al.*, 1997), y es el regulador negativo de este sistema. En presencia de pectina, este regulador permite la traducción de los genes implicados en su metabolismo. En el genoma de *B. tropica* MTo-293, se encontró un gen putativo de una enzima poligalacturonasa, implicada en la degradación de las sustancias pécticas. Además, fueron hallados 5 genes putativos reguladores *kdgR*. Con respecto a los genes involucrados en la degradación de la pectina, se hallaron 3 genes *kdgT*, 4 genes *kdgK* y 3 genes *kduD*. Estos genes están involucrados en el metabolismo de la pectina, siendo necesaria previamente su degradación, para que al ingresar los monómeros sean metabolizados en el citoplasma de la bacteria. Los genes de regulación de la transcripción, y del metabolismo de las sustancias pécticas y sus hidrolizados se detallan en la Tabla 6.9.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>kdgR-1</i>	1077	Regulador transcripcional	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	87
<i>kdgR-2</i>	747	Regulador transcripcional	<i>Burkholderia</i> sp. RPE64	75
<i>kdgR-3</i>	1101	Regulador transcripcional	<i>B. caribensis</i> MBA4	79
<i>kdgR-5</i>	633	Regulador transcripcional	<i>B. oklahomensis</i> 1974002358	79
<i>kdgR-7</i>	840	Regulador transcripcional	<i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2	84
<i>kdgT-1</i>	1026	2-ceto-3-desoxigluconato permeasa	<i>B. plantarii</i> ATCC 43733	87
<i>kdgT-2</i>	981	2-ceto-3-desoxigluconato permeasa	<i>B. plantarii</i> ATCC 43733	86
<i>kdgT-3</i>	1017	2-ceto-3-desoxigluconato permeasa	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	87
<i>kdgK-1</i>	1005	2-dehidro-3-desoxigluconokinasa	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	80
<i>kdgK-2</i>	948	2-dehidro-3-desoxigluconokinasa	<i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2	75
<i>kdgK-3</i>	930	2-dehidro-3-desoxigluconokinasa	<i>B. glumae</i> LMG 2196	84
<i>kdgK-4</i>	975	2-dehidro-3-	<i>B. caribensis</i> MBA4	85

		desoxigluconokinasa		
<i>kduD-1</i>	729	2-dehidro-3-desoxi-D-gluconato 5-deshidrogenasa	<i>Paraburkholderia sprentiae</i> WSM5005	80
<i>kduD-2</i>	729	2-dehidro-3-desoxi-D-gluconato 5-deshidrogenasa	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	84
<i>kduD-4</i>	768	2-dehidro-3-desoxi-D-gluconato 5-deshidrogenasa	<i>B. ubonensis</i> MSMB2035	82
<i>pgl-6</i>	2061	Poligalacturonasa	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	77

Tabla 6.9 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con el metabolismo de sustancias pécticas, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

Mediante el análisis de los genes de *B. tropica* MTo-293, pudo determinarse que este microorganismo presenta un gen putativo para una enzima poligalacturonasa. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del ácido poligalacturónico (Jayani *et al.*, 2005). Los genes putativos hallados para el metabolismo de la pectina se correlacionan con los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de este trabajo, en el cual se expuso que se encontró expresión de la actividad pectinasa sólo se en presencia de pectina ya que encontraron diversos genes involucrados en la regulación de la expresión de esta enzima, que requieren la presencia del sustrato para permitir la expresión de la misma.

Con respecto a la actividad de otras enzimas líticas, no se encontraron genes relacionados con la actividad celulasa en el genoma de *B. tropica* MTo-293, resultados que coinciden con la ausencia de actividad mostrada en el Capítulo 2.

6.4.7 Enzimas degradadoras de AHLs y DFS

Hardoim y colaboradores (2008) reportaron que la producción de enzimas degradadoras de AHL esta relacionada con la persistencia de los microorganismos en el interior de los tejidos vegetales. Muchos microorganismos que presentan el fenómeno de QS poseen también un mecanismo denominado *quorum quenching* (Cho *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002), que implica la producción de enzimas degradadoras de AHLs de otros microorganismos. Este mecanismo favorece la persistencia del microorganismo productor de las enzimas degradadoras en el nicho que ocupa, haciendo que otros microorganismos (principalmente patógenos) que utilizan el sistema de QS para la colonización del rizoplano y endofítica, no puedan reconocer sus propias AHLs, dificultando así su colonización. Se encontró un gen putativo *aiiA* de una acil-homoserina lactonasa en el genoma de *B. tropica* MTo-293.

Por otro lado, ha sido también reportado que las enzimas degradadoras de DFS (de las siglas en inglés de *Diffusible Signal Factor*, o factores de señalización difusibles) se encuentran también relacionadas con la persistencia en el interior de los tejidos vegetales (Hardoim *et al.*, 2008). Los DSF

son moléculas de ácidos grasos utilizadas como señal para la virulencia de ciertas especies de patógenos de plantas (Newman *et al.*, 2008). Por lo tanto, la capacidad de producir enzimas que degraden estas moléculas señal de virulencia disminuye la capacidad de infección de microorganismos patógenos, favoreciendo no solo la persistencia del microorganismo productor de la enzima, sino también la salud de la planta. Se encontraron en el genoma de *B. tropica* MTo-293 dos genes putativos *carA* y *carB* de enzimas degradadoras de DSF (Tabla 6.10).

Gen	Longitud (pb)	Función	Best fit	% de identidad
<i>aiiA</i>	885	N-acil-homoserina lactonasa	<i>B. seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	76
<i>carA</i>	1137	Enzima degradadora de DSF	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	89
<i>carB</i>	2583	Enzima degradadora de DSF	<i>B. xenovorans</i> LB400	91

Tabla 6.10 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la degradación de AHL y DSF, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.5 Genes relacionados con la promoción del crecimiento

6.5.1 Genes de FBN

Caballero-Mellado y colaboradores (2007) encontraron diversas especies del género *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno, entre ellas *B. tropica*, determinando su capacidad de fijar nitrógeno mediante la prueba de reducción de acetileno y la detección de los genes *nifH*, el primer gen estructural que codifica para la enzima nitrogenasa. Los genes *nif* se encuentran en todos los organismos que tienen la capacidad de fijación biológica de nitrógeno y han sido reportados diversos arreglos de dichos genes (Shamseldin, 2013). Los genes relacionados con la estructura de la enzima nitrogenasa son los genes *nifD*, *nifH* y *nifK* (Poza-Carrión *et al.*, 2014), que codifican para las unidades estructurales de dicha enzima. Estos tres genes fueron encontrados en el genoma de *B. tropica* MTo-293 ubicados adyacentemente (Tabla 6.11). El gen *nifD* codifica para la subunidad α de la enzima nitrogenasa, mientras que *nifK* codifica para la subunidad β . El *nifH* codifica para una nitrogenasa reductasa, que es una proteína que cede electrones a la nitrogenasa en el momento de su formación y es requerida para su maduración. Las características de estos tres genes y las proteínas que codifican son las siguientes:

	<i>nifD</i>	<i>nifH</i>	<i>nifK</i>
Longitud del gen (pb)	1464	882	1560
% GC	60,79	62,36	61,03
Peso de la proteína	451436,33 Da	272173,88 Da	481686,88 Da
Coefficiente de extinción molar	15074800 l/mol	9035400 l/mol	16229200 l/mol

Tabla 6.11 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la síntesis de la enzima nitrogenada y sus características.

Se encontraron además otros genes *nif*, como ha sido reportado para otras especies del género *Burkholderia* (De Meyer *et al.*, 2016). Los genes *nif* hallados en el genoma de *B. tropica* MTo-293 y sus funciones se detallan en la Tabla 6.12.

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>nifA</i>	1698	Proteína reguladora de los genes <i>nif</i>	<i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0	82
<i>nifB</i>	1590	Proteína de biosíntesis del cofactor Fe-Mo	<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929	88
<i>nifD</i>	1464	Subunidad α de nitrogenasa	<i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0	92
<i>nifH</i>	882	Nitrogenasa reductasa	<i>Burkholderia</i> sp. CACua-34	99
<i>nifK</i>	1560	Subunidad β de nitrogenasa	<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929	90
<i>nifN</i>	402	Síntesis del cofactor Fe-Mo	<i>B. vietnamiensis</i> HI2297	93
<i>nifU</i>	405	Síntesis del cluster Fe-S	<i>B. vietnamiensis</i> MSMB608WGS	92
<i>nifW</i>	339	Estabilidad de la enzima. Protección ante el O ₂	<i>B. vietnamiensis</i> HI2297	81
<i>nifX</i>	417	Cofactor de hierro-molibdeno de la dinitrogenasa	<i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0	89
<i>nifZ-1</i>	363	Desconocida	<i>B. vietnamiensis</i> MSMB608WGS	86
<i>nifZ-2</i>	279	Desconocida	<i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0	82

Tabla 6.12 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la FBN, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

Se hallaron también otros genes involucrados en la estabilidad de la enzima nitrogenasa y en la biosíntesis de los cofactores necesarios para su funcionamiento: los genes *mob* codifican para proteínas implicadas en el sistema de transporte de molibdeno, elemento esencial para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa (Maupin-Furlow *et al.*, 1995). El gen *fdxB* codifica para una

ferredoxina, que funciona como dadora de electrones a la enzima nitrogenasa (Shamseldin, 2013). Un gen *mobA* y uno de ferredoxina fueron hallados en el genoma de *B. tropica* MTo-293 (Tabla 6.13).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best fit	% de identidad
<i>mobA</i>	648	Guanililtransferasa del cofactor de molibdeno	<i>B. phymatum</i> STM815	76
<i>fdxB</i>	303	Ferredoxina	<i>B. vietnamiensis</i> MSMB608WGS	86

Tabla 6.13 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la FBN, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.5.2 Genes relacionados con la solubilización de fosfatos

En el Capítulo 3 de este trabajo, se presentaron resultados que muestran que *B. tropica* posee una enzima mGDH dependiente de PQQ, cuya actividad se encontró bajo determinadas condiciones relacionadas con la disponibilidad de N y de P. En otros microorganismos, ha sido reportado que el gen *gcd* codifica para la apoenzima de la mGDH (Yamada *et al.*, 1993). Aunque la vía biosintética del cofactor PQQ aún no se conoce completamente, hay genes involucrados en su síntesis que ya han sido clonados, secuenciados y caracterizados en varios microorganismos tales como *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Rahnella* (Choi *et al.*, 2008, Han *et al.*, 2008, Velterop *et al.*, 1995). El análisis de genes de biosíntesis de PQQ de una variedad de bacterias Gram negativas mostró que al menos los genes *pqqABCDE* son conservados y están codificados en un mismo operón, siendo variable la presencia de genes adicionales (Wagh *et al.*, 2014). *B. tropica* MTo-293 posee un gen *gcd*, que codificaría para la apoenzima de mGDH, y 5 cinco genes relacionados con la síntesis de PQQ (Tabla 6.14).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>gcd</i>	1401	Glucosa deshidrogenasa	<i>B. xenovorans</i> LB400	87
<i>pqqA</i>	171	Proteína A de síntesis del cofactor PQQ	-	-
<i>pqqB</i>	912	Proteína B de síntesis del cofactor PQQ	<i>B. plantarii</i> ATCC 43733	84
<i>pqqC</i>	747	Proteína C de síntesis del cofactor PQQ	<i>B. gladioli</i> ATCC 10248	87
<i>pqqD</i>	276	Proteína D de síntesis del cofactor PQQ	<i>B. plantarii</i> ATCC 43733	83
<i>pqqE</i>	162	Proteína E de síntesis del cofactor PQQ	-	-

Tabla 6.14 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la solubilización de fosfatos insolubles, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.5.3 Genes relacionados con la producción de auxinas

Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de algunas PGPB es la producción de fitohormonas o reguladores del crecimiento (Kurepin *et al.*, 2015). Estas hormonas pueden ser auxinas, giberelinas o citoquininas. Dentro de este grupo de hormonas, las auxinas son de gran importancia, ya que están relacionadas con el desarrollo estructural de las raíces y los brotes, el desarrollo vascular y la elongación de los tejidos (Woodward y Bartel, 2005). El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina mejor caracterizada producida por muchas PGPB (Duca *et al.*, 2014; Mohite, 2013; Spaepen *et al.*, 2007), usualmente sintetizada a partir de triptofano (Spaepen *et al.*, 2007) que se transforma en ácido indol-3 pirúvico y por acción de la enzima indol-3-piruvato decarboxilasa (codificada por el gen *ipdC/ppdC*) se obtiene AIA. También han sido descritas otras auxinas producidas por plantas y por microorganismos, como pueden ser el ácido indol 3-pirúvico, el ácido indol láctico y el ácido indol acetaldehído, entre otros (Woodward y Bartel, 2005). En el genoma de *B. tropica* MTo-293 no se encontró el gen *ipdC*, y se encontraron dos genes implicados en la síntesis de ácido indol pirúvico (Tabla 6.15).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
Mt0293__00413	1512	Indolpiruvato oxidoreductasa	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	77
Mt0293__00414	2178	Indolpiruvato ferredoxina oxidoreductasa	<i>Cupriavidus necator</i> N-1	82

Tabla 6.15 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la producción de auxinas, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.5.4 Genes relacionados con la captación de hierro

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular con una alta afinidad por el hierro que son producidos por PGPB, y su función es la captación del mismo. Además, los microorganismos poseen receptores para el complejo Fe-sideróforo y sistemas de transporte específicos para la excreción de sideróforos y la incorporación del complejo (Mitter *et al.*, 2013). Se han encontrado en el genoma de *B. tropica* MTo-293 genes *fhuA* de síntesis de ferricromo (un tipo de sideróforo que tiene como grupo químico al hidroxamato), y genes *fcuA*, de receptores de ferricromo. Además, se encontraron genes *tonB*, que sintetizan una proteína de membrana citoplasmática necesaria que interacciona con los receptores de ferricromo, facilitando el transporte de los sideróforos (Pawelek *et al.*, 2006) (Tabla 6.16).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>fhuA-1</i>	1386	Precursor de ferricromo	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	77
<i>fhuA-2</i>	2226	Precursor de ferricromo	<i>Burkholderia</i> sp. BDU6	78
<i>fhuA-4</i>	981	Precursor de ferricromo	<i>B. phenoliruptrix</i> BR3459a	77
<i>fhuA-7</i>	2409	Precursor de ferricromo	<i>Burkholderia</i> sp. RPE67	76
<i>fhuA-9</i>	1137	Precursor de ferricromo	<i>B. glumae</i> PG1	79
<i>fcuA-1</i>	2169	Receptor de ferricromo	<i>B. ubonensis</i> MSMB1471WGS	83
<i>fcuA-2</i>	1482	Receptor de ferricromo	<i>B. gladioli</i> BSR3	73
<i>fcuA-4</i>	2322	Receptor de ferricromo	<i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2	81
<i>fcuA-5</i>	2202	Receptor de ferricromo	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003	81
<i>fcuA-6</i>	1995	Receptor de ferricromo	<i>Paraburkholderia</i> sp. SOS3	77
<i>fcuA-7</i>	2190	Receptor de ferricromo	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	80
<i>fcuA-8</i>	1902	Receptor de ferricromo	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	81
<i>tonB-1</i>	714	Proteína TonB	<i>B. xenovorans</i> LB400	82
<i>tonB-2</i>	237	Proteína TonB	<i>B. ubonensis</i> MSMB22	79

