

Tesis Doctoral

# Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables

Ibarra, Jose Gervasio

2017-03-22

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ibarra, Jose Gervasio. (2017-03-22). Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ibarra, Jose Gervasio. "Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-22.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **“Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Lic. Jose Gervasio Ibarra**

Director de Tesis: Dra. Nancy I. López

Consejero de estudios: Dra. María Julia Pettinari

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana,  
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa, 22/03/2017

## Agradecimientos:

Al departamento de Química biológica e IQUBICEN, al Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Microbianas del Dpto. de Química Biológica por brindarme el lugar para hacer esta tesis. En especial a quienes dirigen el laboratorio, Beatriz, Julia y Nancy.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, que me brindó educación con docentes de excelencia. A CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción científica y Tecnológica por haber hecho posible mi dedicación exclusiva a este proyecto.

Quiero dedicar un párrafo aparte a mi directora, a Nancy. Gracias por aceptarme en este grupo de trabajo y por la dirección de esta tesis. En particular por ser la única que siempre creyó que esto iba a terminar en una tesis! Gracias por la gran ayuda en estos últimos meses para el armado, escritura y corrección del manuscrito.

Y por lo que considero más importante, su calidez humana, es prioridad en el laboratorio las necesidades personales a las cuestiones laborales y eso es algo que valoro mucho.

A Alicia Godeas, por haber generado el contacto con Rizobacter. Por haber sido parte del proyecto FONARSEC que financio esta tesis los primeros 3 años, y haber sido parte fundamental del proyecto. Gracias por haber puesto el hombro, por pelear para que nos den siempre algo más.

A Gustavo Gonzales Anta, por la colaboración que nos brindó durante los primeros años de esta tesis, por haber aportado las semillas y los suelos.

A Caro Rothen, quien fue la que pensó en nosotros cuando se presentó la posibilidad de esta beca. Al recordar ese momento, cuando nos sentamos con Alicia en las mesitas del cuarto piso para ver que podíamos hacer me doy cuenta, querida Caroline, todo el tiempo que paso. La vida nos pasó por arriba dos o tres veces en este tiempo. Muchos años, muchos cambios. Gracias.

A mis queridísimos y nunca bien ponderados compañeros del labo, como se los llama de manera general.

De manera particular se los llama: Esmé, Gabi, Flor, Pau, Rocio, Lau, Diego, Dani, Manu, Marie!

No puedo dejar de mencionar a los Old micro, los que estaban cuando comencé en este laboratorio hace ya muchos años. Marie C, Aleli, Gonzalo, Pablo, Jimena, Carlita (No sé dónde ponerle Carla)

Quiénes hacen e hicieron de este laboratorio algo especial. Es por todos los que pasan sus días acá que este lugar es agradable. Es realmente un placer compartir todos los días con ustedes. Extiendo este agradecimiento a todos los que forman el área de micro. Los Ruzzal (Sandra, Marian, Mer, Joaqui, Pablo). Los Piuri (Mariana, Mariano, Euge, Estefi, Lacho, Jordi) con todos ellos los días son mejores, las penas más suaves, los resultados menos negativos, las meriendas un evento y los almuerzos un amontonamiento.

A los chicos de bedelía, Eva, Pato, Emi, Diego, que hacen una tarea fundamental para el funcionamiento del QB.

Que sea agradable el lugar de trabajo es algo que hay que destacar. Que no haya competencia que no haya malas intenciones, que la ayuda, la colaboración, la predisposición a cambiar un horario, prestar un reactivo o un hombro sea cotidiano es invaluable muchachos. Disfrútenlo como lo hago yo y sigan haciéndolo, porque es de ustedes, no del lugar!

Paula, mereces un agradecimiento particular. Mi compañera en el laboratorio, una amiga, una gran científica, siempre dispuesta a aportar ideas y con muchas ideas. La disposición la tienen muchos, pero las ideas....

Pensás en Paula y pensás en Martiniano, obvio. Gracias Martiniano, si hiciese un resumen de las veces que me diste una mano, esto se haría muy largo (y ya pinta que corto, no va a ser). Gracias todas esas veces!

Marie, una gran persona. Si la mitad de la gente diese tan pocas vueltas y fuese tan franca como vos, el mundo sería tanto más sencillo. A Manu, en particular al Manu de los últimos años, al que tuve que aprender a querer, e hice bien en hacer el esfuerzo!! A Carlita, como se te extraña wacha. Hay un vacío en tu lugar (y por vacío no me refiero a una cuba de TLC, un vortex desarmado, una pila de papeles, más papeles y alguna química). Esmé, no sé porque le tengo un cariño particular a esta chiquita. Gracias por la ayuda de estos días (solo por mencionar algo, hay mil cosas que agradecerle)

Lau, muchísimas gracias por las ideas y los consejos de como presentar resultados. La vida no es tan complicada, Disfrutala! Gaby, alto personaje amiga! veo tantas cosas en vos que perdí al alejarme del pibe de pueblo...

Diego/Ro, Ro/Diego la dupla más inesperada del laboratorio! Salgan del GC un rato y vengán a ver la tesis! Dani, Que bueno que hayas entrado al labo, eso es lo que primero me sale al pensar en vos!! Técnicamente esto sería un agradecimiento a Julia pero bueno...

Jime vos vas acá, sin dudas. En esta transición de labo a no labo..

Gracias por las charlas, charlas que persisten en el tiempo flotando durante meses. Esas de las que no salís igual, cuando arrancan el amarillo es naranja, después amarillo y después NADA. El otro está sentado en frente, luego sos vos porque es tu reflejo en él...

A los de Pelotazo. Son muchos así que no los voy a nombrar a cada uno. Son muchos y sorprende, porque son un gran grupo de personas. Gracias por todo, pero principalmente porque con ustedes aprendí a respetar y aceptar las diferencias.

A Diego, Pela, Juli y Mer. Ustedes loco...Fueron muy importantes estos dos últimos años. Gracias!!!

Nicolás o como me gusta llamarlo, mi amigo el pelado.Espero que la próxima década nos encuentre acodados en la misma barra, en veredas opuestas. En cual...no importa!

Aure. Que importante fue tu manera de ver el mundo en los primeros años de esto, me ayudó mucho a acomodar cosas que se contradecían. Gracias por tu gran generosidad

A los del Quitapena, Nelsiton, Lucas, Guille, Ceci. Qué gran experiencia, espero dure mucho y podamos disfrutar más seguido.

Nico U. y Mery. Dos personas increíbles, de increíble generosidad. Que se preocupan por los demás y dan todo lo que pueden para ayudar.

Nico R. Gracias por la ayuda en los análisis....vaahh basta de chahchara eso es lo que tiene que hacer un amigo!! Gracias por abrir las puertas de tu mundo.

A Guille, El gran Guille Risso. Una Gran persona, con visión holística de la vida. A quien todos los que lo conocen agradecen por haberlo conocido... ni una pavada!

Ceci, buen ancla que ando arrastrando!! Pero que falta hace un buen ancla para aguantar el temporal! Gracias, sos una persona hermosa.

A mi familia.

Somos muchos, pero nos faltan muchos, esto va sin nombres.

Cundo pienso en mi familia, pienso en Newton, en que somos del lugar donde pasamos nuestra infancia, como decía Atahualpa somos tierra que anda. Ustedes son la tierra donde crecí.

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>5</b>
PANORAMA GENERAL DE LA AGRICULTURA EN ARGENTINA .....	5
EL AMBIENTE RIZOSFERICO Y LOS MICROORGANISMOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	10
LAS PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS .....	11
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA A ESTUDIAR Y OBJETIVOS .....	12
<b>CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<i>Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)</i> .....	14
<i>Biofertilización</i> .....	15
<i>Incremento en la disponibilidad de fósforo (P)</i> .....	16
<i>Fitoestimulación</i> .....	17
<i>Resistencia sistémica inducida (ISR)</i> .....	17
<i>Biocontrol</i> .....	17
<i>Características relacionadas con la supervivencia bacteriana de relevancia para el desempeño exitoso de PGPR</i> .....	18
<i>Generalidades del género Pseudomonas</i> .....	19
<i>Pseudomonas extremaustralis como modelo de estudio</i> .....	20
<i>Objetivos específicos del capítulo 1:</i> .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<i>Cepas bacterianas</i> .....	24
<i>Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal a partir de suelos con distintos regímenes de lluvia</i> .....	24
<i>Actividad de movilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos</i> .....	25
<i>Solubilización de fosfato en medio líquido</i> .....	25
<i>Determinación de ácidos orgánicos</i> .....	25
<i>Determinación de fósforo en sobrenadantes de cultivos bacterianos</i> .....	25
<i>Determinación de fósforo en tejidos vegetales</i> .....	26
<i>Medición de ácido indol acético (AIA)</i> .....	26
<i>Producción de pioverdinas</i> .....	27
<i>Material vegetal utilizado</i> .....	27
<i>Preparación de exudados radiculares</i> .....	27
<i>Ensayos de quimiotaxis</i> .....	28
<i>Desarrollo de raíces de Arabidopsis thaliana</i> .....	28

<i>Experimentos de colonización en tubo</i> .....	28
<i>Experimentos de colonización en maceta</i> .....	29
<i>Determinación del contenido de clorofila</i> .....	29
<i>Análisis bioinformáticos y estadísticos</i> .....	29
<i>Medios de cultivo utilizados.</i> .....	30

**RESULTADOS PARTE 1: AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL A PARTIR DE SUELOS CON DISTINTOS REGÍMENES DE LLUVIA.....33**

<i>Objetivos específicos</i> .....	33
<i>Aislamientos bacterianos</i> .....	34
<i>Bacterias productoras de ácido indol-acético:</i> .....	35
<i>Cultivo de plantas en presencia de los aislamientos productores de AIA.</i> .....	36
<i>Solubilización de <math>Ca_3O_8P_2</math>:</i> .....	38
<i>Cultivo de plantas en presencia de los aislamientos solubilizadores de fosfato:</i> .....	39

**RESULTADOS PARTE 2: ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE *PSEUDOMONAS EXTREMAUSTRALIS*..41**

<i>Objetivos específicos</i> .....	41
<i>Búsqueda de genes relacionados con la promoción de crecimiento vegetal en el genoma de <i>P. extremaustralis</i>.</i> .....	42
<i>Análisis de la funcionalidad de los genes encontrados</i> .....	48
<i>Solubilización de distintas fuentes de fósforo en medio sólido</i> .....	48
<i>Cuantificación de la solubilización de fosfato tricálcico en medio sólido.</i> .....	49
<i>Solubilización de fosfato y producción de ácidos orgánicos en medio NBRIP líquido.</i> 51	
<i>Solubilización de fosfato tricálcico de <i>P. extremaustralis</i> y su mutante en la síntesis de PHB.</i> .....	53
<i>Mineralización de fosfato orgánico: utilización de fitato sodio</i> .....	56
<i>Producción de ácido indol acético, AIA:</i> .....	57
<i>Determinación de la capacidad de crecimiento en ACC</i> .....	57
<i>Análisis de la capacidad de producción de pioverdinas</i> .....	58
<i>Producción de PVD en diferentes condiciones de cultivo</i> .....	62
<i>Comprobación de la interacción de <i>P. extremaustralis</i> con la planta</i> .....	63
<i>Comprobación de la asociación de <i>P. extremaustralis</i> con raíces</i> .....	65
<i>Desarrollo radicular de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</i> .....	66
<i>Efecto de <i>P. extremaustralis</i> en el crecimiento de plantas de trigo</i> .....	68

**DISCUSIÓN.....75**

<i>Análisis de bacterias aisladas de suelos con distintos regímenes hídricos y de <i>P. extremaustralis</i> como potenciales promotores del crecimiento vegetal.</i> .....	75
--	----

**CAPITULO 2: INFLUENCIA DE PLANTAS GM SOBRE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL SUELO.....86**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	86
<i>Plantas genéticamente modificadas y su efecto en la microbiología del suelo.</i> 88	



<i>Plantas Hahb-4</i> .....	89
<i>Producción de maíz en Argentina</i> .....	90
<i>Análisis de la diversidad de la comunidad bacteriana</i> .....	90
<i>Objetivos</i> .....	92
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>93</b>
<i>Material vegetal y suelos utilizados</i> .....	93
<i>Capacidad de campo de los suelos utilizados</i> .....	94
<i>Ensayos en cámara de cultivo</i> .....	94
<i>Determinación de parámetros relacionados con el crecimiento vegetal</i> .....	95
<i>Toma de muestras de suelo</i> .....	95
<i>Extracción de DNA</i> .....	95
<i>Secuenciación de amplicones del gen 16s rRNA</i> .....	95
<i>Análisis bioinformáticos</i> .....	96
<i>Esquema del diseño experimental</i> .....	97
<b>RESULTADOS CAPITULO 2</b> .....	<b>99</b>
<i>Suelos</i> .....	99
<i>Crecimiento de las plantas Hahb4</i> .....	99
<i>Secuenciación de amplicones del gen que codifica el 16S rRNA.</i> .....	101
<i>Curva de Rarefacción</i> .....	103
<i>Biodiversidad</i> .....	103
<i>Calculo de índices ecológicos para el estudio de la diversidad Alfa.</i> .....	103
<i>Análisis de la Composición de las comunidades</i> .....	105
<i>Comparación a nivel de Phylum de ambos suelos</i> .....	106
<i>Índices de <math>\beta</math> diversidad</i> .....	107
<i>PCoA para el suelo de Río Cuarto</i> .....	109
<i>Beta diversidad suelo de Inés Indart.</i> .....	112
<i>PCoA para el suelo de Inés Indart</i> .....	113
<i>Análisis a nivel de Género</i> .....	117
<i>Géneros afectados por humedad</i> .....	119
<i>Géneros afectados por tipo de planta</i> .....	121
<i>Distribución de Géneros por abundancia relativa</i> .....	123
<b>DISCUSIÓN CAPITULO 2</b> .....	<b>125</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>130</b>
ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	130
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> .....	130
<i>Aislamientos bacterianos</i> .....	130
INFLUENCIA DE PLANTAS GM SOBRE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL SUELO... ..	131
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>132</b>

## RESUMEN

El desarrollo de estrategias para incrementar la producción agrícola es de relevancia debido a la importancia de los vegetales en la alimentación humana. Entre estas estrategias se incluyen la expansión de la frontera agrícola a zonas menos aptas, como los ambientes fríos o áridos, pero es necesario que las plantas puedan resistir y prosperar en esas condiciones. El uso de cultivos transgénicos resistentes a la sequía constituye una buena alternativa que puede ser mejorada con el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), que puedan desarrollarse en condiciones de estrés, manteniendo sus actividades. El objetivo de este trabajo consistió en el análisis de cepas bacterianas aisladas de suelos, con diferentes regímenes hídricos, y de *Pseudomonas extremaustralis*, procedente de un ambiente extremo, en cuanto a su potencialidad para ser utilizadas como promotoras de crecimiento vegetal. Además se analizó la influencia de cultivos de maíz genéticamente modificados (GM) resistentes a la sequía sobre la composición de las comunidades bacterianas del suelo por técnicas secuenciación masiva.

Las características de PGP en *P. extremaustralis* se analizaron en comparación con *P. protegens* Pf-5, una conocida PGPB. *P. extremaustralis* presentó una buena capacidad de solubilización y mineralización de fósforo, tanto a 28°C como en frío. El perfil de ácidos orgánicos, responsables de la solubilización de fosfato inorgánico, fue diferente al de *P. protegens* Pf-5. Estas diferencias se correlacionaron con la ausencia del gen *gad* responsable de la producción de 2-ceto-gluconato, en el genoma de *P. extremaustralis*. Esta bacteria también fue capaz de producir ácido indol acético (AIA) y posee genes relacionados a la resistencia a ácido fusárico y otros que la capacitan para resistir la desecación. Posee también la ruta metabólica completa para la síntesis y liberación de ploverdinas y se observó un efecto del regulador global anaeróbico Anr sobre la producción de estos compuestos. Ensayos de quimiotaxis mostraron que *P. extremaustralis* es atraída por exudados radiculares de plantas de trigo y es capaz de colonizar raíces de trigo y maíz de forma estable e incrementar el peso seco de vástago de plantas de trigo, mostrando que además de sus características como PGPB es capaz de interactuar con vegetales. También se analizaron características de PGP en aislamientos bacterianos obtenidos a partir de suelos de la provincia de Buenos Aires con distinto régimen de lluvias. Se obtuvieron 19 cepas bacterianas capaces de solubilizar fósforo, 3 de las cuales mostraron una alta capacidad de solubilización. Se encontraron 22 aislamientos positivos para la producción de AIA. Se observó un efecto positivo sobre el crecimiento de plantas de maíz en un sistema axénico autotrófico de 2 de las cepas, IIM-*Man4* e IIA-*Man30*, indicando que pueden ser buenas candidatas como PGPB.

Para analizar si existe un impacto de plantas GM resistentes a la sequía sobre la comunidad bacteriana del suelo se realizaron experimentos en macetas con suelo de dos localidades Río

Cuarto(RC) e Inés Indart (II) en cámaras de cultivo con condiciones controladas, utilizando cultivares de maíz portadores del gen Hahb4 que confiere resistencia a sequía y salinidad. Las plantas fueron sometidas a dos tratamientos hídricos: alta y baja irrigación. Se analizó la diversidad bacteriana de las muestras de suelo mediante la secuenciación de amplicones del gen que codifica el 16S rRNA. Los suelos analizados fueron diferentes en cuanto a la  $\alpha$  diversidad. En II no hubo diferencias en  $\beta$  diversidad, mientras que en RC se encontraron diferencias al utilizar los índices cuantitativos (Bray Curtis y Weighted UniFrac) al comparar el tipo de planta. La composición de los grupos mayoritarios fue similar, siendo las Proteobacterias el más representado en ambos suelos con alrededor del 30%, seguido por Acidobacterias con alrededor del 17% y Planctomycetes y Verrucomicrobia representando aproximadamente un 10% del total cada uno. En todas las muestras el género predominante fue *Acidobacterium* con 14 a 20 % de los registros (lecturas). La mayoría de los géneros presentó una abundancia relativa de 0,01-0,1 %. Se realizó un análisis para determinar que géneros bacterianos son afectados por cada condición de riego. Se detectaron 10 géneros en II y 16 géneros en RC que estuvieron significativamente ( $p < 0,05$ ) más representados en la condición de sequía con respecto a buena irrigación; siendo *Chromatium*, perteneciente a las Gamma Proteobacterias, el que mayor proporción de cambio mostró en II y *Amycolatopsis*, perteneciente al grupo de las Actinobacterias, y *Nevskia*, dentro de las Gamma Proteobacterias, en RC. También se observaron 29 géneros que mostraron diferencias significativas en relación al tipo de planta en II y 61 géneros en suelo de RC. Los tratamientos tuvieron menos efecto en II en comparación con RC. En II no se observaron diferencias significativas ni con el régimen de irrigación ni con el tipo de planta y hubo un menor número de géneros afectados. EN RC se observó un efecto significativo del tipo de planta pero no de la irrigación.

Palabras clave: Solubilización de fosforo, Ácido indol acético, Ploverdinas, PGPR, *Pseudomonas*, Plantas transgénicas, Diversidad bacteriana, Resistencia a sequía, secuenciación de amplicones.

## "Microbiological studies related to the improvement of crop production in unfavorable areas"

### ABSTRACT

Due to the continuous human population growth, food production may be insufficient in the coming years, so it is necessary to implement strategies to increase crop production. These strategies include expanding the agricultural frontier to less suitable areas, such as cold or arid environments. To reach this goal it is necessary that plants can withstand and thrive in these conditions. The use of genetically modified (GM) crops resistant to drought can be a good option, as well as the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) that can grow under stress conditions, maintaining their plant-beneficial traits. The objective of this study was to analyze bacterial strains isolated from environments under different rainfall regimes and cold, in relation to their potential as PGPB under unfavorable conditions. We also assessed the influence of drought-tolerant GM maize on the composition of the soil bacterial communities, using high throughput sequencing techniques.

*Pseudomonas extremaustralis* isolated from an extreme environment (Antarctica) was analyzed for PGP traits in comparison with *P. protegens* Pf-5, a well known PGPB. *P. extremaustralis* presented a good solubilization and mineralization capacity of phosphate in comparison to *P. protegens* Pf-5, both at 28°C and under cold conditions. The profile of organic acids, responsible for the inorganic phosphate solubilization, was different from that of *P. protegens* Pf-5. These differences were correlated with genetic differences between both genomes, including lack of the *gad* gene in *P. extremaustralis* genome, related to 2-ketogluconate production. *P. extremaustralis* was also able to produce indole acetic acid (IAA); possesses genes encoding fusaric acid resistance and genes that enable it to withstand desiccation. It is, also a good siderophore producer, possesses a complete genetic pathway to produce and release pyoverdine. We observed that pyoverdine production was influenced by the global anaerobic regulator Anr. Chemotaxis and colonization assays showed that *P. extremaustralis* was attracted to wheat root exudates and was able to colonize wheat and maize roots forming stable colonies in root surface, improving the dry weight of the stem in wheat plants.

In addition, different characteristics related to the ability to promote plant growth in bacterial isolates obtained from soils with different rainfall regimes were analyzed. We found 19 isolates able to solubilizing inorganic phosphate, three of which showed a high solubilizing capacity and 22 isolates that were positive for IAA production, some of which reached high production (up to 60 µg / ml). Two strains, IIM-Man4 and IIA-Man30, showed a positive effect on the growth of maize plants in an autotrophic axenic system. The results indicate that *P. extremaustralis*, as some of the isolated bacterial strains,

could be good candidates for their analysis in experimental plots subjected to stress conditions.

Another expanding strategy to improve crop yield involves the use of GM plants. However, the evaluation of the impact of these organisms on the soil communities has not been deeply analyzed yet. We evaluated the effect of drought tolerant GM corn plants carrying the Hahb4 gene, on soil microbial community. Experiments were carried out in pots with soil from two locations Río Cuarto (RC) and Inés Indart (II) in culture chambers under controlled conditions. The plants were subjected to two soil irrigation regimes. Bacterial diversity of the soil community was analyzed using global amplicon sequencing techniques of the gene encoding the 16S rRNA. Soils were different in terms of  $\alpha$  diversity. In II there were not differences in  $\beta$  diversity, while in RC differences were found when comparing the type of plant using the quantitative index (Bray Curtis and Weighted UniFrac). The composition of the major groups was similar, with Proteobacterias being more represented in both soils with about 30%, followed by Acidobacterias with around 17% and Planctomycetes and Verrucomicrobia representing approximately 10% of the total. In all the samples the genus *Acidobacterium* was predominant with 14 to 19% of the records (readings). Most genera had a relative abundance of 0.01-0.1%. Analysis of bacterial genera affected by irrigation conditions was performed. Ten genera in II and 16 genera in RC were detected that were significantly ( $p < 0.05$ ) more represented in drought conditions in comparison with good irrigation; being *Chromatium* belonging to GammaProteobacteria that showed the highest proportion of change in II soil, and *Amycolatopsis* belonging to Actinobacterias and *Nevskia* within the GammaProteobacteria in RC. We also observed 29 genera that showed significant differences in relation to the type of plant in II and 61 genera in RC soil. Treatments had less effect on II as compared to RC. In II, no significant differences were observed either with the irrigation regime or the type of plant and there were fewer affected genera. The analysis of bacterial community of RC soils showed a significant effect of the type of plant but not of irrigation regimes.

Keywords: phosphorus solubilization, indole acetic acid, pyoverdine, PGPR, *Pseudomonas*, transgenic plants, bacterial diversity, drought tolerance, amplicon sequencing.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La agricultura es considerada una de las actividades esenciales para el ser humano no sólo por su función primaria en el suministro de alimentos sino también por su importancia económica, social y ambiental. Debido al crecimiento de la población, la producción de alimentos puede resultar insuficiente para los habitantes del mundo en los próximos años, por lo que resulta necesario implementar estrategias para que la producción agrícola se incremente siguiendo esa tendencia. Esta constante necesidad de aumentar la producción de alimentos está desplazando la frontera agrícola hacia zonas más áridas, con menores índices de precipitaciones y suelos con menor capacidad productiva reemplazando bosques por cultivos y pasturas. Dado que el agua es el factor limitante por excelencia para el crecimiento de las plantas, es necesario lograr que las plantas puedan desarrollarse en estos ambientes no favorables.