Tabla 6.16 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la captación de hierro, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.5.5 Genes relacionados con la producción de cianuro de hidrógeno

Muchas PGPB tienen la capacidad de producir cianuro de hidrógeno (HCN), un metabolito secundario tóxico, relacionado con el biocontrol (Kamei *et al.*, 2014; Shaikh *et al.*, 2014). Ha sido reportado que la síntesis de este compuesto está relacionada con los genes *hcnABC* (Bruto *et al.*, 2014; Laville *et al.*, 1998). Han sido encontrados 7 genes relacionados con la síntesis de HCN en el genoma de *B. tropica* MTo-293 (Tabla 6.17).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>hcnA-2</i>	396	HCN sintasa subunidad HcnA	<i>B. phymatum</i> STM815	88
<i>hcnA-3</i>	312	HCN sintasa subunidad HcnA	<i>B. xenovorans</i> LB400	81
<i>hcnA-4</i>	267	HCN sintasa subunidad HcnA	<i>Paraburkholderia</i> sp. SOS3	87
<i>hcnB</i>	1002	HCN sintasa subunidad HcnB	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	84
<i>hcnC-1</i>	1209	HCN sintasa subunidad HcnC	<i>Burkholderia</i> sp. PAMC 28687	77
<i>hcnC-2</i>	1182	HCN sintasa subunidad HcnC	<i>B. phytofirmans</i> PsJN	83
<i>hcnC-3</i>	1164	HCN sintasa subunidad HcnC	<i>B. glumae</i> LMG 2196	74

Tabla 6.17 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la producción de HCN, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.5.6 Genes relacionados con la modulación de fitohormonas en la planta

Muchas PGPB presentan como mecanismo de promoción del crecimiento la modulación de fitohormonas, como por ejemplo el etileno, el cual está relacionado con la senescencia de las plantas (Cassán *et al.*, 2014). Algunas PGPB presentan la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, codificada por el gen *acdS*, cuya función es degradar el ACC producido por las plantas que, al ser un precursor del etileno, hace que disminuya su producción (Glick, 2006). Esta disminución se ve reflejada en un aumento en la resistencia de la planta a diversos tipos de *stress*. El gen *acdS* no fue encontrado en el genoma de *B. tropica* MTo-293, resultado que concuerda con lo reportado por Caballero-Mellado y colaboradores (2007), quienes no detectaron actividad ACC deaminasa ni tampoco pudieron amplificar el gen *acdS* en las cepas de *B. tropica* analizadas. Recientes análisis de los genomas de bacterias endófitas sugieren que la ACC deaminasa no está ampliamente distribuida entre los endófitos como se pensaba anteriormente (Hardoim *et al.*, 2015).

Por otro lado, muchas PGPB son capaces de producir metabolitos secundarios relacionados con la estimulación indirecta de la vía de síntesis de auxinas de la planta, tales como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), y el óxido nítrico (NO). El DAPG producido por *Pseudomonas fluorescens* (Couillerot *et al.*, 2009) a bajas concentraciones funciona como una molécula señal de inducción de resistencia sistémica en plantas (Bakker *et al.*, 2007; Iavicoli *et al.*, 2003), estimula la producción de exudados radicales (Phillips *et al.*, 2004) e influye en la síntesis de auxinas por la planta (Brazelton *et al.*, 2008). No se encontraron genes relacionados con la síntesis de DAPG en el genoma de *B. tropica* MTo-293. Por otro lado, varias PGPB tal como *Azospirillum brasilense*, poseen actividad nitrato reductasa y consecuentemente son capaces de producir NO durante la colonización de las raíces (Creus *et al.*, 2005; Molina-Favero *et al.*, 2008), involucrado en la vía de producción de auxinas controlando la formación de raíces laterales. Se encontró en el genoma de *B. tropica* MTo-293 un gen para una enzima óxido nítrico sintasa, de una longitud de 141 pb, que presenta un 90% de identidad con un gen presente en *Paraburkholderia sprentiae* WSM5005.

Ha sido también reportado que la síntesis de los compuestos volátiles 1,2 butanediol y acetoína por las PGPB influye en la homeostasis de auxinas en las plantas (Jha *et al.*, 2013) e induce la resistencia a condiciones de *stress* (Cho *et al.*, 2008). Estos compuestos son sintetizados a partir de los genes *budABC* (Bruto *et al.*, 2014). Se encontraron 4 genes relacionados con esta síntesis en el genoma de *B. tropica* MTo-293 (Tabla 6.18).

Gen	Longitud (pb)	Producto	Best hit	% de identidad
<i>budB</i>	1647	Acetolactato sintasa	<i>B. phymatum</i> STM815	86
<i>budC-1</i>	765	Diacetil reductasa	<i>Paraburkholderia caribensis</i> Bcrs1W	90
<i>budC-2</i>	777	L-2,3-butanediol deshidrogenasa	<i>B. vietnamiensis</i> AU1233	85
<i>budC-3</i>	738	Diacetil reductasa	<i>B. gladioli</i> BSR3	84

Tabla 6.18 Genes encontrados en *B. tropica* MTo-293 relacionados con la modulación de fitohormonas en la planta, sus posibles productos y su % de identidad con el *best hit*.

6.6 Genes relacionados con la virulencia

Como ha sido mencionado anteriormente, el género *Burkholderia* es un gran grupo de especies bacterianas que habitan una amplia gama de ambientes y ha sido separado en dos grupos distintos: el grupo A, que incluye a las especies no patogénicas asociadas a plantas y al ambiente, y el grupo B integrado por especies patógenas de humanos, plantas y animales, así como, patógenos-opportunistas. Se ha reportado que la patogénesis de las bacterias pertenecientes al grupo B es mediada por un número de características asociadas a la virulencia que controlan diferentes aspectos

de su progresión como la adhesión, la invasión, el escape, la movilidad intracelular, la toxicidad, entre otros (Angus *et al.*, 2014; Galyov *et al.*, 2010). Se analizaron varios genes relacionados con estas características que se muestran en la Tabla 6.19.

Gen	Descripción
<i>lfpA</i>	Proteína A de la familia lactonasa, requerida para patogénesis en animales
<i>bimA</i>	Proteína de motilidad intracelular
<i>bipB</i>	Proteína de invasión celular
<i>fla2</i>	Flagelos
<i>mviN</i>	Factor de virulencia
<i>cbIA</i>	Pili relacionado con la transmisibilidad
<i>esmR</i>	Regulador epidémico de transmisibilidad
<i>pilA</i>	Pili tipo IV
<i>pilB</i>	Pili tipo IV
<i>vgrG</i>	Sistema de secreción tipo VI
<i>hcp1</i>	Sistema de secreción tipo VI
<i>virB4</i>	Sistema de secreción tipo VI
<i>clpV</i>	Sistema de secreción tipo VI
<i>icmF</i>	Sistema de secreción tipo VI
<i>sctC</i>	Sistema de secreción tipo III

Tabla 6.19 Genes de virulencia reportados en especies patógenas del grupo B del género *Burkholderia* (Angus *et al.*, 2014; Galyov *et al.*, 2010).

Los genes *lfpA*, *bimA*, *bipB* y *mviN* fueron relacionados con la patogenicidad de *B. pseudomallei* en animales. El gen *mviN* fue también reportado como responsable de la patogenicidad en otras especies bacterianas, tales como *Francisella tularensis* y *Salmonella typhimurium* (Ling *et al.*, 2006; Ulland *et al.*, 2010). Perin y colaboradores (2006) reportaron dos genes encontrados sólo en las especies patógenas del género *Burkholderia*: el gen *cbIA*, que codifica para un pili gigante relacionado con la transmisibilidad, y el gen *esmR*, un factor de transmisibilidad utilizado como marcador molecular. No se ha encontrado ninguno de todos estos genes en el genoma de *B. tropica* MTo-293.

El *pili* tipo IV es utilizado por los microorganismos para la adhesión a superficies bióticas o abióticas y se encuentra relacionado también con la motilidad (Hardoim *et al.*, 2015; Mattick, 2002). Ha sido reportado que la expresión del *pili* tipo IV esta relacionada con la virulencia en *B. pseudomallei* (Galyov *et al.* 2010) y con la patogenicidad en otros microorganismos (Angus *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2008). Se encontró en el genoma de *B. tropica* MTo-293, el gen *pilQ*, que codifica para una proteína precursora implicada en la síntesis del *pili* tipo IV. Este gen tiene 792 pb, y un 80% de identidad con

un gen presente en *B. phenoliruptrix* BR3459a. PilQ es una proteína de la familia de las secretinas y está también relacionada con la movilidad tipo *twitching* (Lim *et al.*, 2008).

Al igual que el pili tipo IV, los sistemas de secreción de tipo III (T3SS) y VI (T6SS) están asociados a la patogénesis en ciertas especies del género *Burkholderia* (Angus *et al.*, 2014; Galyov *et al.*, 2010; Toesca *et al.*, 2014). Haroim y colaboradores (2015) han reportado que estos mismos sistemas son relevantes en la colonización de los tejidos de las plantas por las PGPB. En el genoma de *B. tropica* MTo-293, no se encontraron los genes reportados para *B. mallei* y *B. pseudomallei* (pertenecientes al grupo B) para estos sistemas, pero se hallaron otros genes relacionados a la producción de los sistemas de secreción tipo III y tipo VI.

Como ha sido demostrado previamente, *B. tropica* posee flagelos que le dan movilidad, y si bien esta ampliamente distribuida la presencia de flagelos en este género, ha sido descrito que las cepas patógenas pueden presentar dos conjuntos de genes para la síntesis de flagelos: *fla1*, presente en la mayoría de las especies del género y formado por los genes *fli*, *flh* y *flg* descritos anteriormente y encontrados en el genoma de *B. tropica* MTo-293, y *fla2*, un segundo conjunto de genes que se encuentra principalmente en las especies patógenas (Angus *et al.*, 2014; French *et al.*, 2011). No se encontraron los genes del grupo *fla2* en el genoma de *B. tropica* MTo-293.

6.7 Conclusiones

En el presente capítulo se ha realizado la búsqueda de genes relacionados con la rizocompetencia y la promoción del crecimiento vegetal de *B. tropica* MTo-293. Esto fue debido al conocimiento de la secuencia del genoma del microorganismo en estudio. Previamente a la búsqueda de genes de interés y a partir del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, se confirmó que el genoma obtenido correspondía a *B. tropica* MTo-293. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas de uso libre, fue posible analizar el genoma de *B. tropica* MTo-293 y encontrar genes relevantes para la rizocompetencia, tales como los relacionados a la quimiotaxis, adaptación al ambiente, QS, producción de EPS y formación de *biofilm*. También se encontraron genes implicados en la colonización endofítica y la persistencia en los tejidos internos, tales como los necesarios para la expresión de enzimas líticas de la pared celular vegetal, y de enzimas degradadoras de AHS y DFS. Se localizaron también genes relacionados con la producción de fitohormonas, la captación de hierro, HCN, enzimas degradadoras de AHL y DFS, procesos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal. La FBN y la solubilización de fosfatos insolubles son características que ya han sido reportadas en *B. tropica* y en este trabajo se han encontrado también genes que pueden ser los responsables de las mismas.

Es importante destacar que en esta búsqueda comparativa de genes con alguna función particular relacionada a la rizocompetencia o a la promoción del crecimiento vegetal, los genes de *B. tropica*

MTo-293 presentaron un elevado porcentaje de identidad con bacterias que correspondieron en su mayoría a especies benéficas filogenéticamente cercanas del grupo A de este género. Aunque aún quedan por analizar más genes relacionados tanto con las capacidades de colonización, de promoción del crecimiento e incluso de virulencia que escapan a la realización de este trabajo, el conocimiento de las secuencias de muchos genes de *B. tropica* MTo-293 potencialmente implicados en cada uno de los procesos analizados permitirá generar mutantes específicos relacionados a dicho proceso que posibilitarán el estudio de la función de esos genes que hasta el momento es putativa o potencial.

La presencia de diversos genes relacionados con la rizocompetencia y la promoción del crecimiento vegetal, así como la falta de determinantes de virulencia (al igual que otros integrantes del grupo A del género *Burkholderia*) en el genoma de *B. tropica* MTo-293 sugiere la potencial aplicación segura de este microorganismo en un contexto agrícola.

Mediante estudios comparativos de diversos genomas bacterianos secuenciados, se ha reportado que los mecanismos de modulación de las respuestas de defensa del hospedante usados por bacterias endófitas son diferentes de los más frecuentemente encontrados en bacterias simbioses mutualistas y patógenas (Vílchez *et al.*, 2016). La profundización del conocimiento del genoma de *B. tropica* MTo-293, contribuirá a la comprensión de los complejos mecanismos que regulan la colonización de plantas por bacterias endófitas. Además de contribuir al conocimiento de aspectos básicos de las interacciones entre plantas y microorganismos, la elucidación de tales mecanismos permitirá en el futuro mejorar la eficiencia de los productos biológicos formulados sobre la base de bacterias endófitas.

ANEXO 6

Construcción de un mutante de *B. tropica* MTo-293 deficiente en la formación de EPS

Considerando la posible participación del EPS producido por *B. tropica* en la formación de *biofilm* y en la colonización de tejidos vegetales, se planteó como objetivo la obtención de un mutante deficiente en la producción de EPS. Teniendo en cuenta la vía de síntesis previamente reportada para el EPS de bacterias del género *Burkholderia*, se seleccionó como posible gen a mutar el que codifica para la proteína BceR (Ferreira *et al.*, 2010) (*Locus tag*: Bcep1808_4476), una glicosiltransferasa elegida por haber sido demostrada su importancia en el proceso de formación de EPS (Ferreira *et al.*, 2010; 2011).