### **Panorama general de la agricultura en Argentina**

En Argentina desde mediados de la década del 90 la agricultura tuvo una fuerte expansión debido a la incorporación del cultivo de soja resistente a glifosato, que ocurrió en 1996. La soja resistente a glifosato abrió la puerta a cambios radicales en la producción agrícola. Esta nueva tecnología cambió la forma de aplicación de herbicidas, pudiendo realizar menos aplicaciones de un solo compuesto, esto tuvo un impacto directo en los costos requeridos para realizar este cultivo. Esta nueva tecnología fue acompañada con el desarrollo de la siembra directa, un sistema que no implica el uso de arado, resultando en un manejo menos agresivo del suelo en el que se preserva el rastrojo del cultivo del año anterior en la superficie. Esta práctica agrícola mejora la estructura del suelo, favorece la retención de agua, disminuye la erosión por viento y lixiviación gracias a que el suelo mantiene una capa de vegetales en descomposición en la superficie durante todo el año (Vargas Gil et al., 2011). Además, incrementa la incorporación de materia orgánica mejorando la estructura (Díaz-Zorita et al., 2002). La posibilidad de eliminar selectivamente la “maleza” y el desarrollo de una práctica de manejo del suelo que no implicara tanto movimiento de tierra tuvo como consecuencia directa la disminución de los costos de siembra y por lo tanto un aumento en las ganancias al realizar el cultivo de soja. Este nuevo concepto de explotación de los suelos permitió intensificar la producción en las zonas en las que ya se realizaban cultivos extensivos, comenzó a ser rentable realizar cultivos de soja con menor rotación de otros cultivos como trigo y maíz, lo que derivó en el monocultivo de soja. Además, permitió incorporar nuevos sitios a la producción agrícola. Las áreas incorporadas para la nueva agricultura tuvieron dos orígenes principales: las zonas menos productivas ubicadas en la región pampeana, con menor contenido de materia orgánica que no soportaban el manejo la agricultura con arado sostenida en el tiempo y que se utilizaban

en mayor medida para la producción ganadera extensiva. Además de estas zonas que cambiaron de producción ganadera a agricultura, se avanzó sobre zonas con índices de precipitaciones por debajo de los 700-800 mm anuales (Figura 1 A y B), que no se utilizaban para la producción de alimentos. Este fenómeno se conoce como expansión de la frontera agrícola. La zona que mayor impacto tuvo en este proceso fue la región del Chaco (Cabrera 1994).

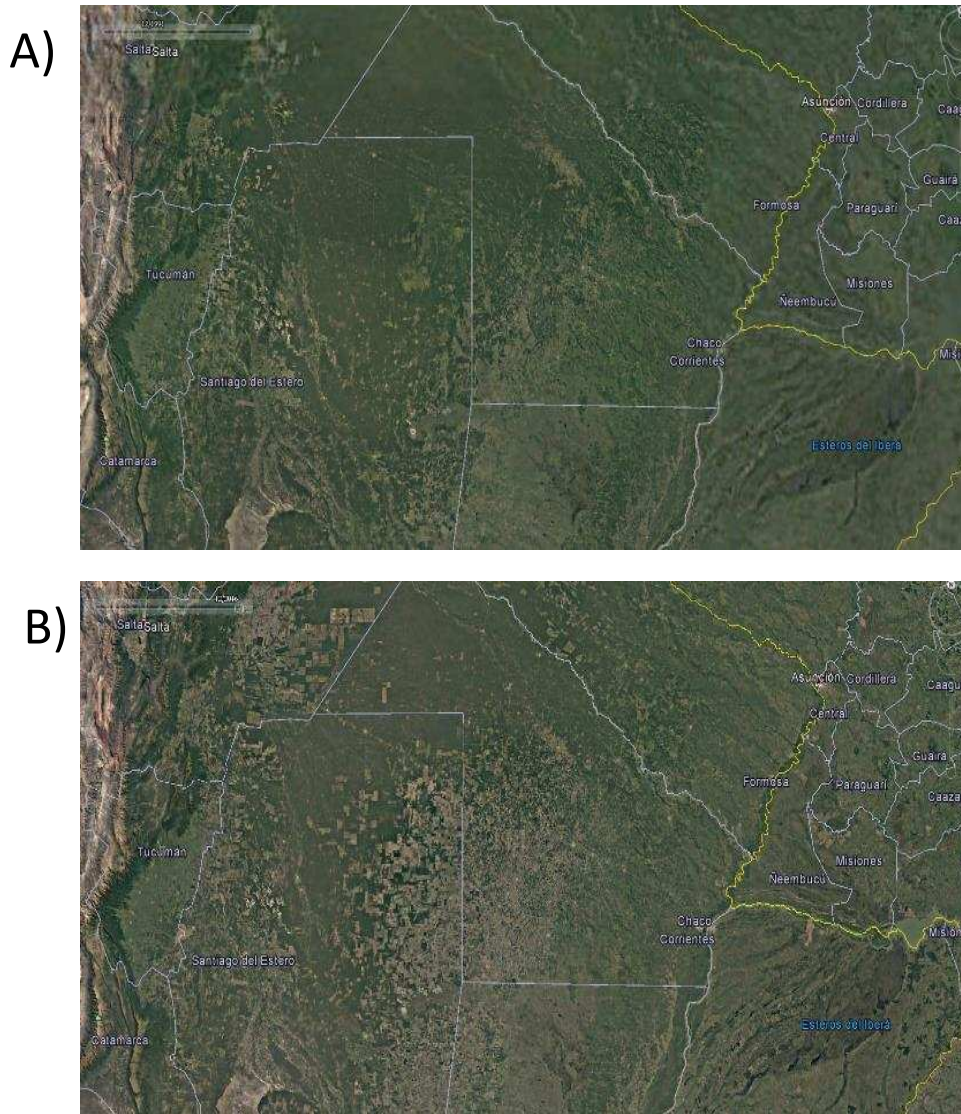


Figura 1: Región del Chaco. Tomado de Google-Earth. A) Imagen satelital tomada en diciembre de 1990. B) Imagen satelital tomada en diciembre de 2016. Se puede observar el cambio en la cobertura del suelo como un cambio en la tonalidad de colores entre las dos imágenes y la aparición de un patrón de zonas rectangulares bien definidas correspondientes las parcelas deforestadas.

Como puede observarse en base al análisis de la precipitación media anual y al índice de aridez de De Martone (De Martonne 1926) la zona incorporada a la nueva agricultura en este periodo, coincide con la ecorregión caracterizada como clima semiárido (Fig. 2 A y B). El índice de De Martone resulta de utilidad porque combina la precipitación media anual y la temperatura media anual para definir estas regiones, así por ejemplo donde las precipitaciones son escasas y estacionales y las temperaturas medias anuales elevadas, esta zona se describe como bosque semiárido.

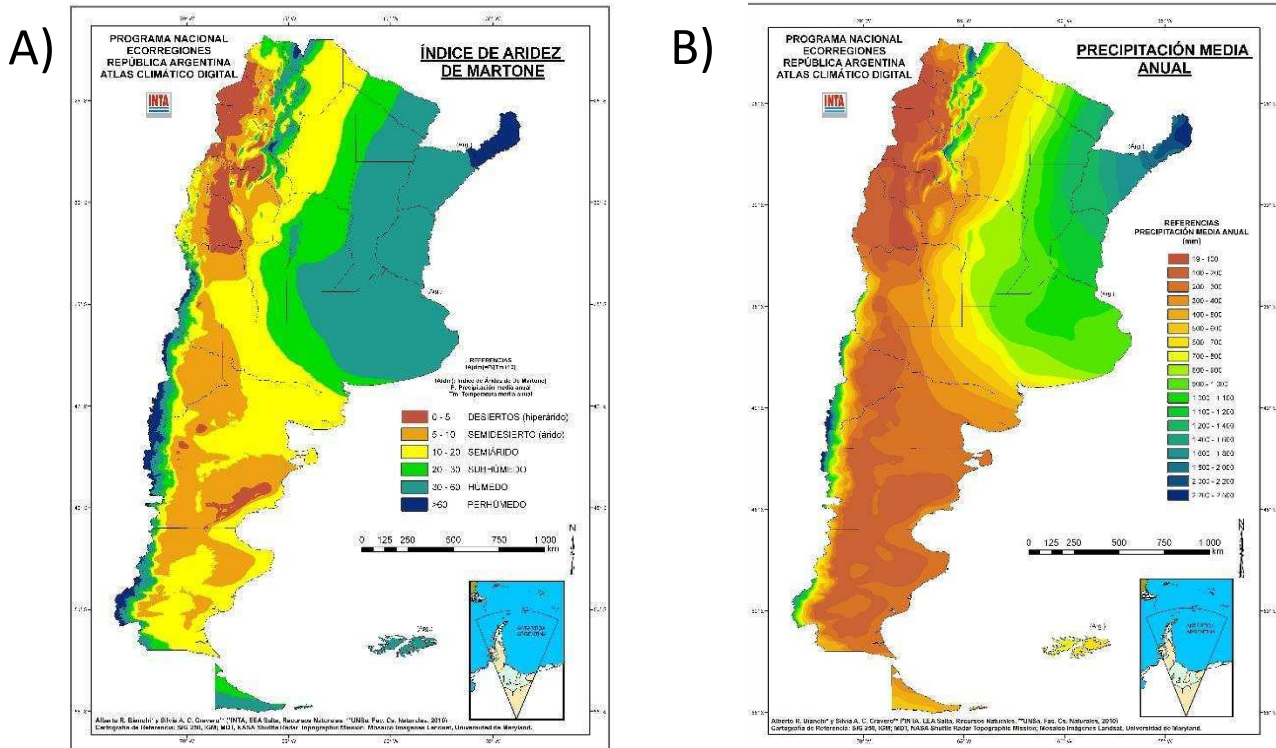


Figura 2: A) Ecorregiones definidas según Índice de aridez de De Martone. B) Regiones según índices de precipitaciones medias anuales. Tomado de (Rubí Bianchi et al. 2010)

La expansión de la frontera agrícola a zonas con menores recursos hídricos y el reemplazo de montes semiáridos y selvas naturales por cultivo y producción ganadera no es un fenómeno que ocurre sólo en Argentina, es un fenómeno global que en Sudamérica afectó particularmente a Paraguay, Argentina, Bolivia y Brasil (Hansen et al. 2013).

La tendencia indica que estas prácticas continuarán así durante los próximos años. Esto implicaría que la disminución de los montes tropicales áridos llegaría en pocos años a niveles críticos. Este fenómeno se ha convertido en una de las principales preocupaciones de los organismos dedicados a la conservación del medioambiente.



En este contexto y teniendo en cuenta la expansión agrícola que se produjo durante los últimos 20 años, deben tomarse medidas al respecto que fomenten el desarrollo sostenible y que no deterioren el medio ambiente. Sin embargo, no debemos perder de vista que el reemplazo de ambientes naturales por producción agropecuaria se debe, en primera medida, a que la humanidad se encuentra en crecimiento constante y esto provoca el incremento en la demanda de alimentos. De manera lógica, la producción de alimento debe acompañar a esa demanda creciente. Según estadísticas de la FAO (Food and Agriculture Organization) (FAO 2002) la tasa de incremento de demanda de alimentos, disminuyó en los últimos 30 años. La explicación a este fenómeno es la disminución de la tasa de crecimiento de la población mundial. Sin embargo la demanda de alimento total aumenta año a año, se calcula que en los próximos 30 años será de 1,5 a 2% anual a nivel global y se estiman índices mayores (3%) en las áreas de mayor crecimiento económico, principalmente China.

Es necesario, por todo esto, aumentar la producción de alimentos, pero sería necesario que este aumento no conlleve a una destrucción irreversible de áreas naturales estratégicas, recurriendo en menor medida al aumento en la superficie explotada y tratando de optimizar las áreas que actualmente están en uso principalmente áreas desfavorables, con suelos más pobres, regiones frías y con menor disponibilidad de agua.

Los esfuerzos para lograr el incremento en la producción son muy variados y contemplan múltiples estrategias. Entre las que podemos nombrar:

- Incremento en la utilización de fertilizantes sintéticos.
- Mejora en la utilización de pesticidas
- Desarrollo de tecnologías para optimizar los procesos de siembra y cosecha
- Implementación de sistemas de riego
- Incorporación de nuevas variedades de cultivos, seleccionados y/o transformados genéticamente
- Utilización de biofertilizantes y mejora de inoculantes

Entre las estrategias mencionadas, el procedimiento más conocido y utilizado es aumentar los nutrientes del suelo a través de la fertilización directa con fertilizantes sintéticos, sin embargo, estas prácticas tienen efectos nocivos sobre los suelos y el medioambiente en general. Además, los fertilizantes químicos a menudo tienen una baja eficiencia de uso, debido a que sólo una parte de los nutrientes es absorbida por las plantas. Por ejemplo, el fósforo precipita luego de ser

adicionado al suelo y el nitrógeno se puede perder por lixiviación de nitratos, lo que da como resultado la menor disponibilidad para las plantas (Adesemoye et al., 2009).

Una alternativa a la fertilización química es la biofertilización. Un ejemplo interesante de la potencialidad de la biofertilización está relacionada con el fósforo. Este suele ser un nutriente limitante en el crecimiento de las plantas pese a que se encuentra en abundancia en el suelo. La biofertilización con microorganismos como hongos y bacterias que sean capaces de movilizar este nutriente es una alternativa para incrementar la disponibilidad del fósforo sin recurrir al uso de fertilizantes químicos. Son muy diversos los grupos bacterianos capaces de transformar las diferentes formas de fósforo y diversos los mecanismos por los cuales lo hacen (Sashidhar y Podile 2010; Saghir et al. 2014). Esta actividad de “movilización” de las formas de fósforo es fundamental en los procesos naturales de nutrición del suelo y contribuye a incrementar el rendimiento de los cultivos.

Por otro lado, estas zonas son muchas veces irrigadas con agua subterránea. Estos sistemas de riego conllevan a un aumento en la salinidad del suelo por el depósito de las sales contenidas en el agua y la escasa lixiviación por lluvias (Nautiyal 1999). Estas condiciones de estrés como la alta salinidad y el bajo contenido de agua en suelos pueden afectar negativamente las propiedades de las bacterias propuestas para realizar el proceso de biofertilización (Marulanda et al. 2009). Por todo esto una buena aproximación para mejorar el rendimiento de cultivos en zonas de producción marginales sería el desarrollo de bioinoculantes que sean capaces de tolerar situaciones de estrés manteniendo la actividad promotora del crecimiento vegetal.

Otra alternativa sobre la que se están poniendo muchos esfuerzos es el desarrollo de plantas GM que tengan mayor tolerancia a las condiciones de estrés, con mayor énfasis en la tolerancia a estrés hídrico. En este trabajo se analizará un aspecto de plantas genéticamente modificadas tolerantes a sequía, estudiando el impacto de plantas de maíz resistentes a sequia sobre las comunidades bacterianas de dos suelos diferentes.

De manera general, los esfuerzos que se realicen en materia de incremento de la producción agrícola deben contemplar los siguientes puntos.

- Intensificar la producción en las áreas ya incorporadas.
- Proteger los suelos explotados
- Disminuir el uso de pesticidas y fertilizantes

Todos los puntos mencionados pueden ser abordados utilizando estrategias microbiológicas.

## El ambiente rizosferico y los microorganismos como promotores del crecimiento vegetal

La rizosfera es el área del suelo que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas. Es un ambiente muy importante ecológicamente en el que se pueden observar diferentes tipos de interacciones planta-microbio (Prashar et al. 2014). La colonización microbiana de las raíces de las plantas en crecimiento y de su entorno promueve el desarrollo de diversos tipos de interrelaciones (asociativas, simbióticas, neutrales o parasitarias), dependiendo de factores como el ambiente general del suelo y el contenido de nutrientes, los mecanismos de defensa de la planta y la proliferación de microorganismos. La microflora de la rizosfera proporciona un vínculo importante entre la planta y el suelo. Además del efecto propio de la penetración de la raíz, la rizosfera recibe los exudados radiculares que están formados por compuestos solubles en agua como aminoácidos, ácidos orgánicos, mucilago, proteínas y azúcares que cambian las condiciones del suelo y hacen de esta zona una región muy dinámica que favorece el crecimiento de microorganismos. Los exudados radiculares afectan entonces la interacción planta bacteria y contribuyen al aumento de nutrientes en el suelo. Debido a esto, la presencia de las raíces hace de este un entorno más rico en organismos que las zonas que no alcanzan a ser influenciadas por las raíces (suelo desnudo o *bulk soil*). Se estima que el número de bacterias en la rizosfera es 10 a 1000 veces mayor en comparación con el suelo desnudo (Lugtenberg y Kamilova 2009).

La composición de los exudados radiculares es dependiente de la especie de planta que los produce incluso se han visto diferencias entre variedades de plantas de la misma especie (Bouffaud et al. 2014). Además, los exudados tienen influencia y moldean la microbiota rizosferica, dado que ciertos organismos son atraídos a determinados compuestos, por lo tanto la naturaleza de los exudados tiene efecto directo en la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas de la rizosfera (Haichar et al. 2008). La comunicación planta-microbio está mediada por los exudados radiculares a través de la respuesta quimiotáctica del microorganismo hacia exudados como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos que conducen a la colonización de las raíces (Bais et al. 2006).

Para las plantas, la interacción con los microorganismos puede ser de manera general **neutra**, en la cual la bacteria utiliza los compuestos liberados por las raíces y es favorecida por el entorno radicular pero no tiene influencia en el desarrollo de la planta; **patogénica**, en la cual el crecimiento del microorganismo afecta negativamente al crecimiento y/o salud de la planta (Arrebola et al. 2003) o **beneficiosa**, en la cual la planta se ve favorecida por la presencia del microorganismo. Las bacterias que favorecen el crecimiento vegetal son denominados de

manera general PGPR por las siglas en inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (Kloepper et al. 1989). Estos microorganismos pueden generar diversos efectos que involucran el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas y la salud del suelo y del crecimiento y la productividad de los cultivos (Bhardwaj et al. 2014).

### **Las plantas genéticamente modificadas**

El empleo con fines comerciales de plantas genéticamente modificadas (GM) o transgénicas con capacidad de resistir tanto el estrés biótico como el abiótico se incrementa año tras año. El empleo de la ingeniería genética o transgénesis en el mejoramiento vegetal ha permitido aumentar la productividad de los cultivos gracias al mejoramiento de diferentes rasgos tales como ciertas características morfológicas (tamaño del grano, altura de la planta, etc.), resistencia a plagas y enfermedades (virus, insectos, hongos, etc.) y tolerancia a herbicidas o a condiciones ambientales adversas (salinidad, heladas, sequía, etc.) (Abiri et al. 2015).

Los cultivos GM que actualmente se comercializan incluyen soja, maíz, algodón y canola tolerantes a herbicida y maíz y algodón resistentes a insectos, entre otros. Estas plantas GM pueden impactar directa o indirectamente en las funciones y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (Turrini et al. 2015), las cuales, como se describió en el apartado anterior, juegan un papel fundamental en el ambiente rizosférico debido a que son parte fundamental de procesos tales como la degradación de materia orgánica y los ciclos biogeoquímicos de los elementos y mantienen la calidad ambiental y fertilidad del suelo. Los microorganismos de la rizosfera pueden ser afectados por el genotipo de las plantas y por cambios en el manejo agrícola debido a que la implementación de los cultivos de plantas transgénicas están asociados a nuevos manejos y tecnologías, como la aplicación de herbicidas (Turrini et al., 2015). Algunos estudios han analizado aspectos relacionados con el impacto de estos organismos sobre el medio ambiente. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto que estos cultivos GM podrían tener sobre organismos claves en el funcionamiento de las comunidades del suelo. Por otra parte, esta evaluación debe ser llevada a cabo con cada nuevo evento transgénico liberado al mercado.

### **Descripción del problema a estudiar y objetivos**

La agricultura cumple un papel clave en la alimentación humana. Como se mencionó, debido al incremento de población mundial los alimentos pueden comenzar a escasear en los próximos años, por lo que es necesario desarrollar estrategias que permitan incrementar la producción de alimentos de origen vegetal. Entre las estrategias propuestas para lograr esta meta, aquellas relacionadas con la expansión de las áreas cultivables (frontera agrícola), el uso de cultivos transgénicos y el incremento de la utilización de biofertilizantes involucran la participación de microorganismos que se desarrollen adecuadamente en el suelo e interactúen con las plantas promoviendo su crecimiento. Estas estrategias podrían cumplir con la premisa del uso sostenible y la protección del medio ambiente dado que mediante la utilización de PGPR y/o el uso de plantas GM resistentes al estrés que no afecten las comunidades del suelo, se podría reducir el aporte de nutrientes minerales y pesticidas (Philippot et al. 2013). En este sentido, la búsqueda de microorganismos promotores de crecimiento vegetal con nuevas potencialidades es una alternativa interesante. Para la utilización exitosa de PGPR como inoculantes en estas condiciones, y la consecuente extensión de las áreas de cultivo para uso agrícola otras regiones, como las regiones áridas o de climas fríos es necesario que los mismos sean capaces de sobrevivir a las condiciones en las que se desarrollan los cultivos. Si bien existen características conocidas en relación a la capacidad de promoción de crecimiento vegetal, existe aún poca información sobre los mecanismos básicos relacionados con la comprensión de los modos de colonización en condiciones de estrés y sobre el mantenimiento de las capacidades PGP y de aquellas que resultan en la interacción exitosa con las plantas en esas condiciones. La habilidad de colonizar y sobrevivir en la rizosfera (competencia) es algo que frecuentemente queda relegado a la hora de identificar y seleccionar PGPR debido a que la búsqueda se centra en el conocimiento sobre la mecánica del efecto promotor del crecimiento. Sin embargo, la habilidad de competencia en la rizosfera constituye un factor clave para la aplicación exitosa de PGPR, sobre todo en situaciones de estrés.

Por otra parte, en los últimos años los avances en biotecnología e ingeniería genética se han permitido aumentar la superficie cultivada y el rendimiento por hectárea gracias al mejoramiento y modificación genética de las plantas cultivadas, determinando que la estrategia de utilización de cultivos GM para mejorar la productividad vegetal haya sido ampliamente adoptada. Estas plantas GM poseen diferentes modificaciones genéticas que incluyen la resistencia a herbicidas, a insectos y recientemente a estrés hídrico (Manavella et al. 2008). Con respecto al impacto de estos organismos sobre el medio ambiente, algunos

estudios han analizado aspectos relacionados con el flujo génico desde las plantas genéticamente modificadas (GM) a las plantas silvestres, con el traspaso de genes de resistencia antibiótica hacia poblaciones microbianas naturales y con el efecto de las toxinas producidas por los organismos GM sobre organismos *no blanco* (Giovannetti 2003; Liu 2010). Algunos estudios mostraron que un cambio en la composición de exudados radiculares producto de modificaciones genéticas en plantas de *Arabidopsis* tienen un impacto directo en la microbiota asociada a raíces (Badri et al. 2009; Bressan Achouak y Berge, 2013). Sin embargo, existen pocos estudios que analicen el efecto que estos cultivos podrían tener sobre organismos claves en el funcionamiento de las comunidades del suelo (Liu 2010). Particularmente en Argentina, donde se ha adoptado ampliamente el cultivo de plantas GM, existe poca información sobre su impacto en los hongos microorganismos.

Teniendo en cuenta que la actividad agrícola es de suma importancia en Argentina, el mejoramiento del rendimiento de los cultivos utilizando estrategias sostenibles y que no deterioren el medio ambiente es una meta a seguir. En base a esto el objetivo general del trabajo estuvo centrado en el análisis de distintos aspectos microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos en regiones menos aptas. Considerando que en los últimos años los estudios se han orientado a la búsqueda de plantas GM resistentes a condiciones de estrés hídrico, se deberá analizar si esos cultivos GM afectan la composición de las comunidades bacterianas de la rizosfera y se deberán seleccionar inoculantes (PGPR) capaces de resistir esas condiciones.

En base a estas consideraciones se plantearon los siguientes objetivos específicos para esta Tesis Doctoral:

- 1.- Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal a partir de suelos con distintos regímenes de lluvia.
- 2.- Análisis genómico y funcional de características genéticas relevantes para la promoción de crecimiento vegetal y resistencia a estrés osmótico en *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria procedente de ambientes extremos.
- 3.- Análisis de la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas de maíz genéticamente modificadas resistentes a la sequía.

# Capítulo 1: Análisis de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal

## INTRODUCCIÓN

### Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

La comercialización de bacterias PGPR comenzó hace más de un siglo en Estados Unidos e Inglaterra para la inoculación de leguminosas con rizobios (Herrmann y Lesueur 2013). El interés por obtener mejores biofertilizantes ha llevado a extensivas investigaciones y se ha alcanzado un amplio rango de nuevos productos formulados, que funcionan como biofertilizantes y bioestimulantes (Vessey 2003).

Actualmente un gran número de diferentes especies bacterianas pueden ser consideradas PGPR, entre ellas muchas especies pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus*, entre otros (Glick 2005). Gracias a los avances en la comprensión de los mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de promover el crecimiento vegetal, la búsqueda se ha perfeccionado permitiendo la identificación de mayor número de bacterias con potencialidad de PGPR y esto redundó en que muchos de los inoculantes actuales contienen bacterias que no pertenecen al grupo de los rizobios y más recientemente se han desarrollado también formulaciones en base a hongos micorrízico-arbusculares (MA) (Bashan et al. 2014).

Las PGPR son bacterias que mejoran el estado general de las plantas. La manera en que afectan el crecimiento de las plantas se puede clasificar en 5 categorías: (1) fijación biológica de nitrógeno, (2) incremento de la disponibilidad de nutrientes en el suelo (3) inducción del aumento de la superficie radicular, (4) inhibición el crecimiento de patógenos o favorecimiento del crecimiento de otros organismos beneficiosos (Vessey 2003) y (5) activación de la resistencia sistémica inducida de la planta (ISR). Estas cinco categorías podemos agruparlas de manera más general en tres, biofertilización (1 y 2), fitoestimulación (3) y biocontrol (4, 5) e implican la acción directa e indirecta de los microorganismos PGPR sobre las plantas. En el primer caso, acción directa, la interacción planta-bacteria debe ser íntima, e implica la colonización de la superficie radicular o incluso la intromisión de las bacterias en los espacios periplásmicos e intercelulares (interacción endofítica), en el segundo las bacterias pueden ser parte de la microflora de la rizosfera y no encontrarse en contacto directo con la planta.