Como el genoma de *B. tropica* MTo-293 no había sido secuenciado hasta el momento, se decidió realizar un alineamiento de cepas filogenéticamente relacionadas, con el fin de encontrar secuencias compartidas por varias de estas cepas. Posteriormente, utilizando las secuencias consenso se realizaría el diseño de cebadores para lograr un *knock out* del gen en estudio a través de una mutación dirigida. Se buscaron y compararon los genomas de varias especies del género *Burkholderia* en la base de datos del IMG/M: Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (<https://img.jgi.doe.gov/>). Los genomas seleccionados correspondieron a varias especies beneficiosas para las plantas pertenecientes al Grupo A (Estrada-de los Santos *et al.*, 2013): *B. nodosa*, *B. graminis*, *B. oxyphila*, *B. bannensis*, *B. mimosarum*, *B. kururiensis*, *B. acidipaludis*, *B. xenovorans*, *B. phytofirmans*, *B. phymatum*, y también de *B. vietnamiensis*, que si bien no pertenece a este grupo, fue seleccionada por ser una especie del mismo género alejada filogenéticamente de las demás, pero con la secuencia del gen conservada. Todas estas cepas compartían el gen que se eligió como posible blanco de la mutación, es decir, el gen de la glicosiltransferasa BceR (Figuras A1 y A2).

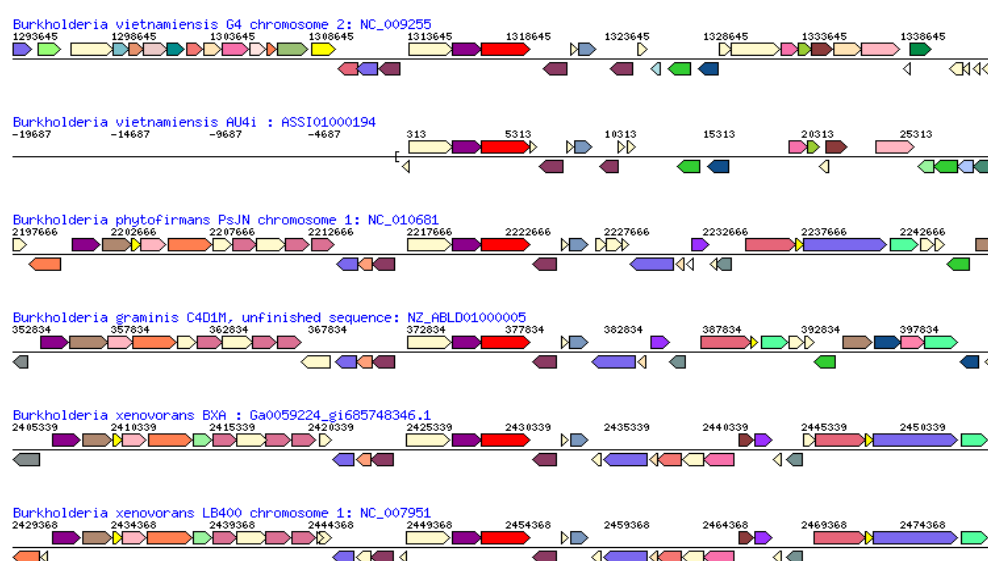


Figura A1 Comparación de genes relacionados con la síntesis de EPS de varias especies del género *Burkholderia*. Se observa en color rojo el gen de la proteína BceR, presente en todas las especies analizadas. Imagen obtenida de IMG/M: Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (<https://img.jgi.doe.gov/>).

Una vez seleccionado el gen en estudio y las cepas a utilizar, se obtuvo la secuencia nucleotídica de cada uno de ellos. Luego, se realizó el alineamiento de los genes a comparar, utilizando herramientas bioinformáticas. Mediante la utilización de BLAST, fue posible comparar las secuencias de nucleótidos de todos los genes, y buscar regiones comunes a todas las cepas que cumplieran ciertas características que las hicieran aptas para ser amplificadas. Posteriormente al alineamiento, se utilizó el *software* Clustal W2 para diseñar cebadores que permitirían amplificar la región de interés.

```
>640184784 glycosyl transferase, group 1 [Burkholderia vietnamiensis G4
chromosome 2: NC_009255] (+)strand

ATGAATCGCGATCTGGCGGAACACGCCTTGAACCTCGCCACGGCCGACGC
GGCCGCGGCCGCGATGCCGTACTGCGCCGACCGAAGCCGCCGCTCGCG
CGAGCGCACGCGATGCGTCCGCTCCGCTGCGCGTCCGCGATCGTCCACGAC
TGGCTCGTCCAGTATGCGCGCGCCGAGCGCGTGTCTGAAACAGATCATCGC
GTGCTTTCCCGACGCGGACCTGTTCCAGCCTCGTTCGATTTCTCGACGACC
GGCGGTTGCTGCGCGGCAAGCCCGTGACGACTTCGTTTCCATCCAGAAGCTG
CCGTTCCGCGCGCACCAAGTACCGCAGCTACCTGCGCGTGTGCGCGTCCG
GATCGAGCAGCTCGACGTGTCCGACTACGACCTCGTGTATCTCCAGCAGCC
ATGCGGTCGCGAAGGGCGTGTGACCGGCCCGGACCAGCTGCACATCAGC
TACGTGCATTCGCGCGATCCGCTACGCGTGGGACTTGCAGCATCAGTATCT
GGAGCAATCGAATCTCACGCACGGGCCGAAGTCCGCTGCTCGCGCGGATGA
TCTGTCATTACATCCGCAACTGGGACACGCGCACCGCGAACCGCGGTGGAC
GGCTTCATCGCGAACTCCGCGTTCATCGCGCGGCGCATCCGCAAGGTGTA
CCACCGCGACGCGCGCGTGTATCTTTCCGCGCGTGGACGTGACGCGCTCT
CGCTGAACGACGTGAAGGACGACTTCTACCTGACCGCGTCCGCGGATGGTG
CCGTACAAGAAGATCGACCTGATCGTTGAAGCGTTTTCGCGCACGCCCGA
GCGCAAGCTCGTTCGTGATCGGCGACGGCCCCGAGATGCAGAAGATCCGCG
CGAAGGCCGGCCGAACGTGAGATCATGGGCTACCAGCCGTTCCGCGGTG
TGCACGACCGGATGCGCGCGCGGAAGCGGTTGCTGTTCCGCGCGGAGGA
GGATTTCCGAATCTCGGTGGTCCGAGGCGCAGCGTGCAGCACGCCCGTCA
TCGCGTACGCGAAGGGCGCGCGCTCGAAACGGTGTCTCGAGCCGACCTCG
CAGCGCATCCGACCGGTTGTTCTTCGACGAAACAGACGCCCGCATCCGAT
CGTCGCTGCGGTTCGACGAGTTCGAGCGGGCGCCGACGCGCTTCGCGCCCG
GTGCGTGCAGCGCGAACGCGCGAGCGCTTCTCCGCGCACAGCTTCAGGCGAG
CGCTTTCTCGACTACGTCCGAGGCGCGCTGCCGGGCTCGACCGCGCAGCG
CAGTACGGCCGTCGCGCGCTGCCGGTTCGCGCGCGGCCCGGCGACGCTCG
TGTGAGACCAGAGCGCGTGTCTCGCGCGCGGAGCTGTGCTGTGAGAG
ATCATGAAGCACATGCGCGCGAACCGCGACGTGCTGCTGTTCCGACGACGG
CCCGTTTCGCGCGCGCTAGGCGAGATCGGCGCGCGCTCGACGTTGCTCG
ACCAGGGCGCGCTGGCCGGCGTGCAGCAAGCAGGGCGCGCTGTCGCGCCGC
GCGTTGAAGCAGCTCGTCCGCTCGTGCAGAACGTGGCGCGCGCGCGCGCG
CCGTGCGGAAGTGTATCTACGCGAACACGCGAGCGCGCGATGGTGGTCCGCG
CGCTGGCCGGCGCGCTCGCGCGCAAGCCGGTGGTCTGGCATCTGCCGCGAC
ATCGTCCAGCGCGACCATTTCCGCGCGCAAGCAGCTGAAGGCCATCAAATA
TTGCGCGCGGTTCCGGCATCACGCGCGTGTATCGCGAACTCGGACGCGTCCG
CGCAGGCGTTCGCTGCGTTGACCGGCTTCACGCGCAGCACGTCCGACGTTG
GTGTTCAACGCGATCTCGGCGGACCGTTCGACGCGCTGGAGAAGCTCAG
CCAGGCCGCGTTCGCGCGACGCTTCGGGCTGCCGGAGCACGCGTGGCTGG
TGGGCTCGTTCCAGCCGGCTCGCGCACTGGAAGGGGCGAGCATCTGCTGCTG
GAAGCCGCGACGCGCCATCCCGACATGCACGTCGTGCTGGTCCGCGCGCC
GCTGTTCCGCGAGGACGAGTACGCGCGCAGCTGCACGAGACGGTCCGCGC
GGCACCGGATGGGCGATCGCGTGCATTTCTCGGGTTCAGCGCGACGTTG
GCCGATGCATGAAGGCGGTTCGACATGGTCCGCGCACACGTCGATCCAGCC
GGAGCCGTTCCGGCGCGTGTATCGTCCGAGGGGATGCTGGCGCGCGCGCGCG
TGGTCCGCGCGCGGGCGGGCGCGCTCGTCCGAGATCATCGAGGACGCGGAG
AACGGGCTGCTGTGCGAGCCCGGCAACGCGCGCGCTGGCCGATGCGCT
CGGCAGGCTCAAGCACGACGCGCGCGCTGCCGAGCGGCTGGTCCGCGAGCG
GGCGAGACCGCGGTCGCGCGGTTCCGCGCACGAAACCTATGTCGAGCGG
GTCGAGAAGATCCTCGCGGATACGGCGAAGGCCGCGAAGGCCGAAGAAGCC
CTAG
```

Figura A2 Secuencia nucleotídica del gen de la proteína glicosiltransferasa BceR de *B. vietnamiensis*.

La estrategia de mutación consistió en amplificar con estos cebadores una región del gen *bceR*, para luego introducir dicho amplicón en el plásmido suicida pK18 (Figura A5), que presenta resistencia a kanamicina (Kn). Este plásmido suicida sería luego incorporado por electroporación a un cultivo de *B. tropica* y, finalmente, mediante presión de selección utilizando medio de cultivo con Kn, se esperaría obtener una cepa mutante incapaz de producir EPS.

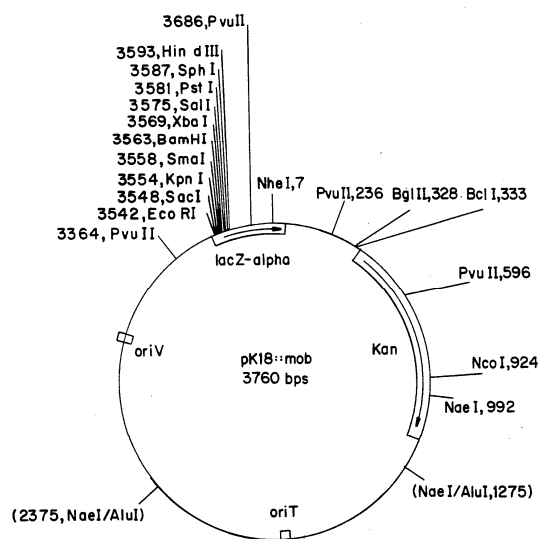


Figura A5 Plásmido pK18 (Bachmann *et al.*, 1992).

Mediante la alineación de secuencias de genomas secuenciados de distintas cepas del género *Burkholderia* del Grupo A, se lograron diseñar dos pares de cebadores con el fin de interrumpir el gen elegido implicado en la producción de EPS. Los dos pares de cebadores obtenidos por bioinformática fueron los siguientes:

Mut1: 5' GTGCATTGCCSAYCC 3'

Mut3: 5' TTCGCCGATCCGCTAYG 3'

Mut2: 5' CTCYTCSGCSGCGAAC 3'

Mut4: 5' YTCYTCSGCSGCGRAAS 3'

El amplicón que se esperaba obtener mediante la utilización del par de cebadores Mut1/Mut2 tendría 498 pb, mientras que el obtenido con los cebadores Mut3/Mut4 tendría 493 pb.

Una vez diseñados los cebadores y sintetizados, se emplearon para llevar a cabo las reacciones de PCR: 0,3 mM de cada dNTP, 1 U de Taq polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pM de cada cebador y buffer de reacción 1X. Se probaron distintas condiciones de ciclado de la PCR. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 2 minutos; 35 ciclos de 94°C 15 segundos, 50°C 15 segundos y 72°C 30 segundos correspondientes a la desnaturalización, hibridación y extensión de los cebadores respectivamente; y un paso de extensión final a 72°C durante 1 minuto. Se le realizaron variaciones de temperatura de hibridación del ciclado para poner a punto la amplificación con cada par de cebadores. Se probaron diversas temperaturas mediante la realización de PCRs con gradiente de

temperatura. Por otro lado, como se pretendía amplificar una región del gen de interés para luego ser introducida en el plásmido suicida, se utilizó además de la enzima Taq polimerasa, que amplifica dejando residuos de adenina en los extremos del amplicón, la enzima Kapa HiFi, que polimeriza dejando extremos romos, aptos para ser introducidos en el plásmido sin la necesidad de ningún tratamiento previo. La mezcla de reacción para la utilización de esta enzima fue: 0,3 mM de cada dNTP; 0,3 μ M de cada cebador; 5% de DMSO; 0,5 U de Kapa HiFi y *buffer* de reacción 1X. En el ciclado, la temperatura de hibridación utilizada fue 60°C, debido a que a esa temperatura funciona la enzima. Los productos de amplificación se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (PB-L) 1,5% p/v en Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml), a 100 voltios durante 30 minutos. La visualización de la amplificación en el gel se realizó por transiluminación ultravioleta (longitud de onda: 260 nm), y se registraron los resultados mediante fotografía de los geles con cámara digital (Canon) bajo iluminación ultravioleta.

Al no obtener amplificación con la realización de la primera PCR utilizando como temperatura de hibridación 50°C, se realizó el estudio de un gradiente de temperatura, abarcando un rango de temperaturas de entre 50 y 62°C. Tampoco se logró amplificar ningún fragmento del gen o bien se obtuvo amplificación inespecífica (gran cantidad de bandas), atribuyendo este resultado a un diseño incorrecto de los cebadores. Teniendo en cuenta la posibilidad de secuenciar el genoma de *B. tropica* MTo-293, se decidió dar por finalizado este ensayo hasta tener la posibilidad de un diseño correcto de los mismos.