La Figura 1.1 resume estas actividades y modos de interacción de las bacterias con las plantas. Las múltiples investigaciones sobre los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal han resultado en la comprensión de muchos de los modos de acción de las bacterias PGP algunos de los cuales desarrollaremos a continuación.

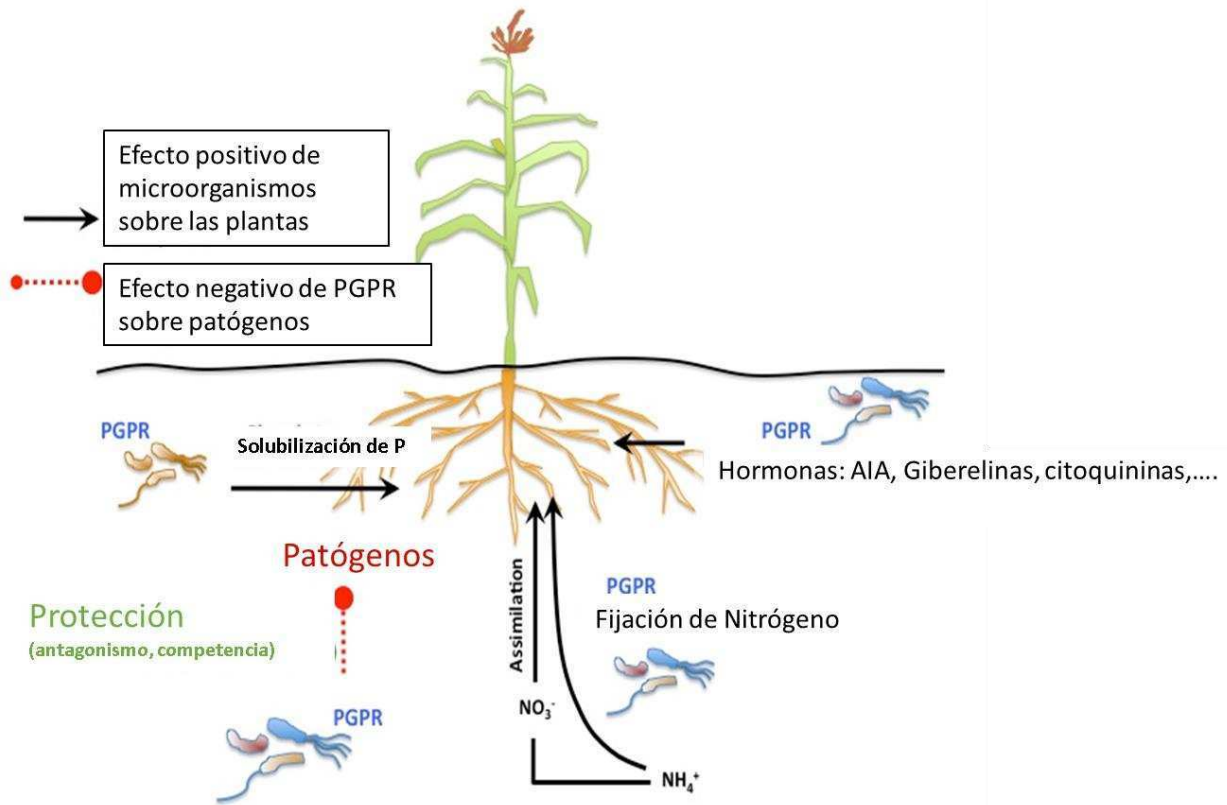


Figura 1.1: Esquema de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Modificado de <http://www.ecologiemiobiennelyon.fr>.

### Biofertilización

El mecanismo de biofertilización mejor estudiado, sin dudas, es la fijación biológica de nitrógeno (FBN), en especial la que se da en asociaciones con plantas leguminosas por los miembros del grupo de las rizobiales (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium*) (Sessitsch et al. 2002; Laranjo et al. 2014), siendo estos microorganismos los primeros en ser utilizados comercialmente para la inoculación de leguminosas a finales del siglo 19 (Fred et al. 1933). Más recientemente se ha hecho énfasis en el estudio de la fijación de nitrógeno y promoción del crecimiento vegetal por diazotrofos de vida libre como *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azotobacter* y *Burkholderia*, entre otros. Estos organismos cobran importancia porque son capaces de asociarse a plantas no leguminosas como caña de azúcar, trigo, arroz, etc. (Sevilla et al. 2001; Mrkovacki y Milic, 2001; James et al., 2002), cultivos de gran interés comercial que necesitan fertilización con nitrógeno. Estos microorganismos son capaces de aportar cantidades significativas de nitrógeno a través de la FBN disminuyendo los costos de producción y evitando el uso de fertilizantes químicos.



## Incremento en la disponibilidad de fósforo (P)

Además de la FBN existen otros mecanismos por los cuales las bacterias pueden mejorar el estado nutricional de las plantas, el aumento de la disponibilidad de un determinado nutriente es fundamental en el crecimiento de las plantas. Dentro de este mecanismo podemos mencionar la movilización de diferentes formas de fósforo y el aumento en la disponibilidad de micronutrientes por liberación de sideróforos, principalmente Fe, como los de mayor relevancia actualmente.

El fósforo es el segundo nutriente que más comúnmente limita el crecimiento de las plantas, sin embargo, las concentraciones de este elemento son altas en el suelo, aunque se presenta en moléculas orgánicas, nucleótidos, sales de ácido fítico, etc. y fosfatos minerales insolubles que forman complejos con cationes (Fe, Al, Ca), que no pueden ser utilizadas por los vegetales. Las plantas solo pueden incorporar fósforo cuando este se encuentra en formas solubles, fosfato monobásico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y fosfato dibásico ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Vance et al. 2003). Es por esto que siendo un elemento abundante en el suelo es un nutriente limitante para las plantas.

La proporción de microorganismos del suelo capaces de movilizar fósforo es alta (Nautiyal 1999; Sashidhar y Podile 2010; Saghir et al. 2014) y son actores fundamentales en el ciclo geoquímico de este elemento. Las formas de fósforo que son capaces de movilizar implican tanto fuentes orgánicas como inorgánicas. La movilización de las formas orgánicas implica la acción de varias enzimas, tales como fosfatasas inespecíficas, fitasas, fosfonatasas y liasas de C-P, que están inducidas en situaciones de escasez de fósforo inorgánico (Pi) (Lidbury et al. 2016), esta acción es llamada comúnmente mineralización.

La movilización a partir de sales insolubles se denomina solubilización y ocurre principalmente por disminución del pH del suelo producto de la liberación de ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga 1999; Miller et al. 2010).

En la mayoría de las especies de *Pseudomonas* la solubilización de fosfato mineral está relacionada con la producción de ácidos orgánicos. El P inorgánico se puede solubilizar principalmente mediante la producción de los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico, a través del metabolismo oxidativo periplásmico de glucosa por las enzimas glucosa deshidrogenasa (Gcd), dependiente del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) y gluconato deshidrogenasa (Gad). Sin embargo, algunas cepas han mostrado la falta de *gad* resultando en una composición diferente del perfil de producción de ácidos orgánicos (Miller et al. 2010). La Figura 1.2 muestra este mecanismo y los principales genes involucrados en él.

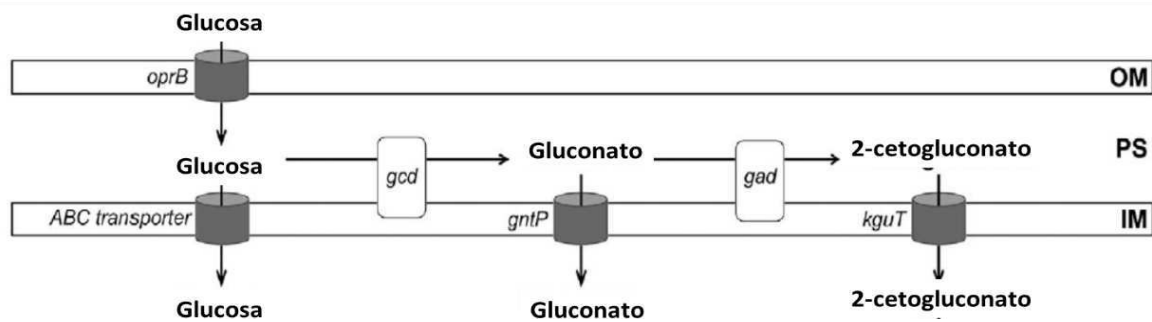


Figura 1.2: Vía de catabolismo periplásmico de la glucosa y producción de los ácidos orgánicos gluconato y 2-cetogluconato en *Pseudomonas*. Adaptado de (Miller et al. 2010). OM: membrana externa; PS: espacio periplásmico; IM: membrana interna; gcd: glucosa deshidrogenasa; gad: gluconato deshidrogenasa; oprB: porina de membrana externa de glucosa/carbohidrato; gntP: gluconato permeasa; kguT: probable transportador de 2-cetogluconato

### Fitoestimulación

La promoción del crecimiento vegetal que se denomina fitoestimulación, se da de manera directa e involucra una interacción de la bacteria con la planta muy cercana. Puede involucrar el aporte de algún compuesto que promueve el crecimiento de la planta como el ácido indol-acético, el cual se ha estudiado extensivamente en su papel en el desarrollo radicular (Oberhänsli et al. 1991; Patten y Glick 2002), otras hormonas como el ácido giberélico (Dodd et al. 2010; Gutierrez-Manero et al. 2001; Vachero et al. 2013), citoquininas y enzimas, como la 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa que degrada el precursor de etileno ACC en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato interfiriendo, de esta manera, en la síntesis de etileno y por consiguiente en la respuesta a estrés de las plantas (Donate-Correa et al. 2005).

### Resistencia sistémica inducida (ISR).

La ISR surge a partir de la interacción de algunas bacterias con las raíces que resulta en la adquisición de resistencia a algunas bacterias patógenas, hongos y virus por parte de las plantas. Este fenómeno tiene mucha similitud con la inmunidad innata en seres humanos. Este mecanismo fue descrito a partir de observaciones de resistencia contra el marchitamiento de clavel por *Fusarium* inducida por la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Cepa WCS417r y por rizobacterias contra el hongo *Colletotrichum orbiculare* en pepino. La ISR es dependiente del ácido jasmónico y la señalización del etileno en planta. Se sabe que muchos componentes bacterianos individuales inducen ISR, tales como lipopolisacáridos (LPS), flagelos, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos cíclicos, el factor antifúngico 2,4-diacetil floroglucinol (Phl), etc. (Lugtenberg y Kamilova 2009).

### Biocontrol.

Los mecanismos que están considerados en esta categoría son muy variados. Implican la inhibición del crecimiento de algún microorganismo que afecte el crecimiento de la planta,

resultando en la promoción del crecimiento vegetal de manera indirecta (Prakamhang et al. 2014). Los mecanismos más destacados son los que involucran la producción de algún compuesto que resulta en la disminución o prevención del efecto deletéreo de microorganismos patógenos: 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, antibióticos, ácido cianhídrico (Pal et al. 2001). Además de la producción de compuestos que actúan como antagonistas de patógenos, existen otros mecanismos que engloban dentro de los mecanismos de biocontrol que involucran la competencia por nutrientes y nichos ecológicos. Entre estos mecanismos se encuentra la competencia por iones de hierro. A bajas concentraciones de hierro, algunas especies bacterianas producen sideróforos, compuestos que actúan como quelantes de  $\text{Fe}^{3+}$ . Las bacterias que producen sideróforos de alta afinidad en la rizosfera pueden inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos cuando la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  es baja, por ejemplo, en suelos ácidos (Ruiz et al. 2015).

### **Características relacionadas con la supervivencia bacteriana de relevancia para el desempeño exitoso de PGPR**

Para que las bacterias tengan éxito en cualquier aplicación, es necesario que puedan ser capaces de sobrevivir y colonizar eficientemente el ambiente en el que deben desarrollarse. Por este motivo, es interesante conocer aspectos básicos del metabolismo bacteriano que puedan estar implicados en la capacidad de supervivencia en situaciones de estrés. Así por, ejemplo un factor clave para la supervivencia bacteriana en suelo, lo constituye la disponibilidad de agua. Los microorganismos son pequeños y se encuentran en íntimo contacto con el suelo, las membranas son semipermeables y por lo tanto las células alcanzan el equilibrio hídrico con el suelo rápidamente. En condiciones de estrés hídrico este balance debe ser compensado por los microorganismos para evitar la desecación, a medida que el potencial agua del suelo disminuye, debe hacerlo también el potencial agua interno de la célula. Los microorganismos logran esto a través de la acumulación de osmolitos intracelulares, moléculas pequeñas de alta solubilidad y bajo efecto directo en la fisiología celular. Las bacterias utilizan para este propósito diferentes compuestos entre ellos aminoácidos como prolina, glutamina, derivados de aminos cuaternarios como glicina-betaina y azúcares como trehalosa (Schimel et al. 2014), entre otros.

Además de la protección osmótica son importantes otros mecanismos como los de formación de estructuras de resistencia, esporas, capacidad de formar biofilms, producción de exopolisacáridos y la síntesis de compuestos de reserva, como los polihidroxialcanoatos (PHA) (Ratcliff et al. 2008). Se sabe que en *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Azospirillum* la síntesis de PHA es importante en la supervivencia y resistencia a frío y desecación (Ayub et al. 2004; Ayub et al. 2009; Aneja et al. 2005; Kadouri et al. 2003) Estos mecanismos son importantes en el mantenimiento de las bacterias en ambientes cambiantes y con bajo

contenido de nutrientes como el suelo debido a que les permiten tolerar desecación, la disminución de la tensión de oxígeno, el frío y las altas temperaturas. La supervivencia en el suelo de los microorganismos determina la capacidad de estos para ser utilizados como inoculantes.

### **Generalidades del género *Pseudomonas***

Un grupo de bacteriano de interés en el estudio de la promoción del crecimiento vegetal es el de las *Pseudomonas* y en particular las pertenecientes al subgrupo de las fluorescentes. Este tipo de bacterias son estudiadas extensamente en relación a su importancia agrícola. Su capacidad de promover el crecimiento vegetal se atribuye a varios de los mecanismos mencionados anteriormente. Nos detendremos en la descripción de este grupo de bacterias debido a que en esta tesis se estudia el efecto de una bacteria perteneciente al género *Pseudomonas*, *P. extremaustralis*, en relación a la promoción del crecimiento vegetal en condiciones de estrés por frío.

Las especies del género *Pseudomonas* pertenecientes a las  $\gamma$ -Proteobacterias son bacilos Gram negativos que se encuentran distribuidas en diversos ambientes naturales, encontrándose, por ejemplo, en agua y suelo. Poseen una gran versatilidad metabólica que les permite sobrevivir y explotar diferentes nichos ecológicos. Se las ha aislado de ambientes extremos donde predominan las bajas temperaturas o altas salinidades, entre otros, y también en aquellos contaminados con hidrocarburos. Las bacterias pertenecientes a este grupo son capaces de producir diversos compuestos de interés con propiedades antibióticas (O'Sullivan y O'Gara 1992) y polímeros de importancia biotecnológica como los alginatos y los polihidroxialcanoatos. Por estas características, así como por su relativamente fácil manipulación en el laboratorio, las especies de *Pseudomonas* son de gran interés en microbiología, no solo básica sino también aplicada. Muchos estudios independientes han señalado a las *Proteobacterias* y en particular a las pertenecientes a las familias *Pseudomonadaceae* y *Burkholderiaceae* como miembros dominantes de la microbiota de la rizosfera (Peiffer et al. 2013). Justamente, su éxito ecológico se basa en gran medida en su alta versatilidad metabólica y también a su capacidad de crecer en un amplio intervalo de temperaturas, diferentes tensiones de oxígeno y soportar diferentes tipos de estrés. En relación a los mecanismos que en *Pseudomonas* permiten el desarrollo frente a variaciones en la disponibilidad de oxígeno se encuentran aquellos controlados por el regulador global Anr. La capacidad de Anr de detectar los cambios en los niveles de  $O_2$  radica en un centro Fe-S. La reducción de este centro como respuesta a la disminución de la tensión de  $O_2$  determina un cambio conformacional que permite la dimerización aumentando la unión sitio específica al DNA en los genes blanco (Lazazzera et al. 1996; Jervis y Green 2007). Anr se une a regiones consenso, denominadas Anr-box, localizadas en las zonas promotoras de los genes que

regula. La proteína Anr es activa en condiciones de anaerobiosis y está involucrada en la utilización de nitrato como último aceptor de electrones y en la fermentación de la arginina, para obtener energía por fosforilación a nivel de sustrato (Ugidos et al. 2008). Además de su papel en el metabolismo energético, actualmente se ha descrito que Anr regula genes involucrados en otros procesos celulares y se han predicho nuevas funciones a través del análisis bioinformático del regulón Anr (Sonnleitner et al. 2011; Trunk et al. 2010). Por ejemplo, en *Pseudomonas protegens* CHA0 el regulador Anr está relacionado con la producción de ácido cianhídrico y se ha observado que en suelos inundados, una mutante de ANR mostró una disminución del 30% en la supresión de enfermedad de origen fúngica en vegetales destacando la importancia de este regulador en suelos con baja la disponibilidad de oxígeno (Laville et al. 1998) y asociándolo a mecanismos indirectamente involucrados en la promoción de crecimiento vegetal.

Numerosos trabajos han reportado que muchas especies de *Pseudomonas*, principalmente las pertenecientes al grupo de las fluorescentes son conocidas por aumentar la salud y crecimiento de las plantas (Glick 1995; Haas y Défago 2005). Además, ha sido señalado que son importantes en suelos *supresivos* contra el patógeno *Fusarium* y muchos estudios a campo y en invernadero han demostrado su eficiencia como inoculantes bacterianos (Schippers et al. 1995; Fravel 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes y las características del grupo puede considerarse que las *Pseudomonas* son un buen modelo para estudios de las características relacionadas con la promoción del crecimiento y la colonización de especies vegetales en condiciones de estrés.

### ***Pseudomonas extremaustralis* como modelo de estudio**

El Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana –FCEyN UBA, se ha dedicado al estudio de la supervivencia y adaptabilidad bacteriana al ambiente, en particular en el papel de los polihidroxialcanoatos (PHA), y en la respuesta a estrés (López et al. 1995; Ruiz 2001; Ayub et al. 2004; Ayub et al. 2009; Raiger Lustman et al. 2015; López et al. 2015). En los últimos años los trabajos se han centrado en el estudio de *P. extremaustralis* una nueva especie aislada en el laboratorio (López et al. 2009) con la cual se llevó a cabo parte del trabajo de esta Tesis en relación a la promoción del crecimiento vegetal e interacción con plantas.

*P. extremaustralis* fue aislada a partir de una muestra de agua procedente de una charca temporal del Continente Antártico. Sus características más importantes, que la hacen de interés para su estudio, son la alta producción de PHB, más del 80% de su peso seco (Ayub et al. 2009; Ayub et al. 2004) y su alta resistencia al estrés tanto oxidativo, calor o frío. La producción de PHB resultó una característica sumamente interesante debido a que las especies del género *Pseudomonas* producen normalmente PHA de cadena media y no de

cadena corta, como el PHB. Además presenta como particularidad la presencia de una isla genómica de adaptabilidad, probablemente adquirida por transferencia lateral, en la cual se encuentran los genes de síntesis de PHB que mostraron similitud con especies del género *Burkholderia* y otros genes posiblemente relacionados con la adaptabilidad (Ayub et al. 2007). Además de la importancia del PHB en la supervivencia en frío, cuando las bacterias se desarrollan en biofilms a baja temperatura, la capacidad de producción de PHB permite el estado de vida planctónico posibilitando la colonización de nuevos ambientes (Tribelli y López 2011).

La obtención del genoma completo de *P. extremaustralis* (Tribelli et al. 2012) permitió realizar varios estudios entre ellos, se analizó la influencia del regulador global de crecimiento en anaerobiosis Anr en relación a la producción de PHB y otros procesos en *P. extremaustralis*. La limitación de oxígeno es un componente clave en la fisiología bacteriana y de gran importancia para encarar estudios ambientales e industriales. Dado que el metabolismo del PHB tiene relación con el estado redox celular, se estudió el papel de Anr en el metabolismo del PHB en condiciones de baja tensión de oxígeno (Tribelli et al., 2010). Estos trabajos permitieron también poner en evidencia nuevos roles para Anr entre ellos su relevancia en la resistencia al estrés oxidativo y en el mantenimiento equilibrio redox en condiciones de baja provisión de oxígeno y en las primeras etapas de la formación de biofilms (Tribelli et al. 2013). Por otro lado, en relación con este regulador se cuenta con una construcción que permitió obtener una variante funcional en aerobiosis (Anr\*): debido a que el regulador Anr es activo en condiciones de baja tensión de O<sub>2</sub> y esta condición es en la práctica muy compleja de manipular. Esta proteína mutada Anr\*, obtenida durante mi tesis de Licenciatura (Ibarra, 2011) es de utilidad para determinar experimentalmente los blancos de acción de ANR (por ejemplo por la técnica de EMSA, *Electrophoretic mobility shift assay*).

También se analizaron distintos aspectos relacionados con la biorremediación de hidrocarburos que se relacionan con la supervivencia en condiciones de estrés. Se encontró que biofilms de *P. extremaustralis* mostraron mayor producción de biosurfactantes y degradación de diesel en comparación con cultivos planctónicos (Ayub et al. 2009; Tribelli et al. 2012). Un estudio comparativo mostró que *P. extremaustralis* posee un mejor desarrollo a 8°C que otras especies modelo como *P. putida* KT2440 y *P. protegens* Pf-5, observándose además la presencia en el genoma de una batería de genes que probablemente estén involucrados en la adaptación a distintos factores de estrés, como el frío (Raiger Lustman et al. 2015).

La obtención del genoma ha permitido encarar también estudios globales como el análisis del perfil transcriptómico (RNA-seq) y la detección de la sobreexpresión en frío de genes novedosos relacionados con el metabolismo de la oxidación del etanol (Tribelli et al. 2015) El análisis comparativo, a nivel genómico (Fig. 1.3) ubica a *P. extremaustralis* dentro de un subgrupo de las *Pseudomonas* Fluorescentes, que se destacan como promotoras del

crecimiento vegetal, principalmente, debido a su capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Meyer et al. 2011; Redondo-Nieto et al. 2013). Dentro de este grupo se encuentran especies aisladas de suelo y asociadas a raíces de numerosas plantas. Entre estos podemos destacar a *P. protegens* Pf-5, la especie más estudiada por sus características como promotora del crecimiento vegetal (Paulsen et al. 2005).

Las características particulares de esta especie, como la producción de PHB y la alta resistencia al estrés, así como otras generalizables a otras especies de *Pseudomonas* no patógenas hacen de *P. extremaustralis* una especie de interés para el estudio de procesos fisiológicos, como capacidad de colonización y promoción de crecimiento vegetal.

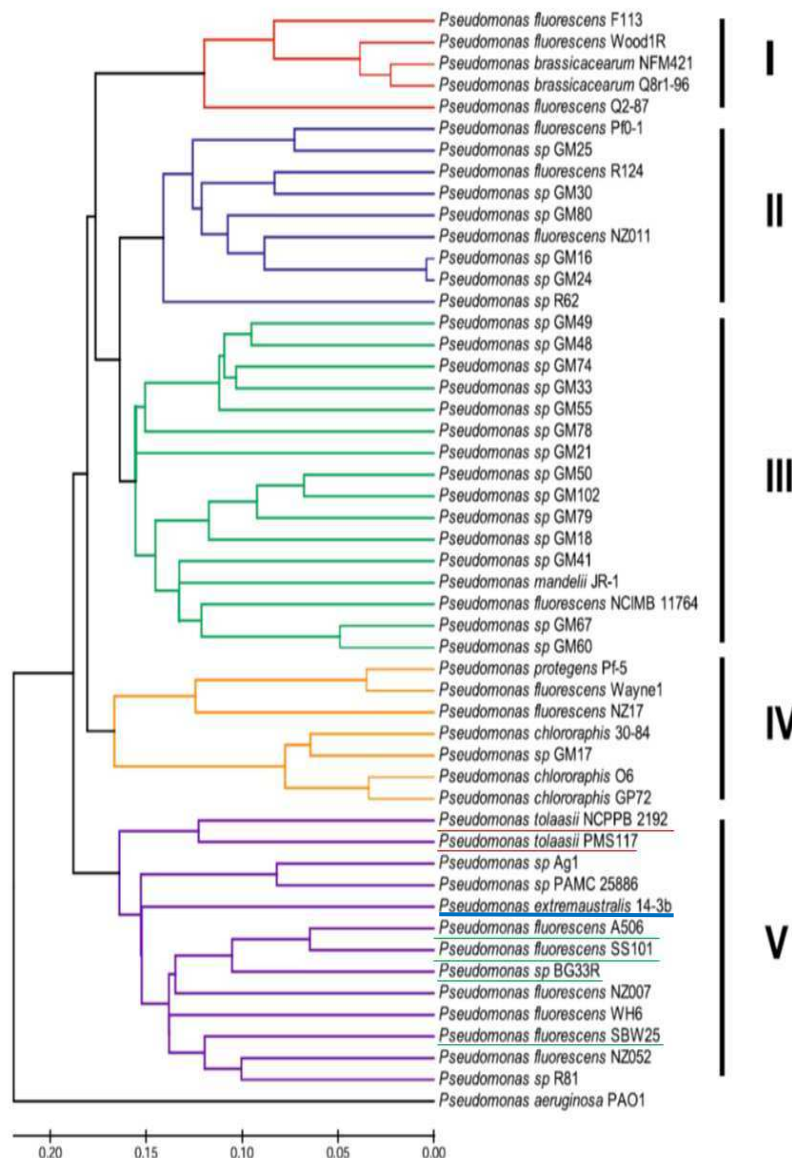


Figura 1.3: Análisis filogenómico de *Pseudomonas* pertenecientes al grupo de las Fluorescentes. Adaptado de (Redondo-Nieto et al. 2013) La escala representa divergencia de la distribución de Kmer. En esta figura podemos observar las *Pseudomonas* más cercanas filogenéticamente a *P.*

*extremaustralis* (subrayado azul). Muchas de las cuales han sido probadas como bacterias PGPR (subrayado verde) y algunas, las del subgrupo *tolaasii*, se las reconoce como patógenos fúngicos (subrayado rojo). Con diferentes colores se destacan los subgrupos (I a V) propuesto por Redondo-Nieto.

### **Hipótesis de trabajo:**

- *Bacterias resistentes a estrés tendrán un mejor desempeño como promotoras del crecimiento vegetal en condiciones desfavorables.*

La hipótesis del trabajo plantea que en ambientes sometidos a estrés por frío o por distintos regímenes hídricos se pueden hallar bacterias promotoras de crecimiento vegetal que sean eficientes para el mejoramiento de cultivos comerciales en áreas desfavorables

En base a esto se plantean los siguientes objetivos específicos.

### **Objetivos específicos del capítulo 1:**

Se propone que la combinación de estos microorganismos con plantas GM resistentes al estrés podría ser una buena alternativa para extender las regiones cultivables y para incrementar la productividad vegetal en regiones no favorables.

*Pseudomonas extremaustralis* es una nueva especie aislada y descrita por nuestro laboratorio procedente de la Antártida. Esta bacteria posee una alta resistencia a distintas condiciones de estrés y se ha obtenido la secuencia del genoma lo que ofrece muchas posibilidades para estudios genéticos. Hemos determinado que esta bacteria posee algunas características de interés como promotora del crecimiento vegetal, lo que junto con su alta resistencia a estrés hacen que constituya un buen modelo para el estudio de estas capacidades y de su interacción con cultivos vegetales de interés comercial.

Por otra parte, los suelos con diferentes regímenes de lluvias pueden resultar interesantes para el aislamiento de bacterias y su evaluación como potenciales promotores del crecimiento vegetal.

En base a esto se proponen los siguientes objetivos específicos:

1.- Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal a partir de suelos con distintos regímenes de lluvia.

2.- Análisis genómico y funcional de características genéticas relevantes para la promoción de crecimiento vegetal y resistencia a estrés osmótico en *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria procedente de ambientes extremos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas bacterianas*

*Pseudomonas extremaustralis* 14-3b (DSM 25547), aislado de una muestra de la Antártida (López et al 2009, Tribelli et al., 2012) y *P. protegens* Pf-5, una bacteria comensal vegetal que habita la rizósfera, con gran capacidad de biocontrol (Paulsen et al., 2005). Ambas cepas son capaces de crecer a baja temperatura (Raiger lustman et al., 2015). Además se utilizaron para este trabajo las siguientes mutantes de *P. extremaustralis* construidas previamente en el laboratorio: mutante deficiente en la síntesis de PHB (Ayub et al., 2009) y mutante del regulador global del crecimiento anaeróbico Anr (*anr*) (Tribelli et al. 2011). También se utilizó *P. extremaustralis* marcada con el plásmido pBBRMCS-2 conteniendo el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP)(Tribelli et al. 2013).

### *Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal a partir de suelos con distintos regímenes de lluvia.*

Se realizaron aislamientos de bacterias de muestras de suelo de dos regiones ubicadas en la provincia de Buenos Aires: Inés Indart, en el partido de Salto, y América, en el partido de Gral. Villegas. Los muestreos se realizaron en dos lotes diferentes en la localidad de Inés Indart, ubicados en el predio de la empresa *Status Ager* (34° 17.369' S, 60° 29.986' O) y en un solo lote de la localidad de América, ubicado en la estancia "El Recreo" (35° 26.076' S, 63° 00.433' O). Se tomaron muestras de suelo entre 0 y 20 cm de profundidad. Los suelos fueron analizados en cuanto a sus características físico-químicas (contenido de nitrato, fosfato, materia orgánica, pH, etc.) y clasificados de acuerdo a datos de bibliografía según el tipo de suelo.

Se tomaron aproximadamente 5 g de suelo de cada muestra, se resuspendió en solución fisiológica, realizando diluciones seriadas 1/10 y se realizaron cultivos en diferentes medios de cultivo de distintas diluciones. Los medios utilizados fueron agar nutritivo, agar manitol, agar King B. Para la selección de distintos grupos de bacterias. Los aislamientos obtenidos fueron analizados mediante pruebas bioquímicas en cuanto a características relevantes para la promoción del crecimiento vegetal tales como la producción de Ácido Indol Acético (AIA) y solubilización de fosfato inorgánico. (Meyer et al. 2011) Para el análisis de la capacidad de fijación de nitrógeno, se utilizó medio JNFb semisólido. Las placas de Petri fueron incubadas durante 15 días a 30°C.

### *Actividad de movilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos*

La capacidad de las cepas para movilizar fosfato se midió, en primera instancia, en medio NBRIP sólido (Nautiyal 1999) adaptado con la fuente de fósforo indicada en cada caso.

Las mediciones se realizaron en placas de Petri (92mm diámetro) conteniendo 14 ml de agar NBRIP. En todos los casos las placas se inocularon con gotas de 2  $\mu$ l (*spots*) de cultivos *overnight* (O.N.) realizados en LB. La solubilización de fósforo inorgánico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\text{AlPO}_4$ ;  $\text{FePO}_4 \cdot (4\text{H}_2\text{O})$  y Fosfato de Roca) o la mineralización de fitato se visualizó como la formación de halos claros alrededor de la siembra (*spots* bacterianos) después de la incubación a 8°C y 28°C durante 15 y 7 días, respectivamente para el fosfato inorgánico, y durante 4 y 2 días, respectivamente para el fosfato orgánico. La actividad por cepa bacteriana se evaluó realizando el cociente del diámetro de los halos dividido el diámetro del *spot* adaptado de (Meyer et al. 2011). Se utilizaron al menos tres cultivos independientes para cada cepa.

### *Solubilización de fosfato en medio líquido*

Se utilizaron cultivos de *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 en caldo NBRIP realizados en Erlenmeyers de 125 ml conteniendo 10 ml de medio suplementado con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo a 8 °C y 28 °C, se tomaron muestras de 1,5 ml cada 24, 48 y 72 h de cultivo, se centrifugaron en microcentrífuga a 12.000 rpm y se preservaron los sobrenadantes en freezer a -20 °C para la determinación de fósforo y ácidos orgánicos.

### *Determinación de ácidos orgánicos.*

Para la determinación de ácidos orgánicos, los sobrenadantes de los cultivos de *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 realizados en caldo NBRIP fueron filtrados (filtro de nylon 0,22  $\mu$ m) y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según el protocolo utilizado previamente en el laboratorio (Scervino et al. 2011). Se usó una columna Aminex HPX-87-H -0140) y un detector de UV fijado a 215 nm a 50°C. La fase móvil consistió en 5 mmol l<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> funcionando a un caudal de 6 ml min<sup>-1</sup>. Se utilizaron estándares comerciales de ácidos orgánicos para la determinación cuantitativa de los ácidos presentes en las muestras.

### *Determinación de fósforo en sobrenadantes de cultivos bacterianos*

La determinación del fosfato liberado se realizó por el método del Vanadato-Molibdato (Kitson y Mellon 1944). En el que se determina la concentración de P por colorimetría del complejo fosfo-vanadomolibdato.

Para esta determinación se prepararon los siguientes reactivos:

-Solución A: vanadato de amonio, 0,9 g/L.

Se disolvieron 0,9 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en 500 mL de agua hirviendo, se dejaron enfriar y se agregaron 24 mL de  $\text{HNO}_3$  69% (3.4.1) o 16 mL de  $\text{HNO}_3$  100% (3.4.2). Se llevó con agua a 1 L.

- Solución B: molibdato de amonio, 19 g/L.

Se disolvieron 19 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en agua a 50°C, se dejó enfriar y se diluyó a 1 L con agua.

- solución C: Ácido nítrico 1,5 M

Se diluyeron 97 mL de  $\text{HNO}_3$  69% (3.4.1) o 62 mL de  $\text{HNO}_3$  100% (3.4.2) con agua a 1 L.

- Solución estándar de fósforo, 1000 mg/L de P se obtuvo disolviendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua bidestilada + solución C en relación 7:1.

Para la determinación de fósforo en las muestras se tomaron 250  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes filtrados descritos anteriormente, se les agregó solución C en relación 7:1 y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de solución A y 100  $\mu\text{l}$  de solución B, respetando el orden de los reactivos. Se midió absorbancia en espectrofotómetro a 460 nm.

#### *Determinación de fósforo en tejidos vegetales.*

Se siguió el procedimiento descrito por (Sadzawka et al. 2004) en el que se toma el tejido vegetal, se coloca en sobres de papel en estufa a 80 °C hasta que se alcance peso constante, luego la muestra de tejido vegetal seca y molida se calcina a 500 °C en mufla. Se resuspendieron las cenizas en 2ml de ácido clorhídrico 1M, se realizó una dilución 1:100 de esta suspensión y se midió fósforo soluble por el método colorimétrico de Vanadato-Molibdato con el kit *fosfo test* (Merck).

#### *Medición de ácido indol acético (AIA)*

Para la detección de bacterias productoras de AIA, se hicieron cultivos en placas *multiwell*, con medio LB suplementado con 1g/L de Triptófano que se incubaron 28°C durante 24 horas. Se reveló con el reactivo de Salkowski. La aparición de color rosado indica la presencia de AIA. Para la cuantificación de la producción de AIA se realizaron cultivos en medio BDN durante 24 h. Se utilizó una curva patrón con Acido 3-Indol Acético comercial (Merck). Se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes de cultivos bacterianos y se les agregó 500  $\mu\text{l}$  de reactivo de Salkowski, luego de 15 minutos se midió absorbancia a 530 nm en espectrofotómetro.

### *Producción de pioverdinas*

Para la medición de las pioverdinas, los cultivos se realizaron en aerobiosis en Erlenmeyers de 125 ml conteniendo 10 ml de medio líquido King B a 8°C durante 72 h y a 28°C durante 24 h con agitación de 200 rpm. La producción de PVD se cuantificó por espectrofotometría, midiendo la fluorescencia de los sobrenadantes de los cultivos a 520 nm en fluorímetro. Esta medida se relativizó a DO para poder relacionar las diferentes cepas en diferentes condiciones. También se realizaron cultivos en microaerobiosis a 28°C durante 48 h en el mismo medio de cultivo en botellas de 100 ml conteniendo 50 ml de medio en agitación lenta a 50 rpm.

### *Material vegetal utilizado*

Semillas de maíz utilizadas en experimentos de colonización y pruebas con aislamientos: variedad P1979 R de Pioneer.

Semillas de trigo utilizadas, variedades Bagette 601 de NIDERA, y Don Mario Fuste de DON Mario.

Semillas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas: variedad Col0

### *Preparación de exudados radiculares*

Los exudados radiculares se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Yuan (Yuan et al., 2015) con algunas modificaciones. Se trabajó con semillas de trigo, estas semillas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en hipoclorito de sodio 3% v/v durante 10 minutos, agitando con vortex cada 2 minutos y posteriormente lavadas tres veces consecutivas con agua bi-destilada estéril, colocadas en placa de Petri con agar 0,5% durante 3 días para la germinación y selección de plántulas homogéneas. Estas se cultivaron en tubos de ensayo de 2,5 x 20 cm individuales conteniendo 30 cm<sup>3</sup> de perlita esterilizada y 15 ml de medio MS sin sacarosa. Estas plantas se cultivaron a 28 °C con un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad. Después 15 días de crecimiento fueron retiradas del sustrato y las raíces fueron suavemente lavadas con agua bidestilada estéril para eliminar la perlita adherida y colocadas en tubos de ensayo que contenían 30 ml de agua doble destilada estéril para la recolección del exudado de raíz durante siete días, manteniendo el periodo lumínico y temperatura. El volumen de agua remanente de 6 plantas se juntó y filtró a través de filtros de 0,22 µm de esteres de celulosa. Los exudados filtrados se liofilizaron y se redisolviaron concentrando 50 veces el volumen filtrado. Se almacenaron a -80 °C protegidos de la luz hasta el momento de su utilización. Esta extracción se realizó para cada variedad de semilla de trigo y los exudados fueron utilizados para ensayos cualitativos de quimiotaxis.

### *Ensayos de quimiotaxis*

Las bacterias fueron cultivadas ON en medio LB. El cultivo fue precipitado por centrifugación y resuspendido en el volumen necesario de solución fisiológica para alcanzar DO de 8 a 600 nm. Esta suspensión bacteriana se llevó a DO final de 0,8 en buffer de quimiotaxis (100 mM de fosfato de potasio pH 7,0, 20 µM EDTA, hidroximetilcelulosa 0,25 %). Se colocaron 7 ml de esta suspensión bacteriana en placas de Petri de 55 mm de diámetro y se agregaron 10 µl de exudados radiculares concentrados en el centro de la placa.

### *Desarrollo de raíces de Arabidopsis thaliana.*

Las semillas de *Arabidopsis* fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en hipoclorito de sodio 3% durante 10 minutos, y posteriores lavados con agua bidestilada esteril. Se germinaron colocándolas en placas de cultivo con medio MS a 4 °C en oscuridad durante 48 h. El cultivo de plantas se realizó en medio MS sin sacarosa en placas cuadradas de 10 cm de lado con periodo de luz 16/8 h luz/oscuridad, las placas fueron colocadas en posición vertical. Se colocaron 5 plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col0 de 2 días post germinación en cada placa. Se inculó sobre la radícula de cada planta con 2 ul de suspensión de *P. extremaustralis* DO 600 nm de 0.8 en solución fisiológica o con 2 ul de solución fisiológica como control sin bacterias. Luego de 4 y 10 días de cultivo se tomaron fotos de cada una de las plantas que fueron analizadas con el programa ImageJ.

### *Experimentos de colonización*

#### *Ensayos en tubos*

Se cultivaron plantas de trigo durante 10 días en tubos de ensayo de 2,5 x 20 cm conteniendo 30 ml de una mezcla 1:1 de arena y perlita como sustrato inerte. Los tubos se inocularon con una suspensión bacteriana de *P. extremaustralis* de manera de alcanzar una DO a 600 nm final de 0,1 en medio para cultivo de plantas *Murashige y Skoog* (MS) (Murashige y Skoog 1962) y MS modificado, conteniendo fosfato de calcio (MSCa), una fuente de fósforo no asimilable por las plantas. No se agregó sacarosa a este medio para impedir el excesivo crecimiento bacteriano. Siempre se realizaron los correspondientes controles sin bacteria. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado y luego de 10 días de cultivo en cámara con periodo de luz (16/8 h luz/oscuridad) y temperatura (25-30 °C) controlados, se cosecharon las plantas

y se efectuaron distintas mediciones para determinar el efecto de *P. extremaustralis* en el crecimiento de las mismas. Luego de cosechadas las plantas se lavaron las raíces, se escindieron de la parte aérea de la planta y, se extendieron cuidadosamente en una placa de vidrio. Se tomaron fotografías de cada una para cuantificar largo total, número de ramificaciones y número de raíces principales con el programa *ImageJ*. También se determinó el peso fresco de las raíces y el peso seco del vástago. Para esta última medición, la parte aérea de cada planta se colocó por separado en tubos de vidrio y se secó en estufa a 80°C hasta alcanzar peso constante, momento en el cual se registró el peso de cada planta. Luego de obtenido el peso seco del vástago los mismos se calcinaron en mufla a 500 °C para la medición de fósforo total en planta según se describió anteriormente.

#### *Ensayos en macetas*

Las plantas de trigo se cultivaron en macetas individuales de 250 cm<sup>3</sup> conteniendo tierra tinalizada como sustrato durante 30 días en cámara de cultivo con fotoperiodo (16/8 h luz/oscuridad) y temperatura controlados (25 ± 5°C). Se inoculó con una suspensión bacteriana tal que se alcanzara 10<sup>8</sup> UFC/g de tierra y se realizó un control sin inóculo. Cada tratamiento contó con 18 réplicas independientes.

Características del suelo utilizado luego de tinalizado: N total 1,53 g/Kg; C total 14,90 g/Kg; P asimilable 13,9 mg/kg; pH 5.1.

#### *Determinación del contenido de clorofila*

Se determinó el contenido de clorofila en hoja, tomándose la segunda y tercera hoja de cada planta para realizar esta medición. El contenido de clorofila se cuantificó extrayendo en cámara fría en oscuridad durante 6 días en etanol 100%. Para esto se colocaron las hojas cortadas en trozos de 2,5 cm de largo en viales cerrados herméticamente para evitar evaporación del etanol, se colocó etanol hasta cubrir por completo las hojas durante dos días, después de este tiempo se cambió el etanol y se preservó el etanol extraído en cámara fría en oscuridad, se repitió este procedimiento 3 veces y se juntaron las soluciones de etanol para medir el volumen final y poder determinar el contenido total de clorofila de cada muestra. Las hojas se secaron en estufa para relativizar el contenido de clorofila a peso seco. Se cuantificó el contenido de clorofila a y b de la solución de etanol según el protocolo de (Bruuinsma 1963).

#### *Análisis bioinformáticos y estadísticos*

Los genomas bacterianos se analizaron en busca de genes de interés utilizando programas disponibles en línea: BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>), MetaCyc y otras herramientas incluidas en el servidor

RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) y la base de datos de los genomas de *Pseudomonas* (<http://pseudomonas.com/>). La búsqueda de sitios de unión de reguladores (como FUR y Anr) se realizó con el programa PRODORIC (<http://www.prodoric.de/>). El análisis de los motivos estructurales de las proteínas de síntesis no ribosomal (NRPS) se realizó utilizando el programa ANTISMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) y NRSPREDICTOR2.

Los números de acceso a las secuencias del genoma son para *P. extremaustralis* AHIP01000001-AHIP01000135 (Tribelli et al., 2012) y para *P. protegens* Pf-5 CP000076.1 (Paulsen et al., 2005).

Las diferencias en las distintas variables medidas se analizaron utilizando el test de Student (t-test).

### *MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.*

#### *Composición de los medios de cultivo empleados*

##### *Medio Luria-Bertani (LB)*

Extracto de levadura 5 g/l; Triptona 10g/l; NaCl 10g/l; Agar (para el medio sólido) 15 g/l

##### *Medio NBRIP*

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 5 g/l; MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,25 g/l; KCl 0,2 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0,1 g/l; Glucosa 10 g/l; pH 7; Agar (para el medio sólido) 15 g/l

##### *Modificaciones:*

- Fuente de fósforo inorgánica asimilable: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,2 g/l
- Fuente de fósforo inorgánica no asimilable: Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g/l; AlPO<sub>4</sub> 1g/l; FePO<sub>4</sub> · (4H<sub>2</sub>O) 7g/l; Fosfato de Roca (Tennessee Brown P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 31.55%): 2,5g/l
- Fuente de fósforo orgánica no asimilable: Fitato de sodio 1g/l

##### *Medio BDN:*

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4g/l; KOH 2,1 g/l; NH<sub>4</sub>Cl 1 g/l; MgSO<sub>4</sub> – 7H<sub>2</sub>O 0,2 g/l; NaCl 0,1 g/L; FeCl<sub>3</sub> 0,01 g/l; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,002 g/l; pH: 6/6,2

Autoclavar y luego agregar: Triptofano 0,1 g (filtrado 0,22 μm); Glucosa 2,5g

##### *Medio King B*

Triptona 10g/l; Peptona de carne 10g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 g/l; Glicerol 15 g/l; pH: 7; Autoclavar y luego agregar: MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,5 g/l

##### *Preparación Medio MS (para 1 litro)*

Solución B 50 ml  
 Solución Fe-EDTA 10 ml  
 Solución  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 ml  
 Solución  $\text{MgSO}_4$  10 ml  
 Micro nutrientes 1 ml  
 Solución Vitaminas 10 ml  
 pH 5.5-5.8 (llevar a pH con NaOH)  
 Completar volumen con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada

*Preparación de Stocks, Composición % p/v:*

*Solución B*

$\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$  0,88 g/l;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3,3 g/l;  $\text{KNO}_3$  3,8 g/l;

*Solución  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :* 1,7 g/l;

*Solución  $\text{MgSO}_4$ :*

$\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$  3,7 g/l

*Solución Fe-EDTA:*

$\text{FeSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$  0,278

$\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,373 pH 4/4,8

*Solución de micronutrientes:*

$\text{H}_3\text{BO}_3$  0,62 g/l;  $\text{MnSO}_4 - 4\text{H}_2\text{O}$  2,23 g/l;  $\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$  0,86g/l; KI 0,083g/l;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$  0,025 g/l;  $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$  0,0025g/l;  $\text{CoCl}_2 - 6\text{H}_2\text{O}$  0,0025 g/l.

*Vitaminas: (mg/100ml)*

Mio-inositol 1000; Tiamina HCl 1; Ácido Nicotínico 5; Piridoxina-HCl 5; Glicina 20.

*Medio JNFb*

Por litro: 5 g de ácido malico, 0,6 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de NaCl, 0,2 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,066 g de FeEDTA, 2 ml of bromothymol blue, 2 ml of micronutrientes, 0,02 g de extracto de levadura y 4,5 g of KOH (pH 5,8). Para JNFb semisolido se agregó 1,9 g de agar por litro sin extracto de levadura. Los micronutrientes consistieron en 0,2 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,235 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,28 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,008 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0,024 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Agar nutritivo con la siguiente composición:*

Extracto de carne 3 g; Peptona de carne 5 g, Agar 15g, Agua destilada c.s.p. 1 l

*Agar Manitol (Composición por litro)*

Triptona 5,0 g; Peptona de carne 5,0 g; Extracto de carne 1,0 g; D-Mannitol 10,0 g; Rojo fenol 25,0 mg; Agar agar 15,0 g



*Medio de cultivo mineral M9 (Composición por litro)*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 g; NaCl 0,5 g; NH<sub>4</sub>Cl 1,0 g; Agua 478 ml.

Disolver las sales y autoclavar a 121°C. Una vez autoclavado y frío agregar asépticamente:

Glucosa (20%) 20 ml; MgSO<sub>4</sub> (Solución 1M) 2 ml; CaCl<sub>2</sub> (Solución 1M) 0,1 ml

Completar el volumen a 1litro con agua destilada estéril.

El medio sólido contiene 15g/l de agar agar.

*Reactivo de Salkowski (para 1litro):*

FeCl<sub>3</sub> 12 g; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,9 M.

## RESULTADOS

### **Primera parte: Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal a partir de suelos con distintos regímenes de lluvia.**

Esta parte de la tesis se centró en el aislamiento de bacterias a partir de suelos con diferentes regímenes de lluvias, y su evaluación como potenciales promotores del crecimiento vegetal. Los suelos que se utilizaron para realizar el aislamiento son los que se utilizaron también en este mismo trabajo para realizar el cultivo de plantas transgénicas resistentes a sequía, presentado en el segundo capítulo.

Como se describió en la introducción de este capítulo, las características que permiten a las bacterias promover el desarrollo vegetal están bien definidas y se conocen sus mecanismos.

#### **Objetivos**

El objetivo fue analizar suelos con diferentes características, en la búsqueda de PGPR que puedan ser eficientes en ambientes desfavorables desde el punto de vista agrícola.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1.- Aislamiento de bacterias de vida libre con características de promoción de crecimiento vegetal a partir de suelos con distintos regímenes de lluvia

Para ello se procedió de la siguiente manera:

.- Realización de pruebas bioquímicas en la búsqueda de características de importancia en la promoción del crecimiento vegetal

.- Ensayo de los aislamientos más prominentes en co-cultivo con plantas de maíz en condiciones controladas.

#### Características de los suelos utilizados

Se seleccionaron suelos que poseen diferencias agroclimáticas, de salinidad y régimen de lluvias. Los suelos utilizados provienen de Inés Indart (Bs. As.) y América (Bs. As.). Los muestreos se realizaron en dos lotes diferentes en la localidad de Inés Indart, ubicados en el predio de la empresa *Status Ager* (Geoposicionamiento: S 34° 17,369' O 60° 29,986') y en un solo lote de la localidad de América, ubicado en la estancia "*El Recreo*" (Geoposicionamiento: S 35° 26,076' O 63° 00,433').