Capítulo 7

Conclusión general y perspectivas

Capítulo 7

Conclusión general y perspectivas

Al comienzo de este trabajo se propuso como objetivo general, el desarrollo de metodologías conducentes a la aplicación agronómica de bacterias diazótrofes endófitas promotoras del crecimiento vegetal como una nueva alternativa de inoculación en gramíneas, particularmente cereales, que contribuya a la sustentabilidad económica y ambiental de estos cultivos procurando un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente. Persiguiendo este objetivo, se planteó como hipótesis que *B. tropica* MTo-293, bacteria fijadora de nitrógeno aislada de tejidos desinfectados de maíz, caña de azúcar y teosinte, tendría la capacidad de colonizar eficientemente otras gramíneas diferentes de sus huéspedes naturales, tales como trigo y sorgo, en las que podría expresar sus capacidades promotoras del crecimiento. Esto resultaría en la consideración de dicha bacteria como posible candidato para la formulación de inoculantes.

B. tropica es una bacteria considerada PGPB ya que posee características *in vitro* tales como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de compuestos insolubles de fósforo y la capacidad de producir sustancias antagonistas de hongos fitopatógenos, entre otras, que la convierten en un candidato promisorio para la aplicación en agricultura y en un modelo de estudio en la caracterización de la interacción diazótrofo endófito-gramínea. En este trabajo se evaluó el rol de la vía de oxidación periplasmática de aldosas en la solubilización de compuestos insolubles de fósforo por *B. tropica*-MTo-293, principal mecanismo de solubilización de estos compuestos en bacterias Gram negativas a través de la liberación de ácidos orgánicos. Haciendo uso de cultivos en medio sólido y en *batch* en medio líquido se demostró que *B. tropica* MTo-293 solubilizó compuestos insolubles de fósforo sólo en presencia de aldosas como fuente de carbono. También se determinó que la baja disponibilidad de fósforo (cultivos con fosfato tricálcico) y/o la condición de fijación biológica de nitrógeno (*stress* nutricional y energético, respectivamente) indujeron la vía periplasmática de oxidación de aldosas, presentando una actividad significativa mGDH y liberación de ácido glucónico al medio concomitantemente con el aumento de fósforo soluble. Esta actividad no se encontró cuando las disponibilidades de estos nutrientes fueron elevadas, pero la adición de PQQ a estos cultivos condujo a una excreción inmediata de ácido glucónico con una concomitante actividad mGDH. Considerando que ambos nutrientes, P y N, son los más requeridos por las plantas y limitantes en las zonas cercanas a la rizosfera, podría especularse que la vía de oxidación periplasmática de aldosas estaría activa en *B. tropica* MTo-293 cuando se encuentra colonizando las raíces, e incluso, que condiciones de baja fertilización contribuirían a la expresión de su capacidad como solubilizador de fósforo y fijador libre de Nitrógeno.

Para que las PGPB puedan ejercer *in vivo* algunos de los efectos promotores que presenta *in vitro*, la capacidad de colonizar las raíces ha sido considerada como un factor determinante en su eficiencia como inoculante. Esto ha llevado a un énfasis en la selección de bacterias que sean rizocompetentes, y entre algunas de las características que le confieren esta capacidad se encuentran la habilidad de formar *biofilm* y de producir enzimas líticas de las paredes vegetales, ambas características que fueron investigadas en este trabajo en *B. tropica* MTo-293. Esta bacteria fue capaz de crecer formando *biofilm* sobre superficies abióticas en la interfase líquido-aire, y extrapolando estos resultados con lo que podría ocurrir sobre las raíces, ésta es una situación factible de darse *in vivo* ya que la raíz no se encuentra sumergida en una suspensión acuosa sino que en el suelo en general existe una circulación de agua que propicia la formación de tal interfase. Observaciones microscópicas de *B. tropica* MTo-293 marcada con genes reporteros, mostraron que fue capaz de colonizar las raíces de ambas gramíneas formando estructuras fuertemente adheridas a la superficie que podrían interpretarse como *biofilm*. En relación a la producción de enzimas líticas de la pared vegetal se detectó actividad pectinasa a través de medidas de actividad enzimática en el sobrenadante de cultivos líquidos y se determinó que es inducible por sustrato, al igual que ocurre con otras PGPB endófitas. No se encontró actividad celulasa ni pectinasa en cultivos de *B. tropica* MTo-293 en un sistema de crecimiento en presencia de raíces de gramíneas, indicando que si la colonización interna de estos tejidos se realizó activamente mediante la expresión de estas enzimas, las concentraciones de las mismas no pudieron ser detectadas con la metodología empleada.

Luego, las PGPB rizocompetentes pueden establecerse de manera eficiente en la rizosfera, el rizoplano y/o los tejidos internos de la planta inoculada y ejercer sus efectos beneficiosos. En este trabajo, se planteó la evaluación de la eficiencia de colonización de *B. tropica* MTo-293 después de inocular semillas de ambas gramíneas a través de la visualización de la misma en los tejidos vegetales haciendo uso de técnicas microscópicas independientes de cultivo y de la cuantificación de las poblaciones del rizoplano y endofíticas por metodologías dependientes de cultivo. Dada la complejidad intrínseca de la interacción planta-microorganismo, los primeros ensayos fueron realizados en sistemas en condiciones gnotobióticas a partir de semillas desinfectadas superficialmente. Una vez conocidas ciertas características de la interacción, se realizaron estudios en sistemas más complejos en sustratos no estériles y finalmente en material colectado de campo, en los que el comportamiento de las bacterias inoculadas se ve afectado por la comunidad de microorganismos presentes en el material vegetal y en el entorno. La utilización de variantes isogénicas de *B. tropica* MTo-293, una de ellas construida durante este trabajo de Tesis (*B. tropica-gfp*), permitieron su visualización colonizando los tejidos de ambas gramíneas: *B. tropica* MTo-293 fue detectada sobre la superficie de la raíz ubicándose en hileras sobre la unión de las células de la epidermis y en otras zonas de la superficie de la raíz principalmente en la zona de pelos jóvenes, los

cuales también fueron colonizados superficialmente. En raíces de sorgo inoculadas en condiciones gnotobióticas fue posible encontrar a *B. tropica* MTo-293 colonizando los espacios intercelulares formados por células de la corteza. Después de inocular con *B. tropica* MTo-293 semillas de ambas gramíneas, se pudo evidenciar que fue capaz de colonizar eficientemente el rizoplasma (en el orden de 1.10^8 UFC/gramo de raíz) y los tejidos internos (en el orden de 1.10^4 UFC/gramo de raíz) de otras plantas diferentes a su huésped original, presentando un carácter endofítico en estas plantas crecidas en condiciones gnotobióticas y en tierra estéril, encontrándose una diferencia temporal en la colonización endofítica con respecto a la superficial cuando la cantidad de microorganismos inoculados por semilla fue muy baja. Cuando los ensayos se realizaron en tierra no estéril, *B. tropica* MTo-293 colonizó el rizoplasma eficientemente con valores de poblaciones del orden de 1.10^6 UFC/gramo de raíz, similares a los normalmente hallados en estas condiciones para otras PGPB, evidenciando su rizocompetencia frente a otros microorganismos que compiten por sustrato y nicho ecológico, pero no se encontró colonizando las raíces endofíticamente con las metodologías utilizadas y a los tiempos evaluados en estos ensayos. *B. tropica* MTo-293 fue capaz de colonizar tallos tanto superficial como endofíticamente en todas las condiciones de crecimiento evaluadas, incluso en tierra no estéril. Serán necesarios ensayos para mejorar su competitividad y también análisis a tiempos mayores para dilucidar este comportamiento, ya que si bien ciertos efectos, como por ejemplo la solubilización de compuestos insolubles de fósforo, pueden llevarse a cabo con una colonización superficial eficiente, otros como la modulación de la respuesta inmune de la planta o la fijación biológica de nitrógeno, se podrían dar de una manera más efectiva si el microorganismo logra colonizar los tejidos internos de las plantas.

La evaluación de ciertos aspectos prácticos relacionados a su posible uso como inoculante son fundamentales para que *B. tropica* MTo-293 se encuentre en el mejor estado fisiológico posible al momento de la aplicación, siendo esencial una formulación y una conservación adecuadas para mantener su viabilidad en el envase e incluso sobre la semilla, así como la evaluación de su compatibilidad con agroquímicos. En este trabajo fue posible formular un inoculante que mantuvo la viabilidad bacteriana por períodos relativamente prolongados de tiempo, conservando a los microorganismos en un buen estado fisiológico, ya que fueron capaces de colonizar eficientemente raíces de trigo a todos los tiempos ensayados. También se determinó que *B. tropica* MTo-293 aplicada sobre semillas de ambas gramíneas en dosis comúnmente utilizadas para otras PGPB permanece viable por 48 hs a temperaturas medias de 20-25°C y logra colonizar eficientemente el rizoplasma. *B. tropica* MTo-293 fue compatible con un fungicida de amplio uso en los cultivos ensayados y el agregado de protector contribuyó a mejorar su tolerancia cuando fue aplicado en semillas de trigo.

Teniendo como objetivo el uso potencial de *B. tropica* MTo-293 como inoculante en cultivos de trigo y sorgo, se realizaron ensayos a campo inoculando semillas de ambas gramíneas y se evaluó el efecto de la inoculación sobre el rendimiento de ambos cultivos. Se pudo observar un aumento del rendimiento, aunque no significativo, en trigo en los tratamientos inoculados comparados con los sin inocular en 3 de las 4 campañas realizadas, pero los testigos de los ensayos no fueron suficientes para poder correlacionar la respuesta de esta inoculación a la fertilización. En este sentido, y tal como se detalló anteriormente, es importante destacar más la estabilidad de la respuesta que su magnitud. Este resultado también pone en evidencia que en condiciones donde la bacteria tuvo que enfrentarse a un ambiente adverso, la colonización debió ser efectiva ya que a pesar de no haber podido aislar al microorganismo en estudio de las muestras provenientes de campo al momento de la cosecha, se observó el efecto promotor del crecimiento. Con respecto al sorgo, no se logró aislar el microorganismo en estudio de muestras de campo y no hubo respuesta a la inoculación. La respuesta de los cultivos a la inoculación con PGPB depende de una multitud de factores entre los cuales se destacan: el microorganismo, la especie vegetal, el tipo de suelo, el título y la dosis del inoculante, la forma de inoculación (suelo, semilla, etc.) y de las condiciones medioambientales bióticas y abióticas. Por lo tanto, es necesario continuar con los experimentos de campo en temporadas sucesivas, más zonas de experimentación, y un diseño que permita un análisis comparativo para poder establecer una relación directa entre la inoculación y la fertilización. Podría ser relevante la realización de nuevos ensayos con estos cultivos en zonas con mayor escasez de nutrientes, así como la mejora en las condiciones de inoculación y el formulado del inoculante.

En relación al comportamiento diferencial de *B. tropica* MTo-293 en ambas gramíneas, se puede concluir que no hubo diferencias marcadas en la eficiencia de colonización de tejidos superficiales e internos de trigo y sorgo. Si bien se observaron diferencias entre ambas gramíneas en la respuesta a la inoculación, no es posible realizar ninguna conclusión con los resultados de este trabajo, pero independientemente de la similitud en el comportamiento en cuanto a las características de colonización en los primeros estadios de crecimiento de las plantas, es válido plantear que la expresión de sus habilidades como promotor del crecimiento pueden ser diferentes en ambos cultivos, ya que como se detalló anteriormente esto depende de múltiples factores.

De acuerdo a la búsqueda bibliográfica realizada, los resultados presentados en este trabajo, tanto en relación a sus aptitudes de colonización como de supervivencia en semilla y evaluaciones a campo, serían los primeros reportes relacionados con la inoculación de *B. tropica* en trigo y sorgo.

Al final de este trabajo de Tesis, a partir del conocimiento de la secuencia del genoma de *B. tropica* MTo-293 y del posterior análisis bioinformático del mismo, se pudo determinar la presencia de diversos genes relacionados con la rizocompetencia y la promoción del crecimiento vegetal que presentaron un elevado porcentaje de identidad mayormente con especies benéficas

filogenéticamente cercanas del grupo A de este género. Otra característica hallada a partir de este análisis fue la falta de determinantes de virulencia en *B. tropica* MTo-293 (al igual que en otros integrantes del grupo A del género *Burkholderia*), resultado relevante que sugiere la potencial aplicación segura de este microorganismo en un contexto agrícola. Esta información posibilitará la construcción de mutantes en distintas funciones, permitiendo ampliar el conocimiento de las bases de la interacción entre *B. tropica* MTo-293 y las plantas que coloniza, así como de sus mecanismos de promoción del crecimiento. La profundización del conocimiento del genoma de *B. tropica* MTo-293, contribuirá a la comprensión de los complejos mecanismos que regulan la colonización de plantas por bacterias endófitas.

Los resultados obtenidos en este trabajo representan un avance en la caracterización de la interacción de una bacteria diazotrofa endófito y cultivos de dos cereales muy importantes en la Argentina, y particularmente en la región pampeana, tales como trigo y sorgo. Además de contribuir al conocimiento de aspectos básicos de las interacciones entre plantas y microorganismos, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permitirán mejorar la eficiencia de los productos biológicos formulados sobre la base de bacterias endófitas.

Capítulo 8

Referencias bibliográficas

Capítulo 8

Referencias bibliográficas

- Achouak W, Christen R, Barakat M, Martel MH, Heulin T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. 1999. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49(2):787-94.
- Adamowicz M, Conway T, Nickerson K. Nutritional restoration of oxidative glucose metabolism in *Escherichia coli* by addition of the glucose dehydrogenase cofactor PQQ. 1991. Appl. Environ. Microbiol 57:2012-2015.
- Adetunji VO, Isola TO. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on wood, steel and glass surfaces. 2011. Global Veterinaria 6(1):6-10.
- Adriano-Anaya ML, Salvador-Figueroa M, Ocampo JA, García-Romera I. Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. 2006. Soil Biology and Biochemistry 38(5):879-86.
- Ahemad M, Khan MS. Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. 2012. Saudi journal of biological sciences 19(4):451-9.
- Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. 2014. Journal of King Saud University-Science 26(1):1-20.
- Ahmad I, Pichtel J, Hayat S, editors. Plant-bacteria Interactions: Strategies and Techniques to promote plant growth. 2008. John Wiley & Sons.
- Ahmed N, Shahab S. Phosphate solubilization: Their mechanism, genetics and application. 2009. Internet J Microbiol 9:1.
- Aizawa T, Ve NB, Vijarnsorn P, Nakajima M, Sunairi M. *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Fleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. 2010. International journal of systematic and evolutionary microbiology 60(9):2036-41.
- Aizawa T, Vijarnsorn P, Nakajima M, Sunairi M. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. 2011. International journal of systematic and evolutionary microbiology 61(7):1645-50.
- Alikhani HA, Saleh-Rastin N, Antoun H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. 2007. En: First international Meeting on microbial phosphate solubilization: 35-41. Springer Netherlands.
- Alkorta I, Garbisu C, Llama MJ, Serra JL. Industrial applications of pectic enzymes: a review. 1998. Process Biochemistry 33(1):21-8.
- Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. 2013. Molecular Plant-Microbe Interactions 26(8):937-45.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. 1990. Journal of molecular biology 215(3):403-10.
- Álvarez A, Sanjuán J. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. 2007. Eds: Izaguirre-Mayoral ML, Labandera C, Sanjuán J pp 1-3
- Ameyama M, Nonobe M, Shinagawa E, Matsushita K, Takimoto K, Adachi O. Purification and characterization of the quinoprotein D-glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*. 1986. Agricultural and biological chemistry 50(1):49-57.
- Andreote FD, de Araújo WL, de Azevedo JL, van Elsas JD, da Rocha UN, van Overbeek LS. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. 2009. Applied and environmental microbiology 75(11):3396-406.
- Angelichio MJ, Camilli A. In vivo expression technology. 2002. Infection and immunity 70(12):6518-23.

- Angus AA, Agapakis CM, Fong S, Yerrapragada S, Estrada-De Los Santos P, Yang P, Song N, Kano S, Caballero-Mellado J, De Faria SM, Dakora FD. Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. 2014. PloS one 9(1):e83779.
- Anthony PF. Direct monitoring of formaldehyde vapour and detection of ethanol vapour using dehydrogenase-based biosensors. 1996. Analyst 121(12):1769-1773.
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). 1998. Plant and soil 204(1):57-67.
- Antoun H, Prévost D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. 2005. In: PGPR: Biocontrol and biofertilization: 1-38. Springer Netherlands.
- Antoun, H. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. 2013. Revisión.
- Appleby CA. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. 1984. Annual Review of Plant Physiology 35(1):443-78.
- Assmus B, Hutzler P, Kirchhof G, Amann R, Lawrence JR, Hartmann A. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. 1995. Applied and Environmental Microbiology 61(3):1013-9.
- Avezoux A, Goodwin MG, Anthony C. The role of the novel disulphide ring in the active site of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. 1995. Biochemical Journal 307(3):735-741.
- Babalola OO. Beneficial bacteria of agricultural importance. 2010. Biotechnology letters 32(11):1559-70.
- Babu-Khan S, Yeo TC, Martin WL, Duron MR, Rogers RD, Goldstein AH. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. 1995. Applied and environmental microbiology 61(3):972-978.
- Bachmann F, Kutzner HJ, Sonnen H, Thierbach G, Kautz PS, Puhler A, Schaefer A, inventors; Degussa Aktiengesellschaft, assignee. Plasmids from corynebacterium glutamicum and plasmid vectors derived therefrom. 1992. United States patent US 5,175,108.
- Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos E, Bouquelet S, Zenteno E. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. 2003. Plant and Soil 249(2):271-7.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. 2006. Annu. Rev. Plant Biol. 57:233-66.
- Bakker PA, Pieterse CM, Van Loon LC. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. 2007. Phytopathology 97(2):239-43.
- Balachandar D, Sandhiya GS, Sugitha TC, Kumar K. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. 2006. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22(7):707-12.
- Baldani JJ, Baldani V, Seldin L, Döbereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. 1986. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 36(1):86-93.
- Baldani VL, Baldani JJ, Döbereiner J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. 1987. Biology and fertility of soils 4(1-2):37-40.
- Barea JM. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. 2015. Journal of soil science and plant nutrition 15(2):261-82.
- Barka EA, Nowak J, Clément C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. 2006. Applied and Environmental Microbiology 72(11):7246-52.
- Barret M, Morrissey JP, O'Gara F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. 2011. Biology and Fertility of Soils 47(7):729.
- Bashan Y, Levanony H, Klein E. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. 1986. Microbiology 132(11):3069-73.

- Bashan Y. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. following temporary depression of rhizosphere microflora. 1986. Applied and environmental microbiology 51(5):1067-71.
- Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. 1998. Biotechnology advances 16(4):729-770.
- Bashan Y, Holguin G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. 1998. Soil Biology and Biochemistry 30(8):1225-8.
- Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). 2004. Canadian journal of microbiology 50(8):521-77.
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). 2014. Plant and Soil 378(1-2):1-33.
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(17):E1621-30.
- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A, Squartini A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. 2004. Systematic and Applied Microbiology 27(4):462-468.
- Benizri E, Baudoin E, Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. 2001. Biocontrol science and technology 11(5):557-74.
- Bernabeu PR, Pistorio M, Torres-Tejerizo G, Estrada-De los Santos P, Galar ML, Boiardi JL, Luna MF. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. 2015. Scientia Horticulturae 191:113-20.
- Bernabeu PR, García SS, Ferreyra GG, Guidi VI, Galar ML, Boiardi JL, Luna MF. Mineral Phosphate Solubilization in *Burkholderia tropica* involves an Inducible PQQ-Glucose Dehydrogenase. 2016.
- Bernardelli C, Luna MF, Galar M, Boiardi JL. Periplasmic PQQ dependency glucose oxidations in free-living and symbiotic Rhizobia. 2001. Current Microbiology 5: 310-315.
- Bertini EV, Peñalver CG, Leguina AC, Irazusta VP, de Figueroa LI. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 possesses an active quorum sensing regulatory system. 2014. Antonie van Leeuwenhoek 106(3):497-506.
- Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Carusi MV, Del Gallo M, Visca P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. 1994. Microbiology 140(5):1069-77.
- Bevivino A, Dalmastric C, Tabacchioni S, Chiarini L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. 2000. Biology and Fertility of Soils 31(3-4):225-31.
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. 2008. Applied Microbiology and Biotechnology 80:199-209.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. 2012. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28(4):1327-50.
- Bogino PC, Oliva MD, Sorroche FG, Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. 2013. International journal of molecular sciences 14(8):15838-59.
- Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Twitching Motility Is Essential for Endophytic Rice Colonization by the N₂-Fixing Endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. 2007. The American Phytopathological Society 20(5): 526–533.
- Boiardi JL, Galar ML, Neijssel OM. PQQ-linked extracellular glucose oxidation and chemotaxis towards this cofactor in rhizobia. 1996. FEMS microbiology letters 140(2-3):179-184.
- Bolívar-Anillo HJ, Contreras-Zentella ML, Teherán-Sierra LG. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. 2016. TIP 19(2):102-108.
- Bordi C, de Bentzmann S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. 2011. Annals of intensive care 1(1):19.
- Bosch A, Massa NE, Donolo A, Yantorno O. Molecular characterisation by infrared spectroscopy of *Bordetella pertussis* grown as biofilm. 2000. *physica status solidi (b)* 220(1):635-40.

- Boucher CA, Barberis PA, Demery DA. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. 1985. *Microbiology* 131(9):2449-2457.
- Brazelton JN, Pfeufer EE, Sweat TA, Gardener BB, Coenen C. 2, 4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. 2008. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(10):1349-58.
- Brihet JM. Producción de granos y adopción de tecnología en Argentina. 2015. Simposio Fertilizar
- Bruto M, Prigent-Combaret C, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. 2014. *Scientific reports* 4:6261.
- Buschart A, Sachs S, Chen X, Herglotz J, Krause A, Reinhold-Hurek B. Flagella Mediate Endophytic Competence Rather Than Act as MAMPS in Rice–*Azoarcus* sp. Strain BH72 Interactions. 2012. *The American Phytopathological Society* 25(2):191–199.
- Buurman ET, Gerald J, de Mattos MJ. The physiological function of periplasmic glucose oxidation in phosphate-limited chemostat cultures of *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418. 1994. *Microbiology* 140(9):2451-8.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Estrada-De Los Santos P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4):1165-72.
- Caballero-Mellado J. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. 2006. *Revista Latinoamericana de Microbiología*: 48(2):154-61.
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. 2007. *Applied and environmental microbiology* 73(16):5308-19.
- Carrasco N, Zamora MS, Melin A, Natalia Carrasco MZ. Manual de sorgo. 2011. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina).
- Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, Ferreira PCG, Hemery AS. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. 2014. *Journal of experimental botany* 65(19): 5631–5642.
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. 2014. *Journal of Plant Growth Regulation* 33(2):440-59.
- Cassán F, Diaz-Zorita M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. 2016. *Soil Biology and Biochemistry* 103:117-130.
- Cassán FD. Control de calidad de bioinsumos: 10 años de experiencia de la REDCAI en Argentina 2016. V Jornadas Bonaerenses de microbiología de suelos para una agricultura sustentable. La Plata, Bs. As.
- Castro-González R, Martínez-Aguilar L, Ramírez-Trujillo A, Estrada-de Los Santos P, Caballero-Mellado J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. 2011. *Plant and soil* 345(1-2):155-169.
- Catroux G, Hartmann A, Revellin C. Trends in rhizobial inoculant production and use. 2001. *Plant and soil* 230(1):21-30.
- Cavalcante V, Döbereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. 1988. *Plant and Soil* 108: 23-31.
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. 1996. *Plant and Soil* 184(2):311-21.
- Chen WM, James EK, Coenye T, Chou JH, Barrios E, De Faria SM, Elliott GN, Sheu SY, Sprent JI, Vandamme P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. from Taiwan and South America. 2006. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(8):1847-51.
- Chen Y, Cao S, Chai Y, Clardy J, Kolter R, Guo JH, Losick R. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. 2012. *Molecular microbiology* 85(3):418-30.
- Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R, Guo JH. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. 2013. *Environmental microbiology* 15(3):848-64.

- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. 2003. *Nucleic Acids Research* 31(13):3497–3500.
- Chiari L, Bevivino A, Tabacchioni S, Dalmastrì C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on Sorghum bicolor: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. 1998. *Soil Biology and Biochemistry* 30(1):81-7.
- Cho HS, Park SY, Ryu CM, Kim JF, Kim JG, Park SH. Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. 2007. *FEMS microbiology ecology* 60(1):14-23.
- Cho SM, Kang BR, Han SH, Anderson AJ, Park JY, Lee YH, Cho BH, Yang KY, Ryu CM, Kim YC. 2R, 3R-butenediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. 2008. *Molecular plant-microbe interactions* 21(8):1067-75.
- Choi O, Kim J, Kim JG, Jeong Y, Moon JS, Park CS, Hwang I. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. 2008. *Plant physiology* 146(2):657-68.
- Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater APHA-AWWA-WEF. 1998. Washington, DC.
- Cleton-Jansen AM, Goosen N, Wenzel TJ, van de Putte PIETER. Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. 1988. *Journal of bacteriology* 170(5):2121-2125.
- Cleton-Jansen AM, Goosen N, Fayet O, Van de Putte P. Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. 1990. *Journal of bacteriology* 172(11):6308-6315.
- Cocking EC. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. 2003. *Plant and soil* 252(1):169-75.
- Cocking EC, Stone PJ, Davey MR. Intracellular colonization of roots of *Arabidopsis* and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2006. *En: Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 42(1):74-82.
- Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 39(10):3427-3436.
- Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. 2003. *Environmental Microbiology* 5(9):719-29.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. 2005a. *Applied and environmental microbiology* 71(9):4951-9.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka EA. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. 2005b. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4):1685-93.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Barka EA. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. 2008a. *FEMS microbiology reviews* 32(4):607-26.
- Compant S, Kaplan H, Sessitsch A, Nowak J, Barka EA, Clément C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. 2008b. *FEMS microbiology ecology* 63(1):84-93.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. 2010. *Soil Biology and Biochemistry* 42(5):669-78.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H, Sessitsch A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. 2011. *Microbial ecology* 62(1):188-97.
- Cortés-Patiño SA, Bonilla RR. Polymers selection for a liquid inoculant of *Azospirillum brasilense* based on the Arrhenius thermodynamic model. 2015. *African Journal of Biotechnology* 14(33):2547-53.
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moëgne-Loccoz Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. 2009. *Letters in applied microbiology* 48(5):505-12.
- Covarrubias SA, de-Bashan LE, Moreno M, Bashan Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. 2012. *Applied microbiology and biotechnology* 93(6):2669-80.

- Cozier GE, Anthony C. Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. 1995. *Biochemical Journal* 312(3):679-685.
- Cozier GE, Salleh RA, Anthony C. Characterization of the membrane quinoprotein glucose dehydrogenase from *Escherichia coli* and characterization of a site-directed mutant in which histidine-262 has been changed to tyrosine. 1999. *Biochemical Journal* 340(3):639-647.
- Crespo JM, Boiardi JL, Luna MF. Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. 2011. *Agricultural Sciences* 2(01):16.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. 2005. *Planta* 221(2):297-303.
- Creus, CM. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: usos y alcances en cultivos extensivos. El modelo *Azospirillum* sp. - gramíneas. 2016. V Jornadas Bonaerenses de microbiología de suelos para una agricultura sustentable. La Plata, Bs. As.
- Danhorn T, Fuqua C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. 2007. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401-22.
- Dar GH, Zargar MY, Beigh GM. Biocontrol of Fusarium root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. 1997. *Microbial Ecology* 34(1):74-80.
- Dayamani KJ, Brahmaprakash GP. Influence of form and concentration of the osmolytes in liquid inoculants formulations of plant growth promoting bacteria. 2014. *Int. J. Scient. Res. Publ.(Malaysia)* 4(7):1-6.
- De Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). 1997. *Biology and Fertility of Soils* 24(4):358-364.
- De Jonge R, De Mattos MT, Stock JB, Neijssel OM. Pyrroloquinoline quinone, a chemotactic attractant for *Escherichia coli*. 1996. *Journal of bacteriology* 178(4):1224-1226.
- De Maeyer K, D'aes J, Hua GK, Perneel M, Vanhaecke L, Noppe H, Höfte M. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. 2011. *Microbiology* 157(2):459-72.
- De Meyer SE, Briscoe L, Martínez-Hidalgo P, Agapakis CM, de-los Santos PE, Seshadri R, Reeve W, Weinstock G, O'Hara G, Howieson JG, Hirsch AM. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high-affinity cytochrome cbb3 oxidase genes. 2016. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29(8):609-19.
- De Souza AR, De Souza SA, De Oliveira MV, Ferraz TM, Figueiredo FA, Da Silva ND, Rangel PL, Panisset CR, Olivares FL, Campostrini E, De Souza Filho GA. Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology and activation of plant defense. 2016. *Plant and Soil* 399(1-2):257-70.
- De Vries RP, Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. 2001. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65: 497-522.
- de Weert S, Vermeiren H, Mulders IH, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJ. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. 2002. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(11):1173-80.
- Deris ZZ, Van Rostenberghe H, Habsah H, Noraida R, Tan GC, Chan YY, Rosliza AR, Ravichandran M. First isolation of *Burkholderia tropica* from a neonatal patient successfully treated with imipenem. 2010. *International Journal of Infectious Diseases* 14(1):73-4.
- Dewanti Galar AR, Duine JA. Reconstitution of membrane-integrated quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme with PQQ and the holoenzyme's mechanism of action. 1998. *Biochemistry* 37(19):6810-6818.
- Díaz-Zorita M, Fernandez Canigia MV. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. 2008. *Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología*: 155-66.
- Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia MV. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. 2009. *European Journal of Soil Biology* 45(1):3-11.
- Dietel K, Beator B, Budiharjo A, Fan B, Borriss R. Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. 2013. *The plant pathology journal* 29(1):59-66.