El suelo de la localidad de Inés Indart con precipitación anual de 1000-1100mm y el de América de 800-900 mm.

### Aislamientos bacterianos:

Se obtuvieron unas 300 colonias de las cuales se seleccionaron 165 que presentaban morfología de colonia diferente (Tabla 1,1), utilizadas para los ensayos descritos a continuación. Las pruebas realizadas a todos los aislamientos fueron: producción de Ácido Indol Acético (AIA) según el protocolo de Glickmann y Dessaux (Glickmann y Dessaux 1995), solubilización de fosfato inorgánico (Meyer et al. 2011; Nautiyal 1999) y fijación de nitrógeno en medio JNFb semisólido durante 15 días tal como se describe en materiales y métodos.

Tabla 1.1: Número de aislamientos positivos para el test de producción de AIA, solubilización de fosfato y fijación de Nitrógeno.

	Agar manitol	Producción de AIA	Solubilización de fosfato	Fijación de nitrógeno
Inés Indart	74	10	3	0
América	--	--	--	--
	Agar nutritivo	Producción de AIA	Solubilización de fosfato	Fijación de nitrógeno
Inés Indart	37	3	3	0
América	15	2	5	--
	Agar King B	Producción de AIA	Solubilización de fosfato	Fijación de nitrógeno
Inés Indart	32	5	3	0
América	7	2	5	--

No se obtuvieron aislamientos bacterianos capaces de fijar N<sub>2</sub>.

A continuación se detallan los procedimientos seguidos para cada una de las pruebas realizadas.

**Bacterias productoras de ácido indol-acético:**

Para la detección de bacterias productoras de AIA, se hicieron cultivos en placas *multi well*, con medio LB suplementado con 1g/L de Triptófano. Se revelaron con el reactivo de Salkowski. Con esta técnica se observa color rosado cuando hay AIA presente en el medio de cultivo (Fig. 1.4).

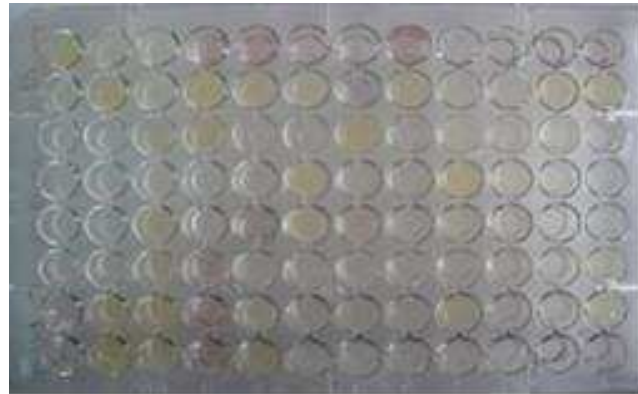


Figura 1.4: Método utilizado para identificar los aislamientos productores de AIA. Los pocillos que presentan coloración rosada son los positivos para índoles

Los aislamientos que dieron positivo en este ensayo se utilizaron para hacer una cuantificación de la producción de AIA (Figura 1.5). Se obtuvieron 22 aislamientos capaces de producir índoles, que se cultivaron en medio líquido BDN suplementado con triptófano 1g/l, seleccionándose 13 cepas que presentaban mayor coloración para realizar la cuantificación de la producción AIA, incluyendo en el análisis a *Pseudomonas extremaustralis*.

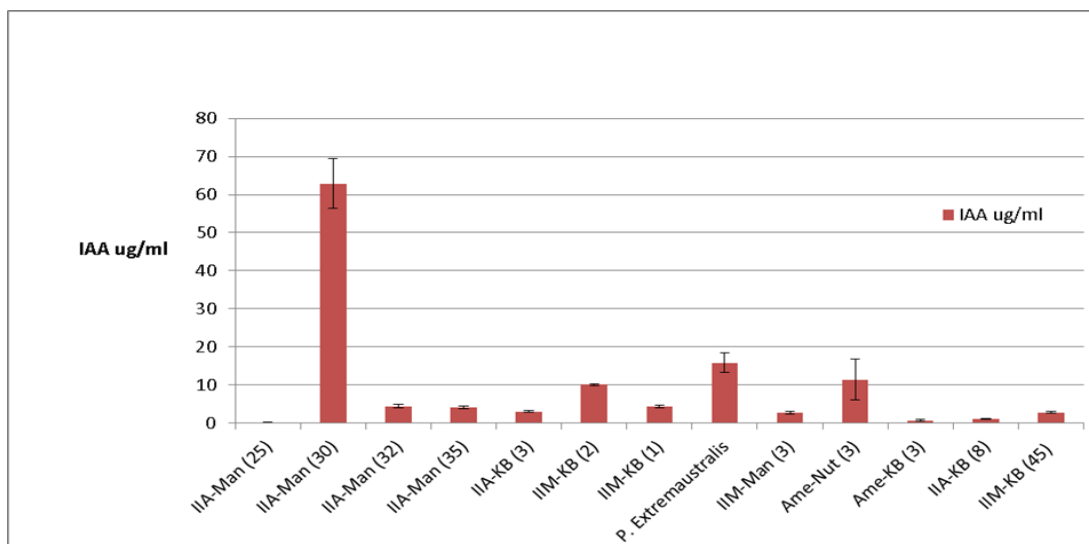


Figura 1.5: Cuantificación de la producción de AIA de los aislamientos que presentaron mayor coloración en las pruebas anteriores. Los cultivos se realizaron en medio BDN suplementado con triptófano, los aislamientos fueron realizados en: IIA: Inés Indart lote con alfalfa; IIM: Inés Indart lote con maíz; Ame: América. En los medios: Man: Manitol; Nut: Nutritivo; KB: King B.

Se encontraron varias cepas que producían AIA entre ellos *P. extremaustralis*.

El aislamiento II-KB (2) procedente de suelo de Inés Indart y aislada en medio de cultivo King B, mostró una producción de 10 µg/ml. El aislamiento IIA-Man (30) proveniente del suelo de Inés Indart y aislado en agar manitol, se destacó por su producción cercana a los 60 µg/ml.

Ninguna de las cepas testeadas produjo AIA en ausencia de triptófano y todas produjeron AIA en el rango de 5 a 20 µg/ml, a excepción del aislamiento mencionado anteriormente.

### Cultivo de plantas en presencia de los aislamientos productores de AIA.

Se seleccionaron dos aislamientos (IIA-Man (30) y II-KB(2)) para realizar ensayos con plantas en condiciones controladas. Se cultivaron plantas de maíz en medio MS con y sin Triptófano en presencia de las bacterias y se realizó un control sin bacterias. Se cuantificó el crecimiento de las plantas realizando mediciones del largo de vástago y peso seco de raíz.

Se observó un mayor crecimiento de las plantas cultivadas con la cepa IIM-Man (30) en medio MS suplementado con triptófano durante los primeros días de crecimiento (Fig. 1.6A). No se observaron diferencias de crecimiento en las plantas cuando se cultivaron con MS sin triptófano en presencia o ausencia de bacterias (Fig. 1.6B).

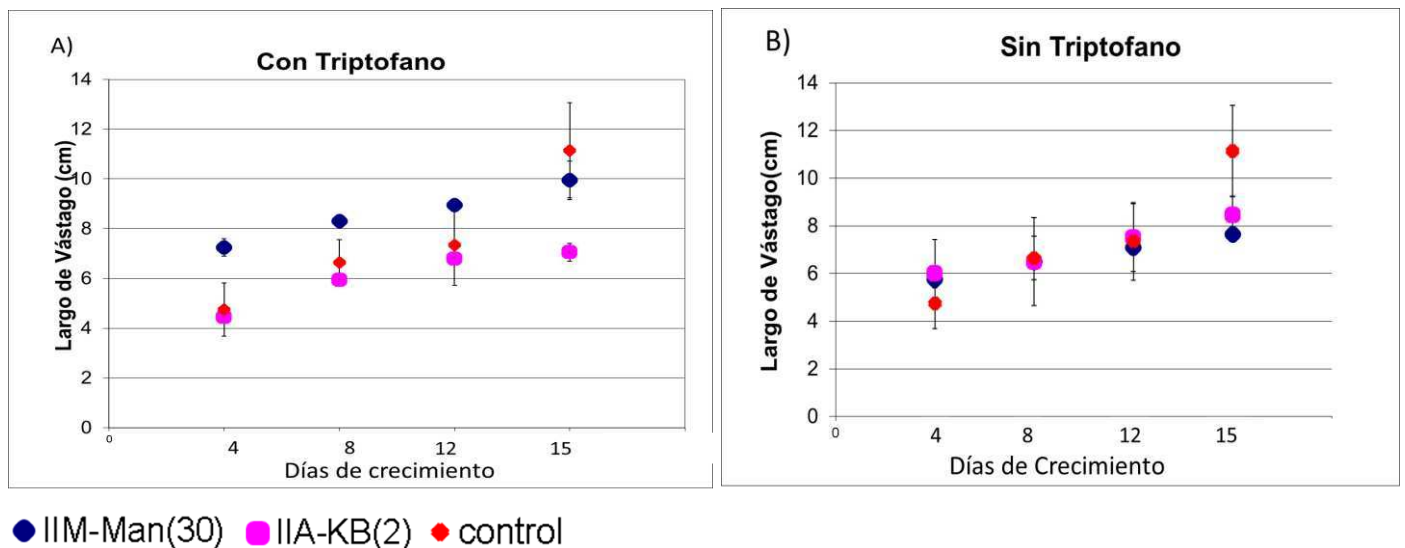
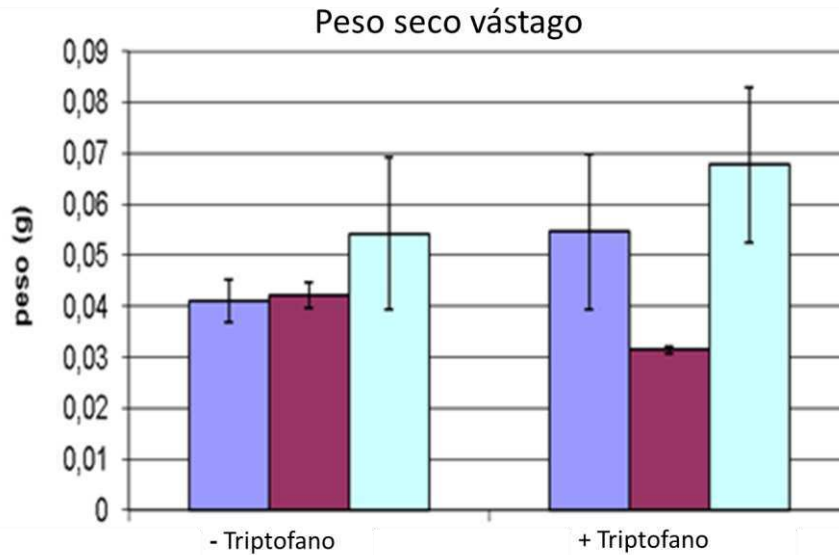


Figura 1.6 (A, B): Crecimiento de plantas durante 15 días en medio MS con y sin triptofano. Se cuantificó el largo de vástago. Los valores representan media  $\pm$  SD de 3 plantas de uno de dos experimentos independientes.

C)



D)

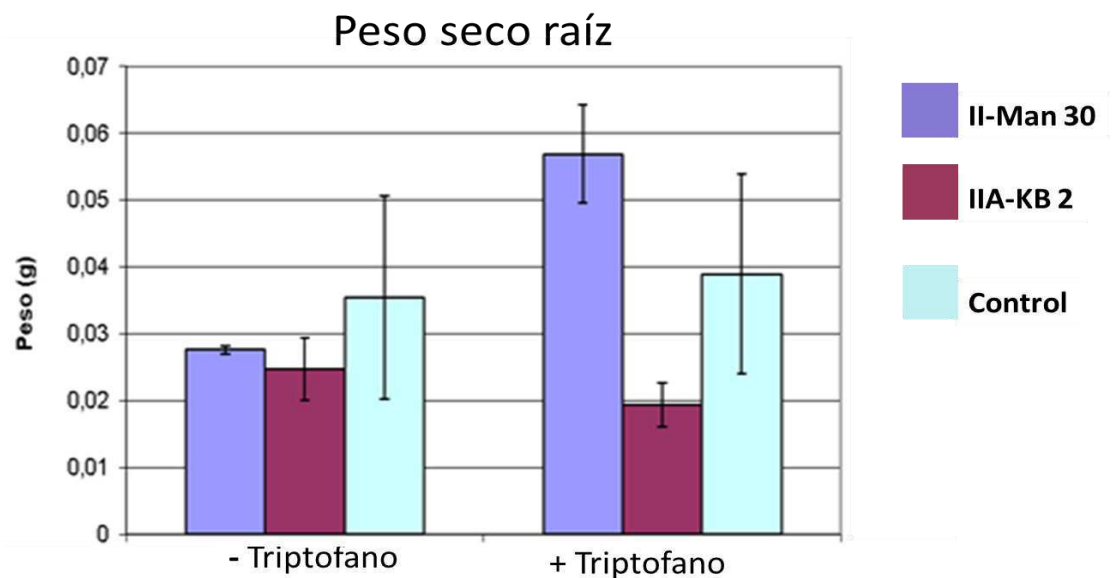


Figura 1.6 (D, C): Crecimiento de plantas durante 15 días en medio MS con y sin triptófano según se indica. Se cuantificó el peso seco de vástago y raíz. Los valores representan media  $\pm$  SD de 3 plantas de uno de dos experimentos independientes.

No se observaron diferencias en el peso seco del vástago (Fig. 1.6 C), ni en el peso seco de la raíz (Fig. 1.6 D). Luego de cosechadas las plantas se realizó una prueba de presencia de Indoles en el medio remanente. En este ensayo no se detectó presencia de AIA en los medios de cultivo cuando las bacterias fueron co-cultivadas con plantas. Esto puede deberse a una inhibición por parte de las plantas de la producción bacteriana de AIA o a un consumo del AIA producido por parte de la planta. Para poder analizar este efecto, se tomaron alícuotas de los medios de cultivos que se utilizaron para hacer los controles de este ensayo, planta sin bacteria. En ellos se cultivaron las dos cepas bacterianas y una no productora a fin de determinar si en este medio, ahora sin la planta, eran capaces de producir AIA.

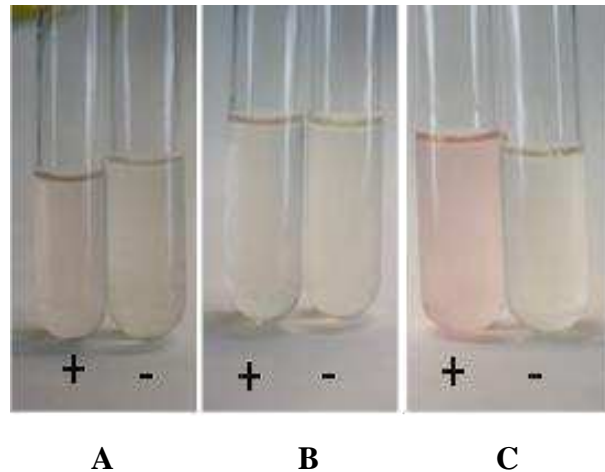


Figura 1.7: Producción de AIA en medio utilizado por plantas de maíz: A y C cepas productoras de AIA con triptófano (+) y sin triptófano (-). B cepa no productora de AIA.

Se observa que solo las bacterias que producen AIA lo hacen en medio con triptófano utilizado previamente para el cultivo de plantas, indicando que las plantas de maíz no inhiben la producción de AIA a través de exudados radiculares. Esto podría indicar que el AIA producido por las bacterias en co-cultivo con las plantas es absorbido por las mismas (Fig. 1.7).

No se detectó coloración rosada en los medios que no estaban suplementados con triptófano, esto indica que las bacterias testeadas no producen indoles (o lo hacen en muy baja concentración) a partir de los compuestos presentes en el medio por exudados radiculares (Fig. 1.7).

#### **Solubilización de $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$ :**

Se realizaron cultivos de los aislamientos previamente descritos y de *P. extremaustralis* en medio NBRIP agar durante 5 días. La solubilización de fosfato se detecta por una zona clara alrededor de la colonia (Fig. 1.8).

De todas las cepas se encontraron 19 capaces de solubilizar fosfato tricálcico. Se cuantificó la capacidad solubilizadora según se describió en materiales y métodos haciendo una relación de tamaño del halo en función del tamaño de la colonia.

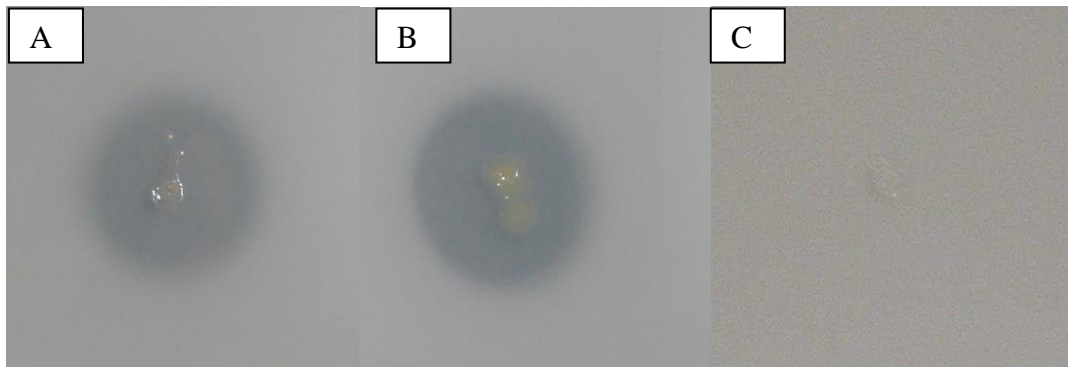


Figura 1.8: Solubilización de fosfato tricalcico en medio NBRIP agar. A) *P. extremaustralis*. B) Aislamiento positivo para la solubilización de fosfato de calcio. C) Aislamiento negativo para la solubilización de fosfato.

Cuatro de los aislamientos, procedentes de Inés Indart, mostraron una alta relación del tamaño de la colonia respecto al tamaño del halo de solubilización.

IIM-Man (4): 9/2 en mm, aislado en agar manitol.

IIM-Man (5): 11/2 en mm aislado de agar manitol.

IIA-KB (6): 10.0/3 en mm, aislado en King B.

IIA-NU (8) 10.0/5 en mm, aislado en agar nutritivo.

*P. extremaustralis* mostró una excelente capacidad solubilizadora de fosfato con un índice de solubilización de: 8/1 en mm.

## Cultivo de plantas en presencia de los aislamientos solubilizadores de fosfato

Se cultivaron plantas de maíz en tubos de vidrio (Fig. 1.9), con arena y perlita como sustrato inerte. Se utilizó MS y MS modificado, con  $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$ , como única fuente de fósforo en presencia de los aislamientos solubilizadores de fósforo *IIM-Man 4*, *IIM-Man 5*. Se realizó un control sin inóculo bacteriano. Se cuantificó el crecimiento de las plantas realizando mediciones del largo de vástago y peso seco de raíz.



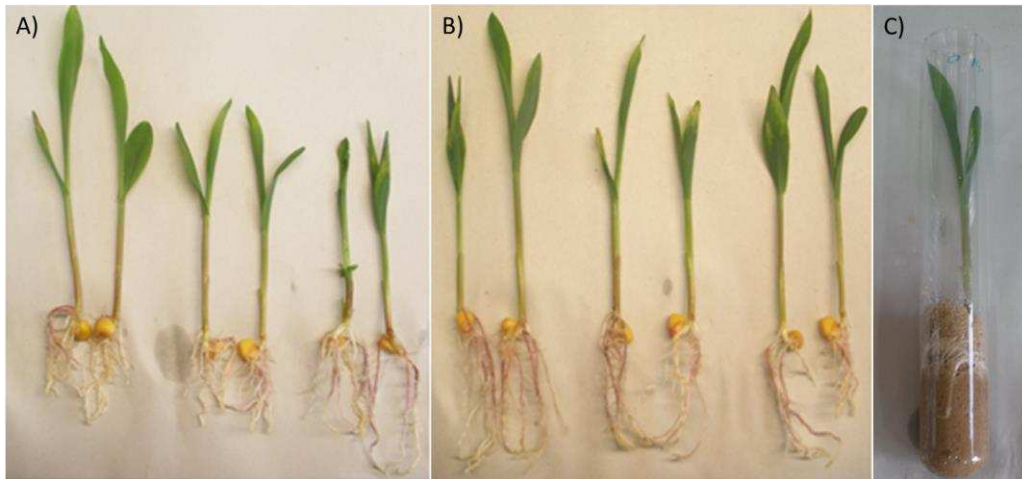


Figura 1.9: Imagen representativa de la condición de las plantas en este ensayo. A) Plantas cultivadas en medio de cultivo MS con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. B) Plantas cultivadas en medio MS con fuente de fosforo asimilable. C) Sistema utilizado para el cultivo de las plantas.

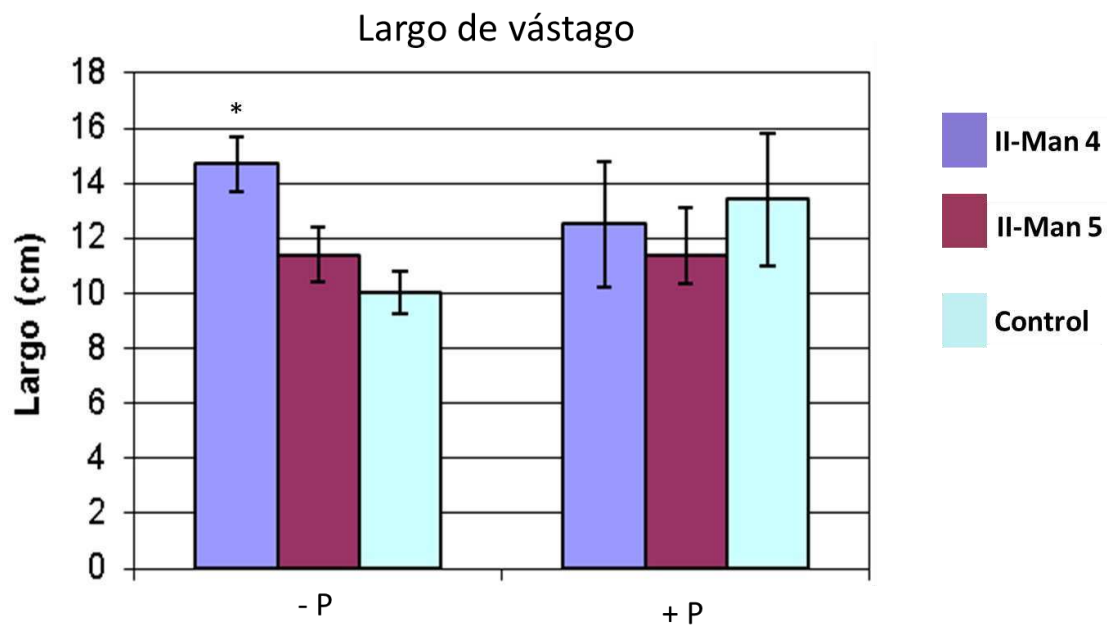


Figura 1.10: Medición del largo de vástago en plantas de maíz cultivadas en medio MS con fuente de fosforo no asimilable (-P) y MS con fuente de fosforo asimilable (+P). Se utilizaron dos aislamientos solubilizadores de fosforo; *IIM-Man 4*, *IIM-Man 5* y un control sin bacterias.

Se observó un aumento significativo en el largo del vástago con respecto al control (sin bacterias) en el tratamiento con la cepa *II-Man (4)* cuando las plantas fueron cultivadas en medio MS con fosfato tricálcico ( $P < 0.05$ , test de t de Student) (Fig. 1.10). No se observaron diferencias en el peso seco de raíz ni vástago en ninguno de los tratamientos (no mostrado).

No se observaron diferencias cuando se utilizó  $H_2PO_4$  como fuente de fósforo para el crecimiento de las plantas, indicando que la cepa *II-Man (4)*, solubilizadora de fosfato, tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de maíz aumentando el largo de vástago (Fig. 1.10).

## **Parte 2: Análisis de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de *Pseudomonas extremaustralis*.**

A partir de los resultados de la primera parte de este capítulo, en donde se incluyó a *P. extremaustralis*, que mostró una alta capacidad de producción de AIA y una buena capacidad de solubilización de fósforo, resultó de sumo interés continuar analizando esta cepa con respecto a otras características relacionadas a la promoción del crecimiento vegetal y a su capacidad de interactuar con plantas. El interés en profundizar en este aspecto radica en que esta especie, aislada por nuestro laboratorio de una charca temporaria de la Antártida, es una cepa cercanamente filogenéticamente a otras *Pseudomonas* aisladas de suelos y asociadas a raíces de diferentes plantas de las cuales se sabe tienen efecto sobre el crecimiento y salud de las plantas.

Los resultados de este análisis se detallan a continuación:

### **Objetivos específicos del capítulo 1:**

En esta parte se analizaron las características relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal de *Pseudomonas extremaustralis*. En base a las características de esta bacteria, procedente de un ambiente extremo, se plantea que en ambientes sometidos a estrés por frío se pueden hallar bacterias promotoras de crecimiento vegetal que sean eficientes para el mejoramiento de cultivos comerciales.

En esta sección se desarrollará el objetivo específico número 2 descrito en la introducción general:

2.- Análisis genómico y funcional de características genéticas relevantes para la promoción de crecimiento vegetal y resistencia a estrés osmótico en *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria procedente de ambientes extremos.

Este objetivo puede ser dividido en las siguientes actividades:

2.1. Análisis genómico de características genéticas relevantes para la promoción de crecimiento vegetal y resistencia a estrés osmótico

2.2. Análisis funcional de algunas características relevantes para la promoción de crecimiento vegetal en condiciones de estrés

2.3. Estudio de la colonización de *P. extremaustralis* y su efecto en plantas crecidas en condiciones controladas

## RESULTADOS

### Búsqueda de genes relacionados con la promoción de crecimiento vegetal en el genoma de *P. extremaustralis*.

Se realizó la búsqueda bioinformática de los genes involucrados en la promoción de crecimiento vegetal en el genoma de *P. extremaustralis*. Los genes de interés se identificaron realizando análisis comparativos con *P. protegens* Pf-5 y otras *Pseudomonas* como *P. fluorescens* SBW25, en las cuales ya fueron descritos y están bien caracterizados, utilizando herramientas disponibles *on-line*, tal como se indicó en materiales y métodos.

Las especies para realizar la comparación se seleccionaron en base a trabajos previos del laboratorio que analizaron la hibridación *in silico* de los genomas de estas especies con el de *P. extremaustralis*. Si bien se observó un porcentaje de hibridación menor al 70%, indicativo de que se trata de especies diferentes, todas pertenecen al grupo de las Fluorescentes y están cercanamente emparentadas filogenéticamente (ver también Fig. 1.3 de introducción). A nivel del genoma, la mayor similitud se observó con *P. fluorescens* SBW25 con un  $39.50 \pm 2.51$  %, mientras el porcentaje de similitud con *P. protegens* Pf-5 fue de  $30.80 \pm 2.45$  % (Raiger lustman et al. 2015). Además estas dos especies se encuentran en hábitats terrestres asociadas a la superficie de raíces y hojas de plantas (Silby et al. 2009).

Los resultados del análisis bioinformático se presentan en la Tabla 1.2, en la que se resume la información de los genes presentes en el genoma de *P. extremaustralis* implicados en la promoción del crecimiento vegetal, por distintos mecanismos descritos en la introducción de este capítulo. Además se describen genes involucrados en la síntesis de osmolitos que están relacionados con la adaptabilidad y aportan a la bacteria resistencia a estrés osmótico, necesario para la supervivencia en ambientes sometidos a estrés hídrico como el suelo.

Tabla 1.2 Comparación de la secuencias de los productos de los genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal en *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5.

Característica	Gen	<i>P. extremaustralis</i> (locus_tag)	<i>P. protegens</i> Pf-5 (locus_tag)	N° de aa	Similitud (%)	Identidad (%)
<b>Movilización de P</b>						
Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ	<i>gcd</i>	PE143B_0109220	PFL_4916	803	83	71
Gluconato deshidrogenasa	<i>gad</i>	AUSENTE	PFL_0054	594	--	--
Fitasa		PE143B_0110420	PFL_3714	621	82	73
Fosfatasa Alcalina	<i>phoD</i>	PE143B_0127590	AUSENTE	524	--	--

Característica	Gen	<i>P. extremaustralis</i> (locus_tag)	<i>P. protegens</i> Pf-5 (locus_tag)	Nº de aa	Similitud (%)	Identidad (%)
Fosfatasa Ácida clase A		PE143B_0129305	AUSENTE	271	--	--
<b>Producción de AIA</b>						
Triptofano mono-oxigenasa		PE143B_0120965	PFL_5670	560	96	94
Indolacetamida hidrolasa		PE143B_0116610	PFL_2778	566	95	90
Nitrilasa		PE143B_0112535	PFL_2909	306	92	84
<b>ACC deaminasa</b>	acdS	PE143B_0113600	PFL_3968	296	85	76
<b>Resistencia al ácido fusárico</b>		PE143B_0115885	PFL_0155	690	89	84
	<i>fusA</i>	PE143B_0117495	PFL_1003	503	90	83
	<i>fusBCD</i>	PE143B_0117490	PFL_1004	725	95	90
	<i>fusE</i>	PE143B_0117480	PFL_1006	286	96	93
<b>Resistencia osmotica</b>						
Metabolismo de Betaina	<i>bat1</i> <i>bat1like</i>	PE143B_0103810 PE143B_0106920	AUSENTE AUSENTE	508	--	--
Transporte de Betaina	<i>betT</i>	PE143B_0125315	PFL_0251	666	97	92
Biosíntesis de Betaina a partir de colina	<i>betA</i>	PE143B_0118975 PE143B_0119450	PFL_5768 AUSENTE	657 555	97 --	93 --
Biosíntesis de Betaina a partir de colina	<i>betB</i>	PE143B_0118980	PFL_5767	490	97	95
Biosíntesis de Betaina a partir de colina	<i>betI</i>	PE143B_0118985	PFL_5766	197	90	87
Transporte L-Prolina/Glicina betaina	<i>proP</i>	PE143B_0114875 PE143B_0114910 PE143B_0117995  PE143B_0123260 PE143B_0124355	AUSENTE AUSENTE AUSENTE  PFL_5226 PFL_6120	339 444 449  430 429	-- -- --  91 90	-- -- --  85 82
Transporte L-Prolina/Glicina betaina	<i>proV</i>	PE143B_0116900 PE143B_0118990	PFL_0868 PFL_5763	 385	95 97	97 93
Transporte L-Prolina/Glicina betaina	<i>proW</i>	PE143B_0116895 PE143B_0116885  PE143B_0118995	PFL_0868 PFL_0871  PFL_5763	217 283  281	92 92  98	97 97  96
Transporte L-Prolina/Glicina betaina	<i>proX</i>	PE143B_0116890 PE143B_0118400 PE143B_0119000 PE143B_0119045	PFL_0870 PFL_0030 PFL_5762 PFL_5752	297 305 318 314	96 91 94 92	91 83 89 87
Síntesis de Betaina a partir de glicina	<i>gsmT</i>	PE143B_0119725	AUSENTE		--	--
Síntesis de trehalosa	AHIP010 00002.1	PE143B_0102110	PFL_2884	926	80	71
Síntesis de Trehalosa	<i>treZ</i>	PE143B_0102120	PFL_2886	598	77	68
Síntesis de trehalosa	<i>treX</i>	PE143B_0102100	PFL_2882	719	95	90
Síntesis de trehalosa	<i>treS</i>	PE143B_0127305	PFL_2873	1115	98	83
Transporte de K	<i>kdpF</i> <i>kdpA</i> <i>kdpB</i> <i>kdpC</i> <i>kdpD</i> <i>kdpE</i> <i>kdpF</i> <i>kdpA</i> <i>kdpC</i> <i>kdpB</i> <i>kdpD</i>	No anotado PE143B_0122030 PE143B_0122035 PE143B_0122040 PE143B_0122045 PE143B_0122050 PE143B_0115055 PE143B_0115050 PE143B_0115045 PE143B_0115040 PE143B_0115035	 PFL_4297 PFL_4296 PFL_4295 PFL_4294 PFL_4293 AUSENTE AUSENTE AUSENTE AUSENTE AUSENTE AUSENTE	 564 694 181 883 231 568 219 689 883 230	 96 94 90 92 96 -- -- -- -- -- --	 93 90 82 88 94 -- -- -- -- -- --

En *Pseudomonas*, la solubilización de fosfatos inorgánicos implica la producción de ácidos orgánicos. En la mayoría de las especies, las reacciones consecutivas catalizadas por los productos de los genes *gcd* y *gad* convierten la glucosa en ácido glucónico y este compuesto en 2-cetogluconato (2-KG), respectivamente (De Werra et al. 2009). La búsqueda de estos genes en el genoma de *P. extremaustralis* 14-3b reveló la presencia de *gcd* (PE143B\_0109220) que codifica una glucosa deshidrogenasa unida a la membrana dependiente de la pirroloquinolina quinona (PQQ) como cofactor enzimático. La región genómica mostró un alto grado de sintenia con *P. fluorescens* SBW25 y varias diferencias con *P. protegens* Pf-5 (*gdc*, PFL\_4916) (Figura 1.11). Los genes que codifican la pirroloquinolina quinona (*pqqFABCDE*) se localizaron en otra región genómica. El análisis del grupo de genes *pqq* en *P. extremaustralis* también mostró organización similar a la observada en *P. fluorescens* SBW25 dado que *pqqG* está ausente y no se encontraron copias adicionales de *pqqA* y *pqqB*, que están presentes en *P. protegens* Pf-5.

La reacción consecutiva de oxidación de la glucosa está codificada por *gad* que codifica la gluconato deshidrogenasa en *P. protegens* Pf-5. Sin embargo, el homólogo de *gad* no pudo ser identificado en el genoma de *P. extremaustralis*.

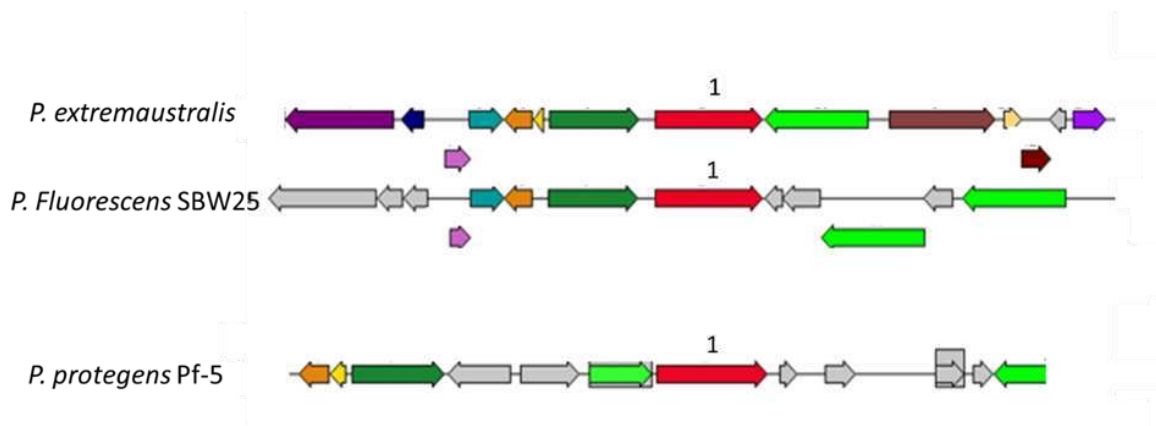


Figura 1.11: Comparación de la región genómica que contiene el gen *gcd* que codifica la gluconato deshidrogenasa (1) en *P. extremaustralis* en comparación con *P. fluorescens* SBW25 y *P. protegens* PF-5. Las flechas con el mismo color significan genes homólogos. Referencias: 1: *gcd* Glucosa; deshidrogenasa dependiente de PQQ.

La movilización de fosfato a partir de compuestos orgánicos está determinada por la presencia de enzimas que hidrolizan estos compuestos. Las sales de ácidos fíticos son una de las fuentes orgánicas de fósforo más abundante en el suelo y las fitasas son enzimas clave en el ciclo del fósforo y se encuentran relacionadas a la promoción del crecimiento vegetal en otros microorganismos (Singh y Satyanarayana 2010). Esta enzima transforma polifosfatos de

inositol, en inositol y fosfato inorgánico. *P. extremaustralis* presenta un gen que codifica una fitasa del tipo 3 que posee alta similitud (Tabla 1.2) con la fitasa presente en *P. protegens* Pf-5. En la Figura 1.12 se observa el arreglo genético que rodea al gen de la 3-Fitasa. En las tres especies comparadas se observa el mismo entorno genético.

Otro grupo de enzimas importantes en la movilización de fósforo en el suelo son las fosfatasas alcalinas y fosfatasas ácidas (Rodríguez y Fraga 1999; Saghir et al. 2014). Estas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de numerosos compuestos orgánicos, proteínas, alcaloides, nucleótidos entre otros, liberando fosfato inorgánico. Se encontraron dos genes que codifican una fosfatasa alcalina y una fosfatasa ácida, ambos genes están ausentes en *P. protegens* Pf-5.

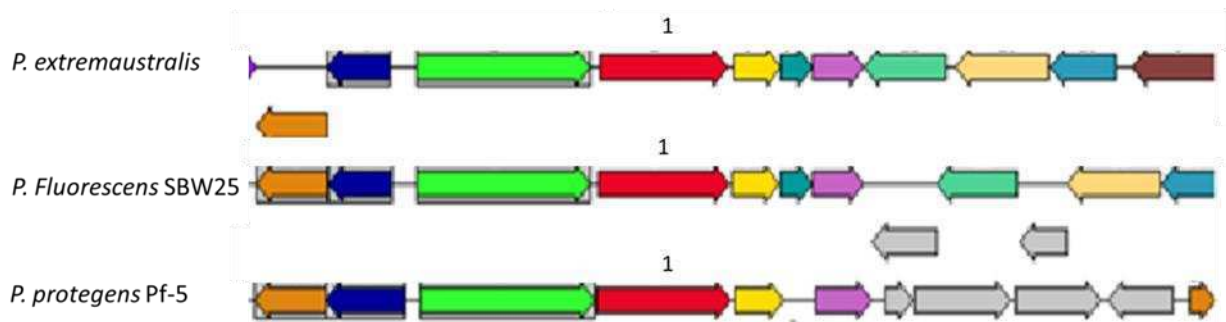


Figura 1.12: B) Comparación de la región genómica que contiene el gen de la 3-fitasa (1; flecha roja) en *P. extremaustralis* en comparación con *P. fluorescens* SBW25 y *P. protegens* PF-5. Mismo color en las flechas indican alta homología de secuencia.

Se encontraron genes relacionados a la síntesis de ácido indol acético (AIA), que incluyen las enzimas triptofano monooxigenasa y la enzima indolacetamida-hidrolasa (Tabla 1.2 ) las que completan la ruta de síntesis llamadas IAM y la enzima Nitrilasa que completa la vía denominada IAN (Figura 1.13).

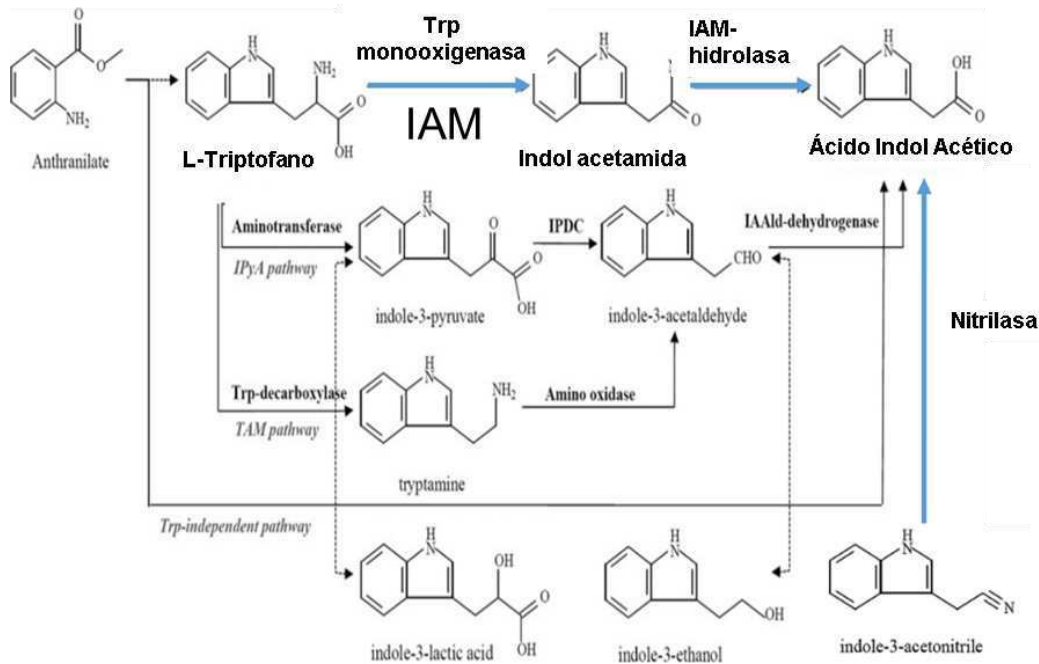


Figura 1.13: Diferentes vías de síntesis de ácido indolacético propuestas para bacterias, adaptado de (Cassán et al. 2014). En azul se muestran las rutas encontradas en *P. extremaustralis* en el análisis in silico del genoma.

El gen que codifica la nitrilasa, presente también en *P. protegens* Pf-5, posee alta similitud con los genes descritos para nitrilasas de plantas. Sin embargo, la participación de esta enzima en la síntesis de AIA en bacterias es cuestionada (Cassán et al. 2014).

En la Tabla 1.2 podemos observar la comparación del marco abierto de lectura PE143B\_0113600, que codifica un gen homólogo al gen *acdS* de *P. protegens* Pf-5. Este gen es de relevancia en la promoción del crecimiento vegetal porque codifica la enzima ACC desaminasa la cual degrada el ACC en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato. La importancia de esta enzima en la promoción del crecimiento vegetal radica en que provoca la disminución en los niveles de etileno de las plantas debido a la degradación del precursor ACC, tal como se describió en la introducción de este capítulo.

Además de los genes anteriormente mencionados relacionados con actividades de promoción de crecimiento vegetal, como son la biofertilización y la bioestimulación, en la Tabla 1.2 también se describen los genes involucrados en resistencia a ácido fusárico y a estrés osmótico. Estas características pueden ser relevantes para la supervivencia en suelo en presencia de compuestos producidos por hongos patógenos y en condiciones de estrés hídrico. El ácido fusárico es un metabolito producido por hongos del género *Fusarium* que es perjudicial tanto para plantas como para bacterias (Hu et al. 2012). El análisis del genoma de *P. extremaustralis* mostró la presencia de 4 ORF con similitud a secuencias relacionadas con la resistencia a ácido

fusárico en *P. protegens* Pf-5 (Tabla 1). Estos genes codifican sistemas similares a bombas de eflujo.

La resistencia a estrés osmótico se da por la acumulación de moléculas pequeñas llamadas osmolitos que mantienen el balance osmótico de la célula en situaciones de alto potencial osmótico ambiental (Gunasekera et al. 2008). *P. extremaustralis* posee una batería de genes que codifican solutos compatibles que funcionan como osmolitos. Entre ellos Glicina-betaina (GB) es uno de los más efectivos y de mayor distribución. Los genes relacionados a la síntesis de GB se encontraron en ambas cepas (Tabla 1.2) y están conservados en muchas especies de *Pseudomonas* (Raiger lustman et al. 2015). Una particularidad de *P. extremaustralis* en el metabolismo de GB es que posee el gen *gsmT*, el cual codifica para la proteína (glicin-sarcosin metil transferasa) clave en la síntesis de GB a partir de glicina. Este gen suele no estar presente en bacterias. La síntesis de GB a partir de glicina esta descrita en Haloarchaeas como *Aphanothece halophytica* y *Methanohalophilus portucalensis*. La secuencia de la proteína deducida *GmsT* presente en el genoma de *P. extremaustralis* posee una alta similitud e identidad con las descritas en estas Archaeas. *P. fluorescens* SBW25 también posee el gen *gmsT* y la proteína deducida a partir de la secuencia de ésta presenta 83 y 94 % de identidad y similitud, respectivamente con la de *P. extremaustralis* (Raiger lustman et al. 2015). La presencia del gen *gsmT* permitiría a *P. extremaustralis* y *P. fluorescens* SBW25 acumular sarcosina, un compuesto considerado osmoprotector, sugiriendo una función en el balance osmótico de esta cepa.

También se encontraron todos los genes necesarios para la síntesis de trehalosa a partir de maltosa y glucógeno (*treYZXS*) en *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 (Tabla 1.2).

Otro mecanismo importante en la resistencia osmótica es la incorporación de potasio por el sistema dependiente de ATP *kdpFABC* el cual es regulado por *KdpD* y *KdpE* y descrito en *E. coli* (Irzik et al. 2011). En *P. extremaustralis*, se encontraron dos sistemas de transporte de K con diferente orden génico. Uno de ellos está presente también en *P. protegens* Pf-5 (Tabla 1.2) y se ubica en una isla genómica. El análisis filogenético de la secuencia de *KdpC* relaciona este *cluster* con los encontrados en el género *Burkholderia* sugiriendo un evento de transferencia horizontal. El segundo *cluster* presenta alta similitud con el encontrado en la mayoría de las *Pseudomonas* (Raiger lustman et al. 2015).



## **Análisis de la funcionalidad de los genes encontrados**

Entre los métodos directos de promoción de crecimiento vegetal se destacan la biofertilización por provisión de nutrientes y la bioestimulación que involucra la síntesis de hormonas que favorecen el crecimiento vegetal. A partir del análisis genómico de *P. extremaustralis* nos propusimos estudiar la funcionalidad de algunas de las características encontradas relacionadas con estos mecanismos.

Nos centramos en la capacidad de movilización de fósforo tanto orgánico como inorgánico y en producción de ácido indol acético (AIA), también se probó la capacidad de crecimiento de la cepa en ACC.

## **Solubilización de distintas fuentes de fósforo en medio sólido**

Se realizaron ensayos de crecimiento en placa utilizando medio NBRIP modificado con diferentes fuentes de fósforo, fosfato de roca, fosfato de hierro, fosfato de aluminio, y fosfato de calcio, como fuentes inorgánicas y fitato de sodio como fuente orgánica. (Fig. 1.14). Se observa que *P. extremaustralis* es capaz de solubilizar fosfato de calcio y mineralizar el fitato de sodio. En las placas de fosfato de roca, Fe y Al no se observó halo de solubilización pero si crecimiento de la cepa (Fig. 1.14). Esto podría indicar que el nivel de solubilización no es muy alto y por eso no se observa un halo claro alrededor de la colonia, aunque también podría indicar un crecimiento a partir del fósforo disuelto en el medio.

A partir de este resultado se continuó con la cuantificación de la solubilización de fósforo en placa en diferentes condiciones de cultivo utilizando las fuentes de fósforo con las que se evidenció solubilización por halo.

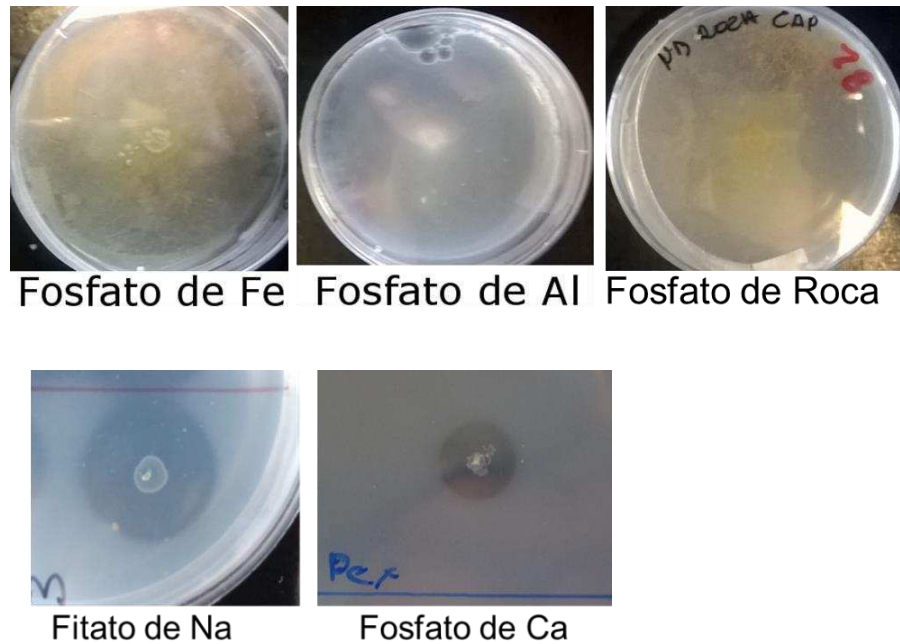


Figura 1.14: Solubilización de diferentes fuentes de fósforo por *P. extremaustralis* en placa, se utilizaron 4 fuentes de fósforo inorgánicas ( $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y fosfato de roca) y una fuente de fósforo orgánica fitato de Sodio.

#### Cuantificación de la solubilización de fosfato tricálcico en medio sólido.

Se analizó la capacidad de solubilizar P inorgánico de *P. extremaustralis* en comparación con *P. protegens* Pf-5 a diferentes temperaturas (8°C y 28 °C). Luego de incubar 7 días en la condición de 28°C y 15 días a 8°C se midió el diámetro del *spot* y el diámetro del halo de solubilización y se realizó el cociente entre ambos.