- Díez López, JA. Optimización de la fertilización nitrogenada: procedimientos de análisis de suelo, toma de muestra y elección del tipo de fertilizante. 1999. *Edafología* 6:73-84.
- Divan Baldani VL, Baldani JI, Döbereiner J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. 2000. *Biology and Fertility of Soils* 30(5):485-91.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. 2003. *Critical reviews in plant sciences* 22(2):107-49.
- Döbereiner J, Baldani VL. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. 1979. *Canadian Journal of Microbiology* 25(11):1264-9.
- Dobereiner, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. 1997. *Soil Biology and Biochemistry* 29:771-774.
- Dobritsa AP, Samadpour M. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. 2016. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66(8):2836-46.
- Dombrecht B, Vanderleyden J, Michiels J. Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. 2001. *Molecular plant-microbe interactions* 14(3):426-30.
- Dong Y, Iniguez AL, Triplett EW. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. 2003. *Plant and soil* 257(1):49-59.
- Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. 2005. *J Microbiol.* 43(1):101-9.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. 2002. *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):167-193.
- Drogue B, Sanguin H, Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyé F. Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. 2014. *FEMS microbiology ecology* 87(2):543-55.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. 2014. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106(1):85-125.
- Duine JA, Frank, JZN, Verwiel PEJ. Structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. 1980. *European Journal of Biochemistry* 108(1):187-192.
- Duine JA. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. 1991. *The FEBS Journal* 200(2):271-284.
- Duine JA. The PQQ story. 1999. *Journal of bioscience and bioengineering* 88(3):231-236.
- Eberl L, Vandamme P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. 2016. F1000Research 5.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. 2001. *Applied and environmental microbiology* 67(11):5285-93.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Suzuki H, Sato T, Sato YI, Morisaki H, Mitsui H, Minamisawa K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. 2000. *Soil science and plant nutrition* 46(3):617-629.
- Ertola R, Yantorno O, Mignone C. *Microbiología industrial*. 2000. Monografía de la Organización de los Estados Americanos.
- Espinosa-Urgel M, Salido A, Ramos JL. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. 2000. *Journal of bacteriology* 182(9):2363-9.
- Estrada-de los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. 2001. *Applied and environmental microbiology* 67(6):2790-8.
- Estrada-de los Santos P, Vacaseydel-Aceves NB, Martínez-Aguilar L, Cruz-Hernández MA, Mendoza-Herrera A, Caballero-Mellado J. *Cupriavidus* and *Burkholderia* species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. 2011. *The Journal of Microbiology* 49(6):867-76.

- Estrada-de los Santos P, Vinuesa P, Martínez-Aguilar L, Hirsch AM, Caballero-Mellado J. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. 2013. *Current microbiology* 67(1):51-60.
- Estrada-de los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY, Vásquez-Murrieta MS, Hirsch AM. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. 2016. *Annals of Microbiology* 66(3):1303-14.
- Fähraeus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. 1957. *Microbiology* 16(2):374-81.
- Ferraris G, Anta GG, Díaz-Zorita M. Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. 2006. En: *Actas 3er Congreso Soja del MERCOSUR. Conferencias plenarias, Foros y Workshops* (pp. 85-89).
- Ferraris G, Faggioli V. Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina. 2011. En: *Anales del Internacional de Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura sustentable. XXII Congreso Argentino de Microbiología*.
- Ferraris AM. Inoculación con microorganismos con efecto promotor del crecimiento (PGPM) en trigo. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la región pampeana argentina. 2012. INTA
- Ferraris G. Manejo de la fertilidad del suelo en cultivos extensivos: impacto de los biofertilizantes. Panorama actual de su uso en la Provincia de Buenos Aires. 2016. V Jornadas Bonaerenses de microbiología de suelos para una agricultura sustentable. La Plata, Bs. As.
- Ferreira AS, Leitao JH, Silva IN, Pinheiro PF, Sousa SA, Ramos CG, Moreira LM. Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(2):441-450.
- Ferreira AS, Silva IN, Moreira LM. Mechanisms controlling the expression of the exopolysaccharide of *Burkholderia* and role in niche adaptation. 2011. *Biotechnology of Biopolymers* 147-64.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. 2010. *Nature Reviews Microbiology* 8(9):623-33.
- Flores-Cruz Z, Allen C. *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection. 2009. *Molecular plant-microbe interactions* 22(7):773-82.
- Flores-Encarnación M, Sánchez-Cuevas M, Ortiz-Gutiérrez F. Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. 2004. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 46(1-2):47-59.
- Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch LFW, Krogfelt K, Struve C, Triplett EW, Methé BA. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. 2008. *PLoS Genetics* 4:e1000141.
- French CT, Toesca IJ, Wu TH, Teslaa T, Beaty SM, Wong W, Liu M, Schröder I, Chiou PY, Teitell MA, Miller JF. Dissection of the *Burkholderia* intracellular life cycle using a photothermal nanoblade. 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(29):12095-100.
- Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J. Bacterial biofertilizers. 2005. En: *PGPR: Biocontrol and biofertilization: 143-172*. Springer Netherlands.
- Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. 2001. *Annual review of genetics* 35(1):439-68.
- Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. 2002. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(9):685-95.
- Fuwa H. A new method for microdetermination of amylase activity by use of amylase as the substrate. 1954. *The journal of Biochemistry* 41(5):583-603.
- Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. 2013. *American journal of botany* 100(9):1738-50.
- Galar ML, Boiardi JL. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. 1995. *Applied microbiology and biotechnology* 43(4):713-6.

- Galippe V. Note sur la présence de micro-organismes dans les tissus végétaux. 1887. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie et des ses Filiales et Associées 39:410-6.
- Galyov EE, Brett PJ, DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. 2010. Annual review of microbiology 64:495-517.
- Gamalero E, Lingua G, Berta G, Lemanceau P. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. 2003. Agronomie 23(5-6):407-18.
- Gamalero E, Lingua G, Capri FG, Fusconi A, Berta G, Lemanceau P. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. 2004. FEMS Microbiology Ecology 48(1):79-87.
- Garbeva P, Van Overbeek LS, Van Vuurde JW, Van Elsas JD. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. 2001. Microbial ecology 41(4):369-83.
- Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. 1995. Canadian Journal of Microbiology 41(2):109-17.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. 1999. World Scientific.
- Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. 2006. FEMS microbiology letters 251(1):1-7.
- Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. 2012. Scientifica.
- Goldstein A, Lester T, Brown J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. 2003. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 1647(1):266-271.
- Goldstein AH. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. 1986. American Journal of Alternative Agriculture 1(2):51-57.
- Goldstein AH, Liu ST. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. 1987. Nature Biotechnology 5(1):72-74.
- Goldstein AH. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. 1995. Biological Agriculture & Horticulture 12(2): 185-193.
- Goldstein AH, Braverman K, Osorio N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. 1999. FEMS Microbiology Ecology 30(4):295-300.
- González Montaner JH, Di Napoli MR, Quattrocchio A, Andenoché J, Posborg M, Dodorico F. Rizobacterias promotoras del crecimiento en trigo. Resultados de ensayos 2007/8. 2008. AACREA Región Mar y Sierras, JAT de Actualización Trigo 2008, Azul (Bs. As.), p 17-21.
- Goodwin TW, Mercer EI. The plant cell wall. En Goodwin, T. W. y Mercer, E. I. (eds.). Introduction to Plant Biochemistry. 1990. Oxford: Pergamon Press, 55-91.
- Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen III JF, Tiedje JM, Vandamme P. Classification of the biphenyl-and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. 2004. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(5):1677-81.
- Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. 1996. Microbiological reviews 60(3):539-74.
- Govindarajan M, Balandreau J, Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. 2006. Plant and Soil 280(1):239-52.
- Govindarajan M, Balandreau J, Kwon SW, Weon HY, Lakshminarasimhan C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. 2008. Microbial Ecology 55(1):21-37.
- Grayston SJ, Campbell CD. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). 1996. Tree Physiology 16:1031-8.

- Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, Poole PS, Collins MD, Hutson RA, Kumar GN. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. 1999. FEMS microbiology letters 171(2):223-229.
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. 2001. Journal of bacteriology 183(8):2634-45.
- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. 2002. Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities. Springer Netherlands: 133-143.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bontemps C, Estrada-de los Santos P, Gross E, dos Reis Jr FB, Sprent JI, Young JP. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. 2011. Molecular plant-microbe interactions 24(11):1276-88.
- Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. 2005. Nature Reviews Microbiology 3(4):307-19.
- Haggag WM, Timmusk S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. 2008. Journal of applied microbiology 104(4):961-9.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Klopper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. 1997. Canadian Journal of Microbiology 43(10):895-914.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Miller WG, Sikora RA, Lindow SE. Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. 2001. Phytopathology 91(4):415-22.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. 2004. Nature reviews microbiology 2(2):95-108.
- Han SH, Kim CH, Lee JH, Park JY, Cho SM, Park SK, Kim KY, Krishnan HB, Kim YC. Inactivation of *pqq* genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. 2008. FEMS microbiology letters 282(1):140-6.
- Hankin L, Zucker M, Sands DC. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. 1971. Applied Microbiology 22(2):205-9.
- Hansen M, Kragelund L, Nybroe O, Sørensen J. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. 1997. FEMS microbiology ecology 23(4):353-60.
- Hao T, Chen S. Colonization of Wheat, Maize and Cucumber by *Paenibacillus polymyxa* WLY78. 2017. PloS one 12(1):e0169980.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. 2008. Trends in microbiology 16(10):463-71.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. 2015. Microbiology and Molecular Biology Reviews 79(3):293-320.
- Hartmann A, Bashan Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB)—Special Issue. 2009. European Journal of Soil Biology 1(45):1-2.
- Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. 1997. Journal of Clinical Microbiology 35(3):614-9.
- Herbert D, Phipps PJ, Strange RE. Chapter III chemical analysis of microbial cells. 1971. Methods in microbiology 5:209-344.
- Herridge DF, Turpin JE, Robertson MJ. Improving nitrogen fixation of crop legumes through breeding and agronomic management: analysis with simulation modelling. Animal Production Science. 2001 May 18;41(3):391-401.
- Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(40):14422-7.
- Hirsch PR, Mauchline TH. Who's who in the plant root microbiome? 2012. Nature biotechnology 30(10):961.

- Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang ZY, Dean DR, Seefeldt LC. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. 2014. *Chemical reviews* 114(8):4041-62.
- Hommel RWJ. The role of the PQQ-linked glucose dehydrogenase in the physiology of *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. 1988. Doctoral dissertation.
- Hommel RWJ, Postma PW, Tempest DW, Neijssel OM. The influence of the culture pH value on the direct glucose oxidative pathway in *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418. 1989. *Archives of microbiology* 151(3):261-267.
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, Van Montagu M, Kellenberger E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. 1994. *Journal of bacteriology* 176(7):1913-23.
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. 2002. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(3):233-42.
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux JP. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. 2003. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(10):851-8.
- Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. 1992. *Soil Biology and Biochemistry* 24(4):389-395.
- Ishida K, Lincke T, Behnken S, Hertweck C. Induced biosynthesis of cryptic polyketide metabolites in a *Burkholderia thailandensis* quorum sensing mutant. 2010. *Journal of the American Chemical Society* 132(40):13966-8.
- Iswantini D, Kenji KANO, Ikeda T. Kinetics and thermodynamics of activation of quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme *in vivo* and catalytic activity of the activated enzyme in *Escherichia coli* cells. 2000. *Biochemical Journal*, 350(3):917-923.
- Jahangeer S, Khan N, Sohail M, Shahzad S, Ahmad A, Khan SA. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. 2005. *Pakistan J Bot* 37: 739-748.
- James EK, Olivares FL. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. 1998. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17:77-119.
- James E. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. 2000. *Field Crops Research* 65:197-209.
- James EK, Olivares FL, de Oliveira AL, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. 2001. *Journal of Experimental Botany* 52(357):747-60.
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PP, Olivares FL, Ladha JK. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. 2002. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(9):894-906.
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. 2005. *Process Biochemistry* 40(9):2931-44.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. 1986. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(22):8447-51.
- Jha PN, Gupta G, Jha P, Mehrotra R. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. 2013. *Greener Journal of Agricultural Sciences* 3(2):73-84.
- Jiang CY, Sheng XF, Qian M, Wang QY. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. 2008. *Chemosphere* 72(2):157-64.
- Kamei AK, Apou Kamei A. Role of hydrogen cyanide secondary metabolite of plant growth promoting rhizobacteria as biopesticides of weeds. 2014. *Global Journal of Science Frontier Research* 14(6).
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. 2001. *Bioresource technology* 77(3):215-27.
- Kaur C, Selvakumar G, Ganeshamurthy AN. Draft genome sequence of phosphate-solubilizing bacterium *Paraburkholderia tropica* strain P-31 isolated from pomegranate (*Punica granatum*) rhizosphere. 2016. *Genome announcements* 4(4):e00844-16.