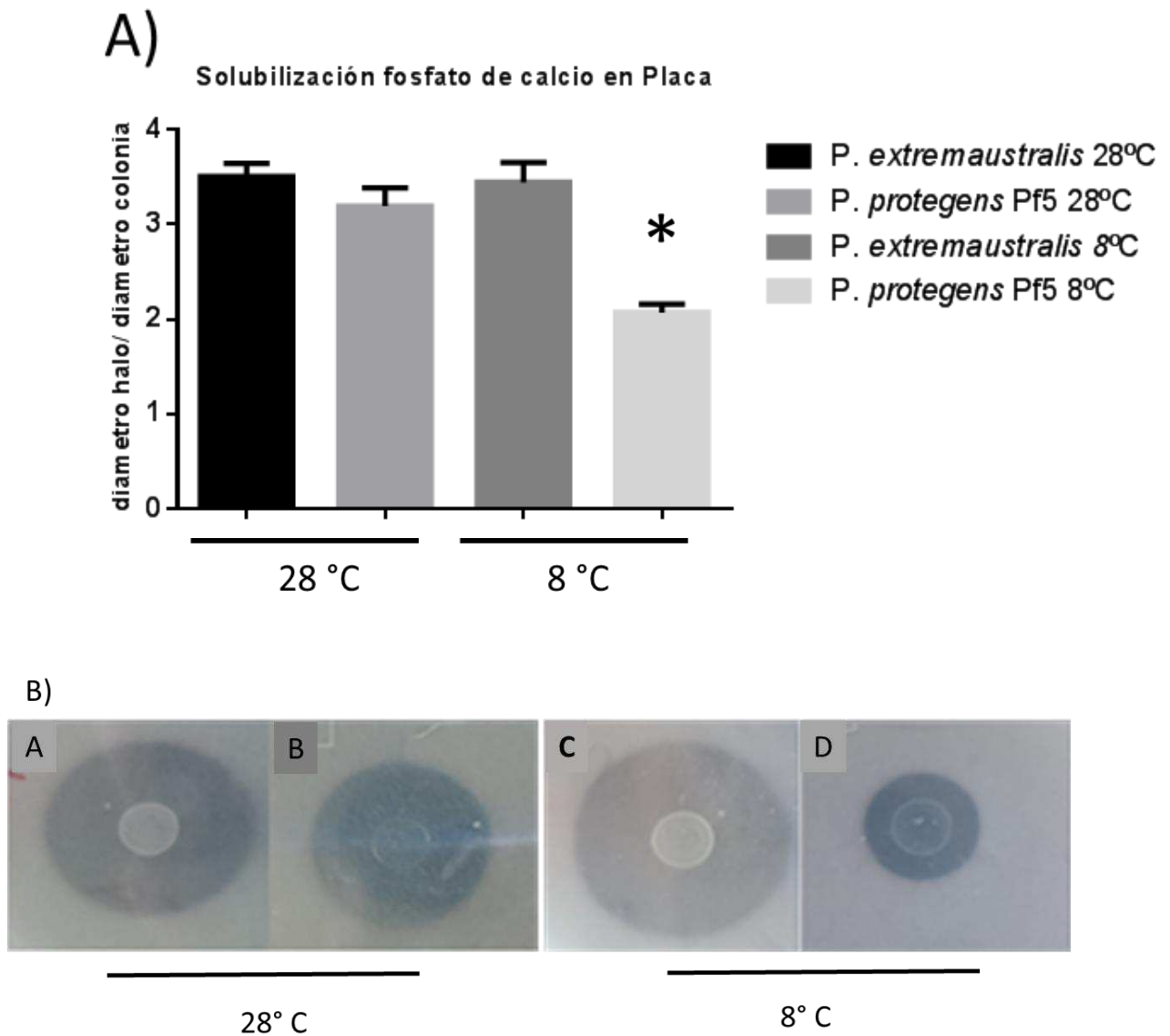


Figura 1.15: A. Cuantificación de la solubilización de fosfato tricálcico: Se observan diferencias significativas ( $P= 3,2 \cdot 10^{-4}$ ) entre las cepas a 8°C. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes y las barras representan la desviación estándar. B) Fotos representativas del ensayo de solubilización de fosfato en medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico a 8 y 28 °C. La solubilización de fosfato se detecta por una zona clara alrededor del inóculo. A, C: *P. extremaustralis*; B, D: *P. protegens*Pf-5.

En la Figura 1.15 se observa que ambas cepas son capaces de solubilizar fosfato tricálcico. Los resultados indican que *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 muestran similar capacidad solubilizadora cuando son cultivadas a 28°C. Cuando son cultivadas a 8°C *P. extremaustralis*

presenta una relación halo de solubilización/diámetro del inóculo significativamente mayor ( $P < 0.0001$ ) que *P. protegens* Pf-5 (Figura 1.15).

### Solubilización de fosfato y producción de ácidos orgánicos en medio NBRIP líquido

También se estudiaron ambas cepas en las mismas condiciones analizadas anteriormente en medio NBRIP líquido conteniendo fosfato tricálcico. Este medio a diferencia del anterior permite cuantificar el fosfato disuelto y los ácidos orgánicos presentes en el medio de cultivo, responsables de la solubilización del fosfato. En la Figura 1.16 se observa la cuantificación del fosfato soluble para ambas cepas en ambas condiciones.

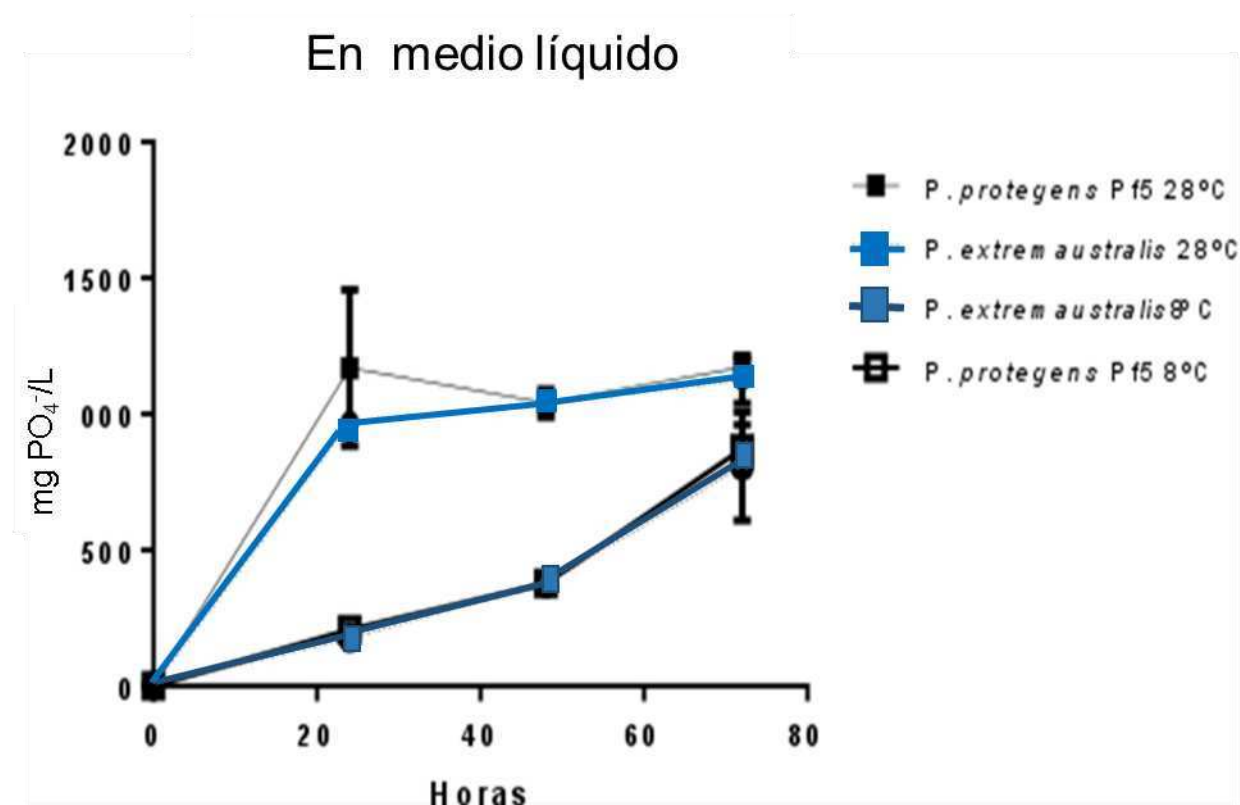


Figura 1.16: Cuantificación de la solubilización de fosfato tricálcico por el método Vanadato-Molibdato. *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* a 8°C (línea sólida) y 28°C (línea punteada)

Podemos observar que ambas cepas mantienen un perfil de solubilización similar, también que ambas solubilizan una cantidad de fosfato mayor cuando son cultivadas a 28°C. No se observaron diferencias entre ambas especies en ninguna de las condiciones analizadas. El

crecimiento de ambas cepas fue del mismo orden de magnitud en ambas condiciones de cultivo, alcanzando valores del orden de  $10^6$  ufc/ml a  $28^\circ\text{C}$  y  $10^4$  ufc/ml a  $8^\circ\text{C}$ .

El perfil de ácidos orgánicos producidos por *P. extremaustralis* se analizó a  $28$  y  $8^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos de cultivo en comparación con *P. protegens* Pf-5. El análisis por HPLC reveló un pico principal de ácido glucónico (Fig. 1.17 A y B). La concentración de ácido glucónico aumentó continuamente durante el período de incubación, alcanzando valores similares en ambas temperaturas luego de 72h de cultivo en *P. extremaustralis*. Como se esperaba de acuerdo con las diferencias genéticas (Tabla 1.2), en *P. protegens* Pf-5 los niveles de ácido glucónico fueron bajos a ambas temperaturas ensayadas (Figura 1.17 A y B). *P. protegens* Pf-5 posee el gen de la gluconato deshidrogenasa (Matsushita et al. 1979) que codifica la enzima Gad EC 1.1.99.3 la cual convierte el ácido glucónico en ácido 2-cetogluconico. Este ácido también es liberado al medio extracelular y fue descrito que es responsable en gran medida de la solubilización de fosfato tricálcico que lleva a cabo esta cepa (Miller et al. 2010).

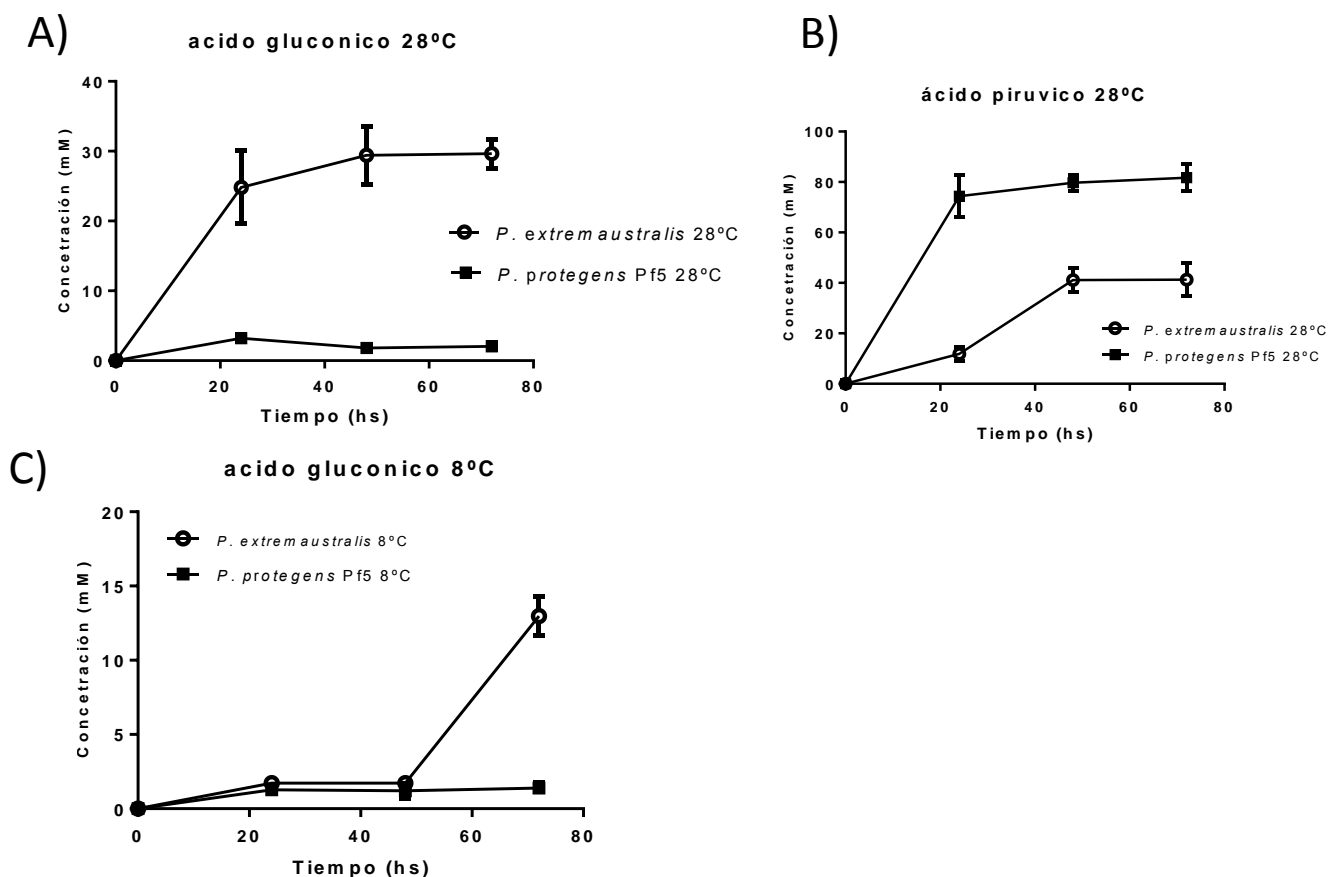


Figura 1.17. Cuantificación de ácidos orgánicos realizada por HPLC de los sobrenadantes de los cultivos. A) Ácido glucónico a  $28^\circ\text{C}$ ; B) Ácido glucónico a  $8^\circ\text{C}$ ; C) Ácido pirúvico

En los sobrenadantes de estos cultivos también se detectó la presencia de otros ácidos que no pudieron cuantificarse pero en los cuales se notaron diferencias claras entre las cepas, este es el caso del ácido cítrico, el cual se detecta solo en *P. protegens* Pf-5 pero no se pudo cuantificar porque el pico de elución se superpone con el de otro ácido no identificado.

El ácido pirúvico fue mayor en *P. protegens* que en *P. extremaustralis*, poniendo en evidencia otra diferencia en el metabolismo de ambas cepas (Figura 1.17C).

Si bien hubo diferencias en la concentración y tipos de ácidos entre las especies bacterianas esto no redundó en una diferencia en el pH del medio, el cual alcanzó valores entre 3,5 y 4 a 28°C y 5 a 5,5 a 8°C luego de 72 horas de cultivo. Tampoco se vió diferencia en la capacidad solubilizadora de fósforo en ninguna condición a diferencia de lo ocurrido en medio sólido.

Para determinar si hay diferencias en la producción de ácidos orgánicos y solubilización de fosfato cuando las bacterias son cultivadas en una condición que favorezca la formación de biofilm se realizaron cultivos en placa *multiwell* en medio líquido sin agitación. Se cuantificó la producción de ácidos orgánicos, solubilización de fósforo y formación de biofilm. Se observó el mismo patrón de ácidos que se había visto en los cultivos en Erlenmeyers, en estos ensayos tampoco se detectaron diferencias en la concentración de fosfato soluble a las 72 horas tanto a 8°C como a 28°C. Se observó una mayor formación de biofilm de *P. extremaustralis* en comparación con *P. protegens* Pf-5.

Como conclusión general de este conjunto de experimentos podemos decir que *P. extremaustralis* posee el gen que codifica la glucosa deshidrogena dependiente de PQQ y que es funcional dado que se detectó la producción de ácido glucónico el cual sería el responsable de la solubilización de fósforo inorgánico. La solubilización fue similar en ambas temperaturas analizadas 8 y 28 °C. Desde el punto de vista de la solubilización ambas especies mostraron buen desempeño a 28 °C. En los experimentos de solubilización en placa de Petri se observaron diferencias sólo cuando las cepas se cultivaron a 8°C. Estas diferencias no se observaron en medio líquido.

### **Solubilización de fosfato tricálcico de *P. extremaustralis* y su mutante en la síntesis de PHB.**

Una de las características que hacen a *P. extremaustralis* de interés para su estudio, son la alta producción de PHB, (Ayub et al. 2004) y su alta resistencia al estrés tanto oxidativo, calor o frío (Ayub et al. 2009). La producción de PHB resultó clave para la supervivencia en frío (Ayub et al., 2009).

Como se describió previamente, la solubilización de fosfato de calcio está determinada principalmente por la liberación de ácidos orgánicos al medio extracelular, la fuente de

carbono a partir de la cual se sintetizan estos ácidos orgánicos es la glucosa. En esta parte del trabajo se analizó la influencia de otra fuente de carbono en la solubilización de fósforo. Para esto se realizaron cultivos de *P. extremaustralis* y su mutante deficiente en la síntesis de PHB (*phbC*) (Ayub et al. 2009).

Además, la síntesis de PHB es una de las grandes diferencias de esta bacteria con *P. protegens* Pf-5, con lo cual puede resultar interesante saber cuál es la influencia del PHB en la solubilización en *P. extremaustralis*. La pregunta que nos hicimos fue ¿Cuál es el efecto de PHB en la solubilización de fósforo a diferentes temperaturas en *P. extremaustralis*? Se realizó una primera aproximación cultivando las cepas en las mismas condiciones que en los ensayos de solubilización de fosfato de calcio en placa pero agregando al medio de cultivo octanoato de sodio 0,25% como única fuente de carbono, octanoato de sodio 0,25% + glucosa 1%, y glucosa 1% como única fuente de carbono (Fig. 1.18). Se utilizó octanoato de sodio (caprilato) debido a que este compuesto es el principal sustrato utilizado por esta bacteria en la síntesis de PHB. *P. extremaustralis* produce mayor cantidad de PHB cuando el medio de cultivo se suplementa con octanoato de sodio en comparación con glucosa (Catone et al. 2014). Se inocularon las placas de Petri con alícuotas de 2µl de cultivos *overnight* en el orden de  $10^8$  ufc/ml.

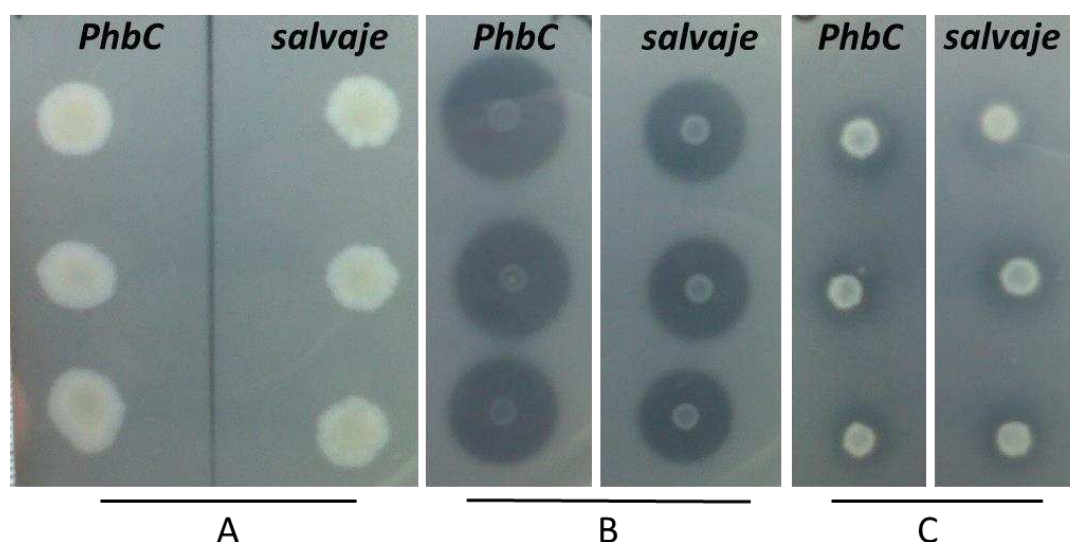


Figura 1.18: Fotos representativas de la solubilización de fosfato tricalcico en medio NBRIP suplementado con caprilato 0,25% (A), Glucosa 1% (B) y caprilato 0,25% + glucosa 1% (C). Cultivos a 28 °C luego de 10 días de incubación. Se utilizó la cepa *P. extremaustralis* (salvaje) y una mutante de *P. extremaustralis* en la enzima Phb sintasa (*PhbC*).

Se observó que ninguna de las cepas es capaz de solubilizar fosfato tricalcico cuando tienen octanoato de sodio como fuente de carbono (Fig. 1.18 A), ambas solubilizan fosfato tricalcico

cuando son cultivadas con glucosa como única fuente de carbono en ambas temperaturas ensayadas (Fig. 1.18B). Cuando se utilizaron ambas fuentes de carbono se observó una escasa solubilización que comenzó a partir de los 10 días de cultivo (Fig. 1.18C). A partir de estos resultados se investigó si el PHB acumulado en la célula tenía influencia en la solubilización de fosfato. Para eso se realizó el siguiente ensayo, se pre-cultivaron las dos cepas en medio LB y LB suplementado con octanoato de sodio 0,25%. Con esos precultivos se sembraron placas de medio NBRIP conteniendo sólo glucosa 1% como fuente de carbono, para evitar el efecto del octanoato de sodio en el medio de solubilización. Se incubaron las placas durante 7 días a 28°C y 15 días a 8 °C y se cuantificó la solubilización de cada una (Figura 1.19). El análisis estadístico de esta medición indica que no hay diferencias en la solubilización de fosfato entre las cepas cuando son cultivadas a 8 °C. La cepa salvaje precultivada con octanoato mostró mayor capacidad de solubilización que cuando fue precultivada sin octanoato y estas diferencias fueron significativas ( $P=0,0086$ ). No se observan diferencias en la mutante *phbC* cuando fue precultivada con o sin caprilato. En ambos casos a 28 °C la cepa mutante tuvo un relación halo/colonia significativamente mayor que la cepa salvaje.

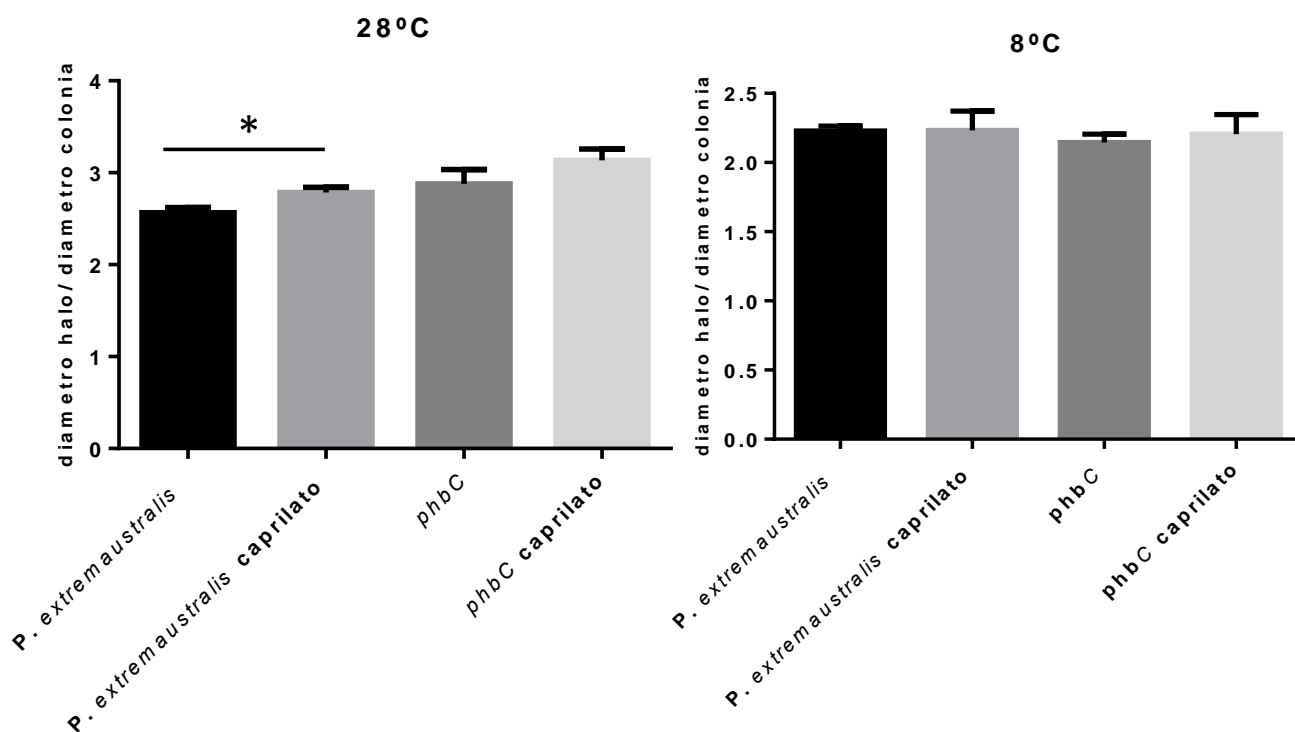


Figura 1.19: Solubilización de fósforo en placa de Petri NBRIP a 28°C y a 8°C. Las cepas utilizadas fueron; *P. extremaustralis* y *P. extremaustralis* mutante en *phb* sintasa (*phbC*). El medio de cultivo utilizado fue NBRIP, las cepas fueron precultivadas ON con caprilato o sin caprilato como se indica en cada caso. Los cultivos se realizaron en medio NBRIP.