- Kierul K, Voigt B, Albrecht D, Chen XH, Carvalhais LC, Borriss R. Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. 2015. *Microbiology* 161(1):131-47.
- Kim CH, Han SH, Kim KY, Cho BH, Kim YH, Koo BS, Kim YC. Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. 2003. *Current microbiology* 47(6):457-461.
- Kim S, Lowman S, Hou G, Nowak J, Flinn B, Mei C. Growth promotion and colonization of switchgrass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. 2012. *Biotechnology for biofuels* 5(1):37.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. 2003. *Molecular microbiology* 48(6):1511-24.
- Kloepper JW, Schroth MN. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. 1978. In: *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria* 2:879-882.
- Kloepper JW y Schroth MN. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. 1981. *Phytopathol.* 71:642-4.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. 1989. *Trends in biotechnology* 7(2):39-44.
- Kloepper JW. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). 1994. *Azospirillum/plant associations*: 137-66.
- Kobayashi DY, Palumbo JD. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. 2000. *Microbial endophytes* 19:199-233.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. 2004. *Environmental Microbiology* 6(12):1244-51.
- Kurepin LV, Park JM, Lazarovits G, Hüner NP. Involvement of plant stress hormones in *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion. 2015. *Plant Growth Regulation* 77(2):179-87.
- Ladha JK, Barraquio WL, Revilla L. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. 1997. In: *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes* (pp. 15-24). Springer Netherlands.
- Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. 1998. *Journal of Bacteriology* 180(12):3187-96.
- Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. 2002. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8):3919-3924.
- Lifshitz R, Kloepper JW, Kozłowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM, Zaleska I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. 1987. *Canadian Journal of Microbiology* 33(5):390-5.
- Lim SH, So BH, Wang JC, Song ES, Park YJ, Lee BM, Kang HW. Functional analysis of *pilQ* gene in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, bacterial blight pathogen of rice. 2008. *The Journal of Microbiology* 46(2):214-20.
- Ling JM, Moore RA, Surette MG, Woods DE. The *mviN* homolog in *Burkholderia pseudomallei* is essential for viability and virulence. 2006. *Canadian journal of microbiology* 52(9):831-42.
- Liu X, Zhao H, Chen S. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. 2006. *Current microbiology* 52(3):186-90.
- Liu X, Bimerew M, Ma Y, Müller H, Ovadis M, Eberl L, Berg G, Chernin L. Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. 2007. *FEMS microbiology letters* 270(2):299-305.
- Lodeiro AR, Favelukes G. Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. 1999. *Soil Biology and Biochemistry* 31(10):1405-11.
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgeay M, der Lelie DV. Endophytic bacteria and their potential applications. 2002. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(6):583-606.

- Lovaisa NC, Guerrero Molina MF, Delaporte Quintana PG, Salazar SM. Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. 2015. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 35:33-6.
- Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. 2009. *Annual review of microbiology* 63:541-56.
- Luna MF, Mignone CF, Boiardi JL. The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. 2000. *Applied microbiology and biotechnology* 54(4):564-569.
- Luna MF, Bernardelli CE, Mignone CF, Boiardi JL. Energy generation by extracellular aldose oxidation in N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2002. *Applied and environmental microbiology* 68(4):2054-2056.
- Luna MF, Bernardelli CE, Galar ML, Boiardi JL. Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. 2006. *Current Microbiology* 52(3):163-8.
- Luna MF, Galar ML, Aprea J, Molinari ML, Boiardi JL. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2010. *Biotechnology letters* 32(8):1071-6.
- Luna MF, Aprea J, Crespo JM, Boiardi JL. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2012. *Applied soil ecology* 61:225-9.
- Ma W, Guinel FC, Glick BR. *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. 2003. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8):4396-402.
- Ma Q, Yang Z, Pu M, Peti W, Wood TK. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. 2011. *Environmental microbiology* 13(3):631-42.
- Mahenthalingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, Davidson AG, Wilcox PG, Nakielna B, Speert DP. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. 2001. *Clinical infectious diseases* 33(9):1469-75.
- Mahenthalingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. 2005. *Nature Reviews Microbiology* 3(2):144-56.
- Markmann K, Parniske M. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? 2009. *Trends in plant science* 14(2):77-86.
- Martínez-Aguilar L, Díaz R, Peña-Cabriales JJ, Estrada-De Los Santos P, Dunn MF, Caballero-Mellado J. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. 2008. *Applied and environmental microbiology* 74(14):4574-9.
- Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, Squartini AS, Haack SK, Martinez-Molina E, Hubbell DH, Dazzo FB. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. 1992. *Applied and environmental microbiology* 58(6):1816-22.
- Matsushita K, Ameyama M. D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. 1982. *Methods in Enzymology* 89: 149-154.
- Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M. D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate-yielding, membrane-bound. 1982. *Methods Enzymol* 89:187-193.
- Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M. Quinoprotein d-glucose dehydrogenases in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41: purification and characterization of the membrane-bound enzyme distinct from the soluble enzyme. 1989. In: *PQQ and Quinoproteins*: 69-78. Springer Netherlands.
- Matsushita K, Hirohide T, Osao A. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. 1994. *Advances in microbial physiology* 36:247-301.
- Matsushita K, Arents JC, Bader R, Yamada M, Adachi O, Postma PW. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). 1997. *Microbiology* 143(10):3149-3156.
- Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. 2002. *Annual Reviews in Microbiology* 56(1):289-314.
- Maupin-Furlow JA, Rosentel JK, Lee JH, Deppenmeier U, Gunsalus RP, Shanmugam KT. Genetic analysis of the modABCD (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. 1995. *Journal of bacteriology* 177(17):4851-6.

- McInroy JA, Kloepper JW. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. 1995. *Plant and soil* 173(2):337-42.
- McIntire WS. Quinoproteins. 1994. *The FASEB journal* 8(8):513-521.
- Meneses CH, Rouws LF, Simões-Araújo JL, Vidal MS, Baldani JI. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2011. *Molecular plant-microbe interactions* 24(12):1448-58.
- Mercado-Blanco J, Prieto P. Bacterial endophytes and root hairs. 2012. *Plant and Soil* 361(1):301-6.
- Meyer JB, Frapolli M, Keel , Maurhofer M. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene *pqqC*, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. 2011. *Applied and environmental microbiology* 77(20):7345-7354.
- Miché L, Balandreau J. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. 2001. *Applied and environmental microbiology* 67(7):3046-52.
- Mikanova O, Novakova J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. 2002. *Rostlinna vyroba* 48(9):397-400.
- Miller WG, Lindow SE. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene*. 1997 Jun 3;191(2):149-53.
- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 2001 Oct;55(1):165-99.
- Mitra S, Mukherjee A, Wiley-Kalil A, Das S, Owen H, Reddy PM, Ané JM, James EK, Gyaneshwar P. A rhamnase-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium sp.* IRBG74 is defective in root colonization and beneficial interactions with its flooding-tolerant hosts *Sesbania cannabina* and wetland rice. 2016. *Journal of Experimental Botany* 67(19):5869-84.
- Mitter B, Petric A, Shin MW, Chain PS, Hauberg-Lotte L, Reinhold-Hurek B, Nowak J, Sessitsch A. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. 2013. *Frontiers in plant science* 4:120.
- Mohite B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. 2013. *Journal of soil science and plant nutrition* 13(3):638-49.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. 2008. *Molecular plant-microbe interactions* 21(7):1001-9.
- Montesinos E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. 2003. *International Microbiology* 6(4):245-52.
- Morales VM, Martinez-Molina E, Hubbell DH. Cellulase production by *Rhizobium*. 1984. *Plant and Soil* 80(3):407-15.
- Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, Sauer K. BdIA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. 2006. *Journal of bacteriology* 188(21):7335-43.
- Nagorska K, Ostrowski A, Hinc K, Holland IB, Obuchowski M. Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. 2010. *Journal of applied genetics* 51(3):369-81.
- Nasser W, Robert-Baudouy J, Reverchon S. Antagonistic effect of CRP and KdgR in the transcription control of the *Erwinia chrysanthemi* pectinolysis genes. 1997. *Molecular microbiology* 26(5):1071-82.
- Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. 1999. *FEMS microbiology Letters* 170(1):265-70.
- Naveed M, Sohail Y, Khalid N, Ahmed I, Mumtaz AS. Evaluation of glucose dehydrogenase and pyrroloquinoline quinone (pqq) mutagenesis that renders functional inadequacies in host plants. 2015. *J. Microbiol. Biotechnol* 25(8):1349-1360.
- Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. 1944. *J. biol. Chem.* 153(2):375-80.
- Nelson LM. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. 2004. *Crop Management* 3(1).

- Newman KL, Chatterjee S, Ho KA, Lindow SE. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. 2008. *Molecular plant-microbe interactions* 21(3):326-34.
- Normand P, Lapiere P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisne N, Couloux A. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. 2007. *Genome Research* 17(1):7-15.
- Okon Y, Albrecht SL, Burris RH. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. 1977. *Applied and Environmental Microbiology* 33(1):85-8.
- Okon Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. 1985. *Trends in Biotechnology* 3(9):223-8.
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. 1994. *Soil Biology and Biochemistry* 26(12):1591-601.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. 2012. *Bioinformatics* 28(8):1166-7.
- Oku S, Komatsu A, Tajima T, Nakashimada Y, Kato J. Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. 2012. *Microbes and environments* 27(4):462-9.
- Olivares FL. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. 1997. Ecologia. Tese de Doctor em Agronomia. UFRRJ.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J. Biological nitrogen fixation in the context of global change. 2013. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(5):486-94.
- Oliveira AL, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JJ, Hartmann A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. 2009. *European journal of soil biology* 45(1):106-13.
- Omarjee J, Balandreau J, Spaul VW, Cadet P. Relationships between *Burkholderia* populations and plant parasitic nematodes in sugarcane. 2008. *Applied soil ecology* 39(1):1-14.
- Oosthuizen MC, Steyn B, Theron J, Cosette P, Lindsay D, Von Holy A, Brözel VS. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. 2002. *Applied and Environmental Microbiology* 68(6):2770-80.
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. 1998. *Molecular microbiology* 28(3):449-61.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. 2000. *Annual Reviews in Microbiology* 54(1):49-79.
- O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. 2011. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 30(47):e2437-.
- Palmer RJ, Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. 1999. *Current opinion in biotechnology* 10(3):263-8.
- Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TG, Yeoh YK, Webb RI, Lakshmanan P, Chan CX, Hugenholtz P. A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. 2014. *Microbial biotechnology* 7(2):142-154.
- Pawelek PD, Croteau N, Ng-Thow-Hing C, Khursigara CM, Moiseeva N, Allaire M, Coulton JW. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. 2006. *Science* 312(5778):1399-402.
- Pedraza RO, Motok J, Salazar SM, Ragout AL, Mentel MI, Tortora ML, Guerrero-Molina MF, Winik BC, Díaz-Ricci JC. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. 2010. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(2):265-72.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. 2008. *Journal of microbiological methods* 72(2):157-65.
- Perin L, Martinez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Baldani JJ, Estrada-De Los Santos P, Reis VM, Caballero-Mellado J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. 2006. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56(8):1931-7.

- Perticari JC, Pacheco Basurco G, Benintende. Interacción entre diferentes inoculantes y temperaturas de almacenamiento sobre semilla preinoculada de soja. 1994. Reunión Latinoamericana de Rizobiología- La Habana, Cuba.
- Pham PL, Dupont I, Roy D, Lapointe G, Cerning J. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. 2000. Applied and environmental microbiology 66(6):2302-10.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van Der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. 2013. Nature Reviews Microbiology 11(11):789-99.
- Phillips DA, Fox TC, King MD, Bhuvaneswari TV, Teuber LR. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. 2004. Plant physiology 136(1):2887-94.
- Podile AR, Kishore GK. Plant growth-promoting rhizobacteria. 2007. In: Plant-associated bacteria (pp. 195-230). Springer Netherlands.
- Poole RK, Hill S. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*: roles of the terminal oxidases. 1997. Bioscience reports 17(3):303-17.
- Postgate, J. R. The Fundamentals of Nitrogen Fixation. 1982. New York, NY: Cambridge University Press.
- Poza-Carrión C, Jiménez-Vicente E, Navarro-Rodríguez M, Echavarrri-Erasun C, Rubio LM. Kinetics of *nif* gene expression in a nitrogen-fixing bacterium. 2014. Journal of bacteriology 196(3):595-603.
- Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. 1998. Molecular microbiology 30(2):285-93.
- Preston GM, Bertrand N, Rainey PB. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. 2001. Molecular microbiology 41(5):999-1014.
- Prieto P, Schilirò E, Maldonado-González MM, Valderrama R, Barroso-Albarracín JB, Mercado-Blanco J. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. 2011. Microbial ecology 62(2):435-45.
- Prieto C, Serra DO, Martina P, Jacobs M, Bosch A, Yantorno OM. Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. 2013. Veterinary microbiology 166(3):504-15.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. Biofilm formation in plant-microbe associations. 2004. Current opinion in microbiology 7(6):602-9.
- Reddy CA, Saravanan RS. Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. 2013. Adv Appl Microbiol 82:53-113.
- Rediers H, Bonnacerrere V, Rainey PB, Hamonts K, Vanderleyden J, De Mot R. Development and application of a *dapB*-based in vivo expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. 2003. Applied and environmental microbiology 69(11):6864-74.
- Reik R, Spilker T, LiPuma JJ. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. 2005. Journal of clinical microbiology 43(6):2926-8.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K, De Ley J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. 1993. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 43(3):574-84.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. 1998. Trends in microbiology 6(4):139-44.
- Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. 2006. Molecular plant-microbe interactions 19(2):181-8.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. 2011. Current opinion in plant biology 14(4):435-43.
- Reis VM, Estrada-De Los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VL, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. 2004. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(6):2155-62.

- Reis VM, Olivares FL. Vias de Penetração e Infecção de Plant as por Bactérias. 2006. EMBRAPA. Documentos 216.
- Rivera D, Obando M, Barbosa H, Rojas Tapias D, Bonilla Buitrago R. Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the *Rhizobium*-Cowpea interaction. 2014. Universitas Scientiarum 19(3):265-75.
- Rodriguez Cáceres E, Di Ciocco CA. Factores que condicionan la respuesta de trigo a la inoculación con *Azospirillum brasilense* Az39 INTA en la pradera pampeana. 2003. Revista de Ciencia y Tecnología 8:9-16.
- Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. 1999. Biotechnology advances 17(4):319-339.
- Rodríguez H, Gonzalez T, Selman G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. 2000. J Biotechnol 84:155-161.
- Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. 2007. En: First international meeting on microbial phosphate solubilization (pp. 15-21). Springer Netherlands.
- Rojas-Tapias D, Ortiz-Vera M, Rivera D, Kloepper J, Bonilla R. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. 2013. Universitas Scientiarum 18(2):129-39.
- Rojas-Tapias D, Ortega Sierra O, Rivera Botia D, Bonilla R. Preservation of *Azotobacter chroococcum* vegetative cells in dry polymers. 2015. Universitas Scientiarum 20(2):201-7.
- Romero-Perdomo FA, Moreno-Galván A, Camelo-Rusínque M, Bonilla R. Efecto de la carragenina sobre *Azotobacter chroococcum* en semillas de algodón peletizadas con un fungicida. 2015. Revista agronómica del noroeste argentino 35(1):29-32.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. 2006. Molecular plant-microbe interactions 19(8):827-37.
- Rouws LF, Meneses CH, Guedes HV, Vidal MS, Baldani JJ, Schwab S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. 2010. Letters in applied microbiology 51(3):325-30.
- Roy MD, Sarker K, Ghosh PP, Dutta S. Use of microbial inoculants in resilient agriculture: prospects and limitations. 2015. SATSA Mukhaptra Annual Technical Issue 19:88-96.
- Rudrappa T, Quinn WJ, Stanley-Wall NR, Bais HP. A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. 2007. Planta 226(2):283-97.
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP. Causes and consequences of plant-associated biofilms. 2008. FEMS microbiology ecology 64(2):153-66.
- Ruppel S, Rühlmann J, Merbach W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. 2006. Plant and soil 286(1):21-35.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. 2008. FEMS microbiology letters 278(1):1-9.
- Ryu D, Mandels M. Cellulases: Biosynthesis and applications. 1980. Enzyme and Microbial Technology 2: 91-102.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. 2004. Plant physiology 134(3):1017-26.
- Safo-Sampah S, Torrey JG. Polysaccharide-hydrolyzing enzymes of *Frankia* (Actinomycetales). 1988. Plant and Soil 112(1):89-97.
- Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. 1993. Advances in applied microbiology 39:213-94.
- Salema MP, Parker CA, Kidby DK, Chatel DL. Death of rhizobia on inoculated seed. Soil Biology and Biochemistry. 1982 Jan 1;14(1):13-4.
- Samad MYA, Razak CNA, Salleh AB, Yunus WMZW, Ampon K, Basri M. A plate assay for primary screening of lipase activity. 1989. Journal of Microbiological Methods 9:51-56.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989. Cold spring harbor laboratory press.
- Sanghi R, Singh V. Green chemistry for environmental remediation. 2012. John Wiley & Sons.
- Sashidhar B, Podile AR. Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of Sorghum seedlings. 2009. Microbial Biotechnology 2(4): 521-529.
- Sashidhar B, Inampudi KK, Guruprasad L, Kondreddy A, Gopinath K, Podile AR. Highly conserved Asp-204 and Gly-776 are important for activity of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* and for mineral phosphate solubilization. 2010. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 18(2): 109-119.
- Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. 2003. Genome biology 4(6):219.
- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. 2014. Frontiers in genetics 5:429.
- Scharf BE, Hynes MF, Alexandre GM. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. 2016. Plant molecular biology 90(6):549-59.
- Schenk ST, Stein E, Kogel KH, Schikora A. Arabidopsis growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. 2012. Plant signaling & behavior 7(2):178-81.
- Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. 2016. Journal of microbiological methods.
- Schrey SD, Hartmann A, Hampp R. Rhizosphere Interactions. 2015. Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions 292-311.
- Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. 2005. Mycological research 109(6):661-686.
- Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. 2006. International journal of medical microbiology 296(2):73-81.
- Selvamukilan B, Rengalakshmi R, Tamizoli P, Nair S. Village-level production and use of biocontrol agents and biofertilizers. 2006. In: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems: 647-653. CRC Press.
- Serrato RV, Sasaki GL, Cruz LM, Pedrosa FO, Gorin PA, Iacomini M. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. 2006. Canadian journal of microbiology 52(5):489-93.
- Serrato RV, Sasaki GL, Gorin PA, Cruz LM, Pedrosa FO, Choudhury B, Carlson RW, Iacomini M. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. 2008. Carbohydrate polymers 73(4):564-72.
- Sessitsch A, Hardarson G, De Vos WM, Wilson KJ. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. 1998. In: Molecular Microbial Ecology of the Soil (pp. 35-45). Springer Netherlands.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsland JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, Wang-Pruski G. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. 2005. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(3):1187-92.
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N_2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. 2001. Molecular Plant-Microbe Interactions 14(3):358-66.
- Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A, Luna V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. 2009. Applied microbiology and Biotechnology 85(2):371-81.
- Shaikh SS, Patel PR, Patel SS, Nikam SD, Rane TU, Sayyed RZ. Production of biocontrol traits by banana field fluorescent *Pseudomonads* and comparison with chemical fungicide. 2014. Indian journal of experimental biology 52(9):917.
- Shamseldin A. The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation. Review. 2013. Glob J Biotechnol Biochem. 8:84-94.
- Sharpley AN, Smith SJ, Stewart BA, Mathers AC. Forms of phosphorus in soil receiving cattle feedlot waste. 1984. Journal of Environmental Quality 13(2):211-215.

- Sheu SY, Chou JH, Bontemps C, Elliott GN, Gross E, dos Reis Junior FB, Melkonian R, Moulin L, James EK, Sprent JI, Young JP. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. 2013. International journal of systematic and evolutionary microbiology 63(2):435-41.
- Shishido M, Chanway CP. Colonization and growth promotion of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. 2000. Canadian journal of forest research 30(6):845-54.
- Showalter AM. Structure and function of plant cell wall proteins. 1993. The Plant Cell, 5: 9-23.
- Simons M, Van Der Bij AJ, Brand I, De Weger LA, Wijffelman CA, Lugtenberg BJ. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. 1996. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions 9(7):600-7.
- Singh HB, Sarma BK, Keswani C, editors. Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia. 2016. Springer.
- Singleton P, Keyser H, Sande E. Development and evaluation of liquid inoculants. Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. 2002. ACIAR, Canberra. (p:52-66).
- Smith CJ. Carbohydrate chemistry. 1993. En Lea, P. J. y Leegood, R. C. (eds.). Plant Biochemistry and Molecular Biology. Inglaterra: John Wiley and Sons, Ltd.: 74-111.
- Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. 2003. Current opinion in microbiology 6(1):56-60.
- Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. 2002. Molecular microbiology 43(3):793-808.
- Somogyi M. Notes on sugar determination. 1952. Journal of biological chemistry 195:19-23.
- Sourjik V, Sterr W, Platzer J, Bos I, Haslbeck M, Schmitt R. Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. 1998. Gene 223(1):283-90.
- Souza RD, Ambrosini A, Passaglia LM. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. 2015. Genetics and molecular biology 38(4):401-19.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. 2007. FEMS microbiology reviews 31(4):425-48.
- Sprent J. Legume nodulation. 2009. John Wiley & Sons.
- Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, Martinez-Drets G, Döbereiner J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. 1991. FEMS Microbiol. Lett 77:67-72.
- Stephens JH, Rask HM. Inoculant production and formulation. 2000. Field Crops Research 65(2):249-58.
- Stockwell VO, Stack JP. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. 2007. Phytopathology 97(2):244-9.
- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. 1997. Biology and Fertility of Soils 25(1):13-9.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. 2012. Microbial Ecology 63(2):249-66.
- Suarez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Venturi V. The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. 2008. Microbiology 154(7):2048-59.
- Sun Y, Cheng Z, Glick BR. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. 2009. FEMS microbiology letters 296(1):131-6.
- Swanson KM, Petran RL, Hanlin JH. Culture methods for enumeration of microorganisms. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 53-67.
- Taulé C, Castillo A, Villar S, Olivares F, Battistoni F. Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. 2016. Plant and Soil 403(1-2):403-18.

- Taulé C. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. 2011. Tesis de Maestría. PEDECIBA Biología, Subárea Microbiología.
- Taurian T, Anzuay MS, Angelini JG, Tonelli ML, Ludueña L, Pena D, Ibáñez F, Fabra A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. 2010. *Plant and Soil* 329(1-2):421-31.
- Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. 1982. *Applied and environmental microbiology* 43(4):777-80.
- Tenorio-Salgado S, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R, Caballero-Mellado J, Perez-Rueda E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. 2013. *Bioengineered* 4(4):236-43.
- Tenuta M. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Prospect for increasing nutrient acquisition and disease control. 2006. Department of Soil Science, University of Manitoba.
- Thomas P, Sekhar AC. Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. 2014. *AoB Plants* 6:plu002.
- Thompson KM, Gottesman S. The MiaA tRNA modification enzyme is necessary for robust RpoS expression in *Escherichia coli*. 2014. *Journal of bacteriology* 196(4):754-61.
- Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EG. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. 2005. *Applied and environmental microbiology* 71(11):7292-300.
- Tindall BJ, Rosselló-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. 2010. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(1):249-66.
- Tittabutr P, Payakapong W, Teaumroong N, Singleton PW, Boonkerd N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. 2007. *Science Asia* 33(1):69-77.
- Toesca JJ, French CT, Miller JF. The Type VI secretion system spike protein VgrG5 mediates membrane fusion during intercellular spread by pseudomallei group *Burkholderia* species. 2014. *Infection and immunity* 82(4):1436-44.
- Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. 2003. *Microbiology* 149(12):3473-84.
- Tombolini R, Jansson JK. Monitoring of GFP-tagged bacterial cells. 1998. *Bioluminescence methods and protocols*: 285-98.
- Tripura C, Reddy PS, Reddy MK, Sashidhar B, Podile AR. Glucose dehydrogenase of a rhizobacterial strain of *Enterobacter asburiae* involved in mineral phosphate solubilization shares properties and sequence homology with other members of enterobacteriaceae. 2007. *Indian journal of microbiology* 47(2):126-131.
- Turnbull GA, Morgan JA, Whipps JM, Saunders JR. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonisation of wheat roots. 2001. *FEMS microbiology ecology* 36(1):21-31.
- Ulland TK, Buchan BW, Ketterer MR, Fernandes-Alnemri T, Meyerholz DK, Apicella MA, Alnemri ES, Jones BD, Nauseef WM, Sutterwala FS. Cutting edge: mutation of *Francisella tularensis mviN* leads to increased macrophage absent in melanoma 2 inflammasome activation and a loss of virulence. 2010. *The Journal of Immunology* 185(5):2670-4.
- Van de Broek A, Lambrecht M, Vanderleyden J. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. 1998. *Microbiology* 144(9):2599-606.
- van Rhijn P, Vanderleyden J. The Rhizobium-plant symbiosis. 1995. *Microbiological reviews* 59(1):124-142.
- Van Schie BJ, De Mooy OH, Linton JD, Van Dijken JP, Kuenen JG. PQQ-dependent production of gluconic acid by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. 1987. *Microbiology* 133(4):867-875.
- Van Schie BJ, Van Dijken JP, Kuenen JG. Non-coordinated synthesis of glucose dehydrogenase and its prosthetic group PQQ in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. 1984. *FEMS microbiology letters* 24(1):133-138.
- Vance CP. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. 2001. *Plant physiology* 127(2):390-7.
- Vandamme P, Goris J, Chen WM, De Vos P, Willems A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. 2002. *Systematic and Applied Microbiology* 25(4):507-12.

- Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR. Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. 1997. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47(4):1188-200.
- Velterop JS, Sellink E, Meulenbergh JJ, David S, Bulder I, Postma PW. Synthesis of pyrroloquinoline quinone *in vivo* and *in vitro* and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway. 1995. *Journal of bacteriology* 177(17):5088-98.
- Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. 2003. *Plant and soil* 255(2):571-86.
- Viallard V, Poirier I, Cournoyer B, Haurat J, Wiebkin S, Ophel-Keller K, Balandreau J. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of *Pseudomonas phenazinum*, *Pseudomonas pyrrocinia* and *Pseudomonas glathei* as *Burkholderia*. 1998. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48(2):549-63.
- Videira SS. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. 2007. EMBRAPA, Documentos 234.
- Vílchez JI, Navas A, González-López J, Arcos SC, Manzanera M. Biosafety Test for Plant Growth-Promoting Bacteria: Proposed Environmental and Human Safety Index (EHSI) Protocol. 2015. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Wagh J, Shah S, Bhandari P, Archana G, Kumar GN. Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. 2014. *Applied microbiology and biotechnology* 98(11):5117-29.
- Wagner SC. Biological nitrogen fixation. 2012. *Nature Education Knowledge* 3(10):15.
- Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. 2004. *Plant physiology* 134(1):320-31.
- Walsh GA, Murphy RA, Killeen GF, Headon DR, Power RF. Technical note: detection and quantification of supplemental fungal beta-glucanase activity in animal feed. 1995. *J Anim Sci*, 73: 1074-1076.
- Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. 2005. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(5):385-96.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. 2000. *Journal of bacteriology* 182(10):2675-9.
- Webster G, Jain V, Davey MR, Gough C, Vasse J, Denarie J, Cocking EC. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. 1998. *Plant, Cell & Environment* 21(4):373-83.
- Weir BS. The current taxonomy of rhizobia. 2012. NZ Rhizobia website.
- Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. 2001. *Journal of experimental Botany* 52(1):487-511.
- Wilson JW, Ott CM, Zu Bentrup KH, Ramamurthy R, Quick L, Porwollik S, Cheng P, McClelland M, Tsaprailis G, Radabaugh T, Hunt A. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(41):16299-304.
- Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans AD, Jefferson RA. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. 1995. *Microbiology* 141(7):1691-705.
- Wong-Villarreal A, Caballero-Mellado J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. 2010. *Systematic and applied microbiology* 33(1):35-43.
- Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. 2005. *Annals of botany* 95(5):707-35.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. 1992. *Microbiology and immunology* 36(12):1251-75.
- Yamada MA, Asaoka S, Saier MH, Yamada Y. Characterization of the *gcd* gene from *Escherichia coli* K-12 W3110 and regulation of its expression. 1993. *Journal of bacteriology* 175(2):568-71.
- Yamazaki IM, Geraldo LP. Uranium content in phosphate fertilizers commercially produced in Brazil. 2003. *Applied Radiation and Isotopes* 59(2):133-6.

- Yan JK, Li L, Wang ZM, Leung PH, Wang WQ, Wu JY. Acidic degradation and enhanced antioxidant activities of exopolysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelial culture. 2009. Food Chemistry 117(4):641-6.
- Yanni YG, Rizk RY, Corich V, Squartini A, Ninke K, Philip-Hollingsworth S, Orgambide G, De Bruijn F, Stoltzfus J, Buckley D, Schmidt TM. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. 1997. Plant and Soil 194(1-2):99-114.
- Zachow C, Jahanshah G, de Bruijn I, Song C, Ianni F, Pataj Z, Gerhardt H, Pianet I, Lämmerhofer M, Berg G, Gross H. The novel lipopeptide poaeamide of the endophyte *Pseudomonas poae* RE* 1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization. 2015. Molecular Plant-Microbe Interactions 28(7):800-10.
- Zago, MS, Iglesias MC, Leconte MC, López J. Inoculación y co-inoculación en cultivo de sorgo. Comunicaciones científicas y tecnológicas 2006. Resumen: A-042. Universidad Nacional del Nordeste.
- Zamora MS, Carrasco N. Sorgo: efecto combinado de inoculación con microorganismos PGPR y fertilización nitrogenada. Artículo de divulgación. 2014. Chacra Experimental Integrada Barrow. Convenio MAA - INTA.
- Zarra I, Revilla G. La pared celular. Estructura y función. 1993. En Azcon-Bieto, J. (ed.). Fisiología y bioquímica vegetal. España: McGraw-Hill Interamericana de España, p: 1-24.
- Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, Kurane R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. 2000. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50(2):743-9.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmariski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. 2002. Applied and environmental microbiology 68(5):2198-208.
- Zúñiga A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guiliani N, Gutiérrez RA, González B. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. 2013. Molecular Plant-Microbe Interactions 26(5):546-53.