### Mineralización de fosfato orgánico: utilización de fitato sodio

Se compararon las cepas *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 en cuanto a su capacidad de mineralización de fosfato orgánico, utilizando fitato de sodio como única fuente de fósforo en placas de Petri de NBRI-Fitato.

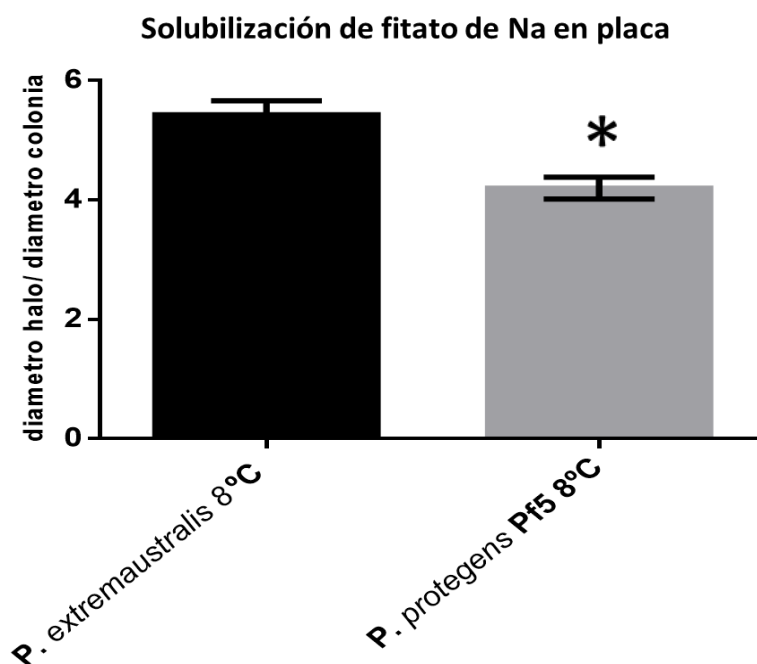


Figura 1.20: Cuantificación de utilización de fitato de sodio en placa a 8°C. Las placas se incubaron durante 4 días. Se muestra la relación entre el diámetro del halo de solubilización y el diámetro de la colonia. Se observan diferencias significativas ( $p=0,00018$ ) entre *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5.

*P. extremaustralis* solubiliza fosfato orgánico en mayor medida que *P. protegens* a 8°C. Cuando ambas cepas son cultivadas a 28°C no se observan estas diferencias, en concordancia con lo obtenido en los experimentos con fosfato tricálcico.

Estos resultados muestran que ambas cepas presentan diferencias en cuanto a su capacidad de utilización tanto de fosfato orgánico como inorgánico cuando son cultivadas en condiciones de estrés por frío.

**Producción de ácido indol acético, AIA:**

Se cuantificó la producción de ácido indol acético en *P. extremaustralis* y *P. protegens*. Se observa que las dos cepas son capaces de producir ácido indol acético en medio BDN. *P. extremaustralis* fue capaz de producir 20 µg/ml cuando fue cultivada a 28 °C a las 24 h de cultivo, mientras que los valores obtenidos para *P. protegens* Pf-5 fueron de 10 µg/ml (Fig. 1.21A). Cuando las cepas fueron cultivadas en frío mantuvieron la capacidad de producción de AIA pero esta disminuyó significativamente, obteniéndose valores de 12 y 7 µg/µl respectivamente. En la figura 1.21B se muestra la comparación de la producción de AIA relativizado a DO.

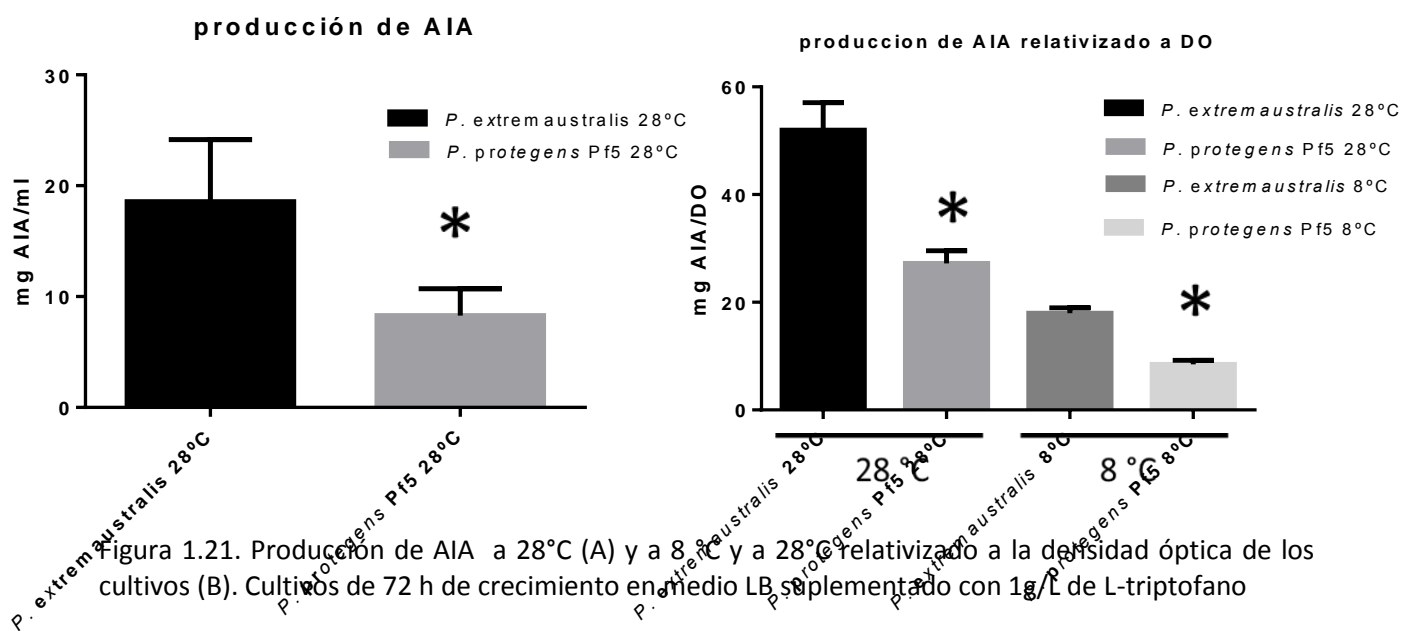


Figura 1.21. Producción de AIA a 28°C (A) y a 8°C y a 28°C relativizado a la densidad óptica de los cultivos (B). Cultivos de 72 h de crecimiento en medio LB suplementado con 1g/L de L-triptofano

**Determinación de la capacidad de crecimiento en ACC**

*P. extremaustralis* no fue capaz de crecer en placas de Petri conteniendo medio M9 + ACC 0.1% como única fuente de nitrógeno, indicando que no posee la actividad ACC desaminasa o que esta es muy baja para permitir el crecimiento. Por otro lado, se sabe que *P. protegens* Pf-5 no posee actividad ACC desaminasa y el gen anotado como *acdS* en esta bacteria no presenta alta similitud con los genes de *P. fluorescens* F113 y otras bacterias en la que ha sido comprobada su actividad (Blaha et al. 2006).

La anotación del gen PE143B\_0113600 se realizó de manera automática por similitud de secuencia con genes descritos, sin pruebas de funcionalidad. En base a los estudios realizados con *P. protegens* Pf-5 y a los resultados preliminares obtenidos en esta Tesis con respecto al crecimiento utilizando ACC como fuente de nitrógeno, es probable que la asignación de este *locus* sea errónea. Sin embargo, se deberían realizar estudios de actividad ACC deaminasa para dilucidar la funcionalidad de esta enzima en *P. extremaustralis*.

### **Análisis de la capacidad de producción de pioverdinas**

Además de los efectos directos sobre la producción del crecimiento vegetal se pueden observar efectos indirectos relacionados con la producción de metabolitos secundarios que pueden funcionar eliminando competidores en lo que se denomina biocontrol. Si bien las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, su búsqueda en el genoma y la comprobación de su funcionalidad es complicada, por lo que en este trabajo para iniciar el estudio de estos compuestos seleccionamos la producción de pioverdinas debido a su relevancia en varios procesos celulares.

El hierro es un nutriente fundamental para la mayoría de los microorganismos. En condiciones en las que es limitante para su crecimiento, muchas bacterias producen y liberan compuestos con alta afinidad por éste, llamados sideróforos. Las *Pseudomonas* producen gran variedad de compuestos con estas características, uno de los más abundantes son las pioverdinas (PVD) que están formadas por una porción peptídica y una porción dihidroxiquinolina con propiedades de cromóforo. Las PVD han sido ampliamente estudiadas en *P. aeruginosa* PAO1 en relación a la patogenicidad y en *P. protegens* Pf-5 y *P. fluorescens* SBW25 por su papel en la protección contra patógenos vegetales (Ruiz et al. 2015).

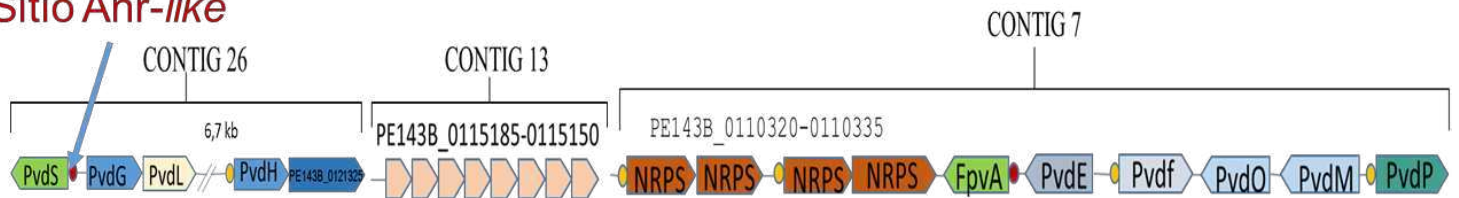
Se analizó la producción de pioverdinas en distintas condiciones de cultivo en *P. extremaustralis*. En primer lugar, se realizó la búsqueda bioinformática de los genes involucrados en la síntesis, regulación y transporte de PVD.

Los genes involucrados en la síntesis de PVD comprenden los que codifican péptido sintasas no ribosomales (NRPS) que dan origen a la porción peptídica del compuesto, además de genes regulatorios y transportadores (Fig. 1.22). Se identificaron 33 genes relacionados con la biosíntesis de PVD en *P. extremaustralis*, para la descripción de la organización de estos genes se comparó a *P. extremaustralis* con *P. aeruginosa* PAO1, en la cual se conocen ampliamente

los genes involucrados y los mecanismos de regulación y síntesis de este compuesto (Schalk y Guillon 2013; Miyazaki et al. 1995; Voulhoux et al. 2006; Ambrosi et al. 2002; Moon et al. 2008).

### *P. extremaustralis*

#### Sitio Anr-like



### *P. aeruginosa*

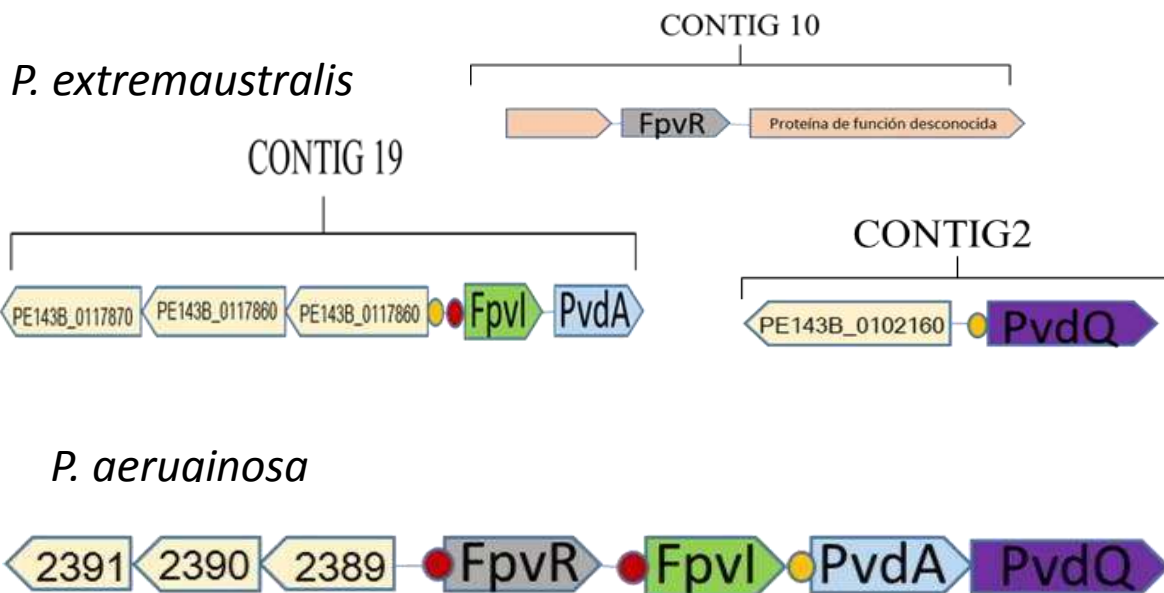


Figura 1.22. Comparación de las secuencias de genes relacionados con la síntesis de PVD en *P. extremaustralis* y *P. aeruginosa* PAO1. Las secuencias se analizaron con el programa PRODORIC para encontrar sitios de unión a Fur (Fur-Box; 5'-GATAATGATAATCATTATC-3'), círculos rojos y sitios PvdS (IS-Box; TAAAT-N16-CGT), círculos amarillos. Se encontró un probable de unión a Anr (*Anr-like*, TTGATCCTGGTGAA) cercano al ATG de *PvdS* en *P. extremaustralis*, la posición de este se indica con flecha celeste. Estas regiones fueron también analizadas manualmente para corroborar la presencia de los sitios. En la parte superior de la figura se indican los contigs en los cuales se encuentran los genes

en *P. extremaustralis*. Se indica el nombre o *locus-tag* de cada uno de los genes, iguales colores representan igual función.

Los genes en *P. extremaustralis* fueron similares a los encontrados en *P. aeruginosa* y están organizados en 3 grupos. Entre ellos podemos encontrar los que codifican el regulador *PvdS* junto a *PvdG* y *PvdL*, separado por 6.7 kb de otro *cluster* de genes en los que se encuentran los genes de síntesis de péptidos independientes de ribosomas (NRPS) junto a los genes que codifican transportadores de membrana de PVD como *FpvA* y *PvdE*. No se observaron duplicaciones génicas y los genes regulatorios no parecen diferir de los de otras *Pseudomonas*. El análisis de los dominios estructurales de la secuencia de proteínas correspondientes a los genes NRPS de *P. extremaustralis* de la figura 1.22 se realizó utilizando el programa ANTISMASH (Fig. 1.23).

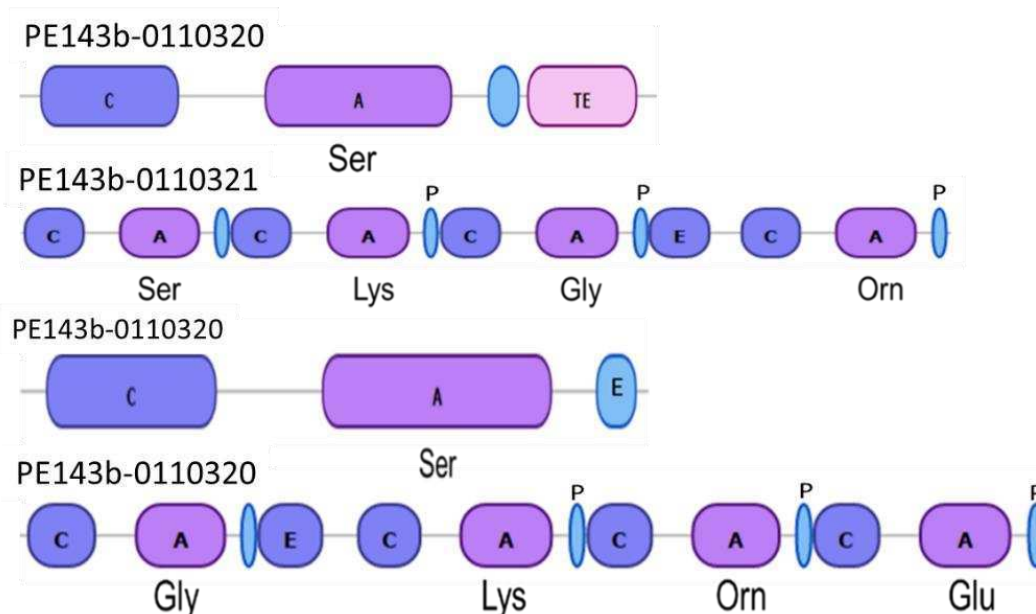


Figura 1.23: Esquema de los dominios funcionales de las proteínas de síntesis de péptidos no ribosomales involucradas en la síntesis de PVD, se indican los *locus tag* del gen correspondiente a cada enzima sobre cada esquema. Se utilizaron los programas ANTISMASH y NRSPREDICTOR2. Para determinar los dominios y predecir los posibles aminoácidos sustrato de cada dominio. Dominios: C: Condensación; A: Adenilación; TE: Tioesterasa; P: brazo de adhesión Fosfopanteteína; E: Epimerización. Debajo de cada dominio A se indica el aminoácido que incorporaría en la secuencia según el código de tres letras, Ser: Serina; Orn: Ornitina; Gly: Glicina; Lys: Lisina; Glu: Glutamina.

En base a esto, se pudo predecir el ordenamiento lineal más probable de los aminoácidos que componen la porción peptídica de PVD producida por *P. extremaustralis* (Fig.1.24).

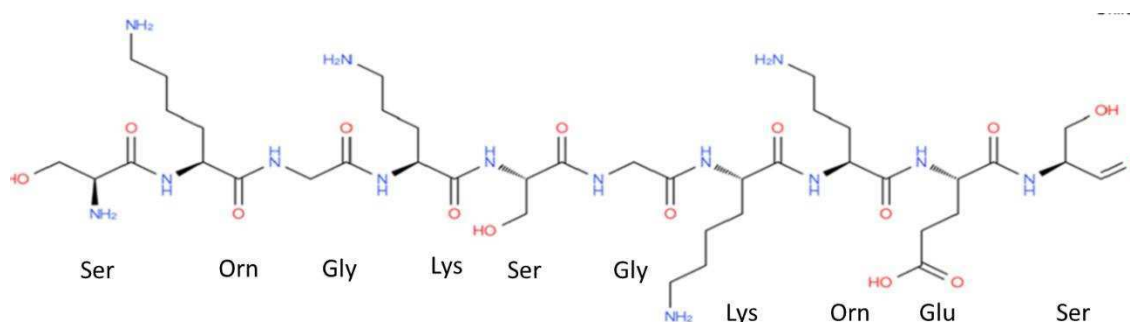


Figura 1.24: Secuencia lineal de aminoácidos predicha por ANTISMASH según los dominios funcionales encontrados en las cuatro proteínas de síntesis de péptidos no ribosomales involucradas en la producción de PVD, se indican los aminoácidos con código de tres letras.

También se analizaron las zonas regulatorias con el programa PRODORIC (<http://prodoric.tu-bs.de/>). A través de este programa se encontraron los sitios de unión al regulador transcripcional FUR (Fur-Box; 5'-GATAATGATAATCATTATC-3') relacionado a la captación de Fe, en las regiones río arriba del ATG de los genes *PvdS*, *FpvA*, *FpvL* (Círculos rojos Fig. 1.22) y sitios de unión para el regulador transcripcional PvdS (IS-Box; TAAAT-N16-CGT) en las regiones río arriba del ATG de los genes *PvdH*, *PvdP*, *PvdF*, y *PE143b-0117860* (Fig. 1.22, círculos amarillos). Se encontró un sitio de unión a la proteína Fnr (Fnr box: TTGATCCTGGTGAA) en la región de comienzo de la traducción del gen regulatorio *pvdS*. La proteína Fnr es una proteína regulatoria de *E. coli* que es homóloga a Anr, un regulador génico de *Pseudomonas* involucrado en la transición de aerobiosis a anaerobiosis y que tienen múltiples efectos en *P. extremaustralis*: afecta positivamente la síntesis de PHB, influencia el estado redox celular, el consumo de oxígeno, el nivel de especies reactivas de oxígeno, la producción de exopolisacáridos (EPS) y proteínas extracelulares, la biosíntesis de aminoácidos y la utilización de distintas fuentes de carbono (Tribelli, et al. 2013; Tribelli, et al. 2013; Tribelli et al. 2010). Además Anr reconoce y se une a los sitios *Fnr box* de *E. coli*. En base a esto se plantea que Anr puede tener un efecto en la regulación de la síntesis de PVD en *P. extremaustralis*, es por esto que se analizó la producción de PVD en diferentes condiciones de cultivo utilizando también una cepa de *P. extremaustralis* mutante para *Anr*.

### Producción de PVD en diferentes condiciones de cultivo

En esta parte del trabajo se estudió la producción de pioverdinas en *P. extremaustralis* en comparación con *P. protegens* Pf-5 en línea con los experimentos anteriores. Además, esta última cepa es bien conocida por ser una buena productora de pioverdinas y por su capacidad de protección contra patógenos como *Fusarium*, en la cual las PVDs tienen un rol fundamental por su capacidad de quelar formas de hierro asimilables, disminuyendo su concentración y de esta manera desfavoreciendo el crecimiento del hongo (Ruiz et al. 2015).

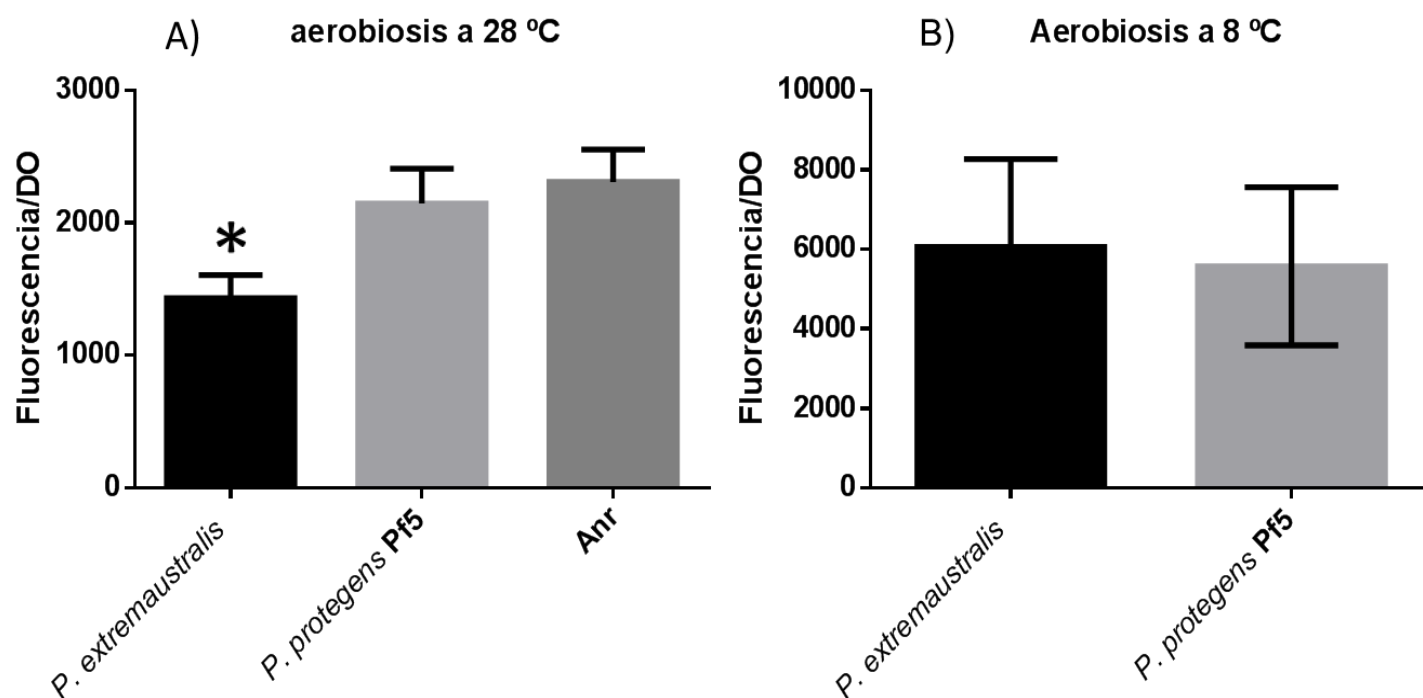


Figura 1.25: Cuantificación de pioverdinas por fluorescencia en cultivos aeróbicos de *P. protegens*, *P. extremaustralis* y *P. extremaustralis* mutante *anr*. 28°C (A) y 8°C (B).

En aerobiosis a 28°C se obtuvieron valores de  $1400 \pm 144$  para *P. extremaustralis*, de  $2300 \pm 190$  para la mutante *anr* y de  $2145 \pm 214$  para *P. protegens* Pf-5 a las 24 h (Figura 1.25A). *P. extremaustralis* y *P. Protegens* Pf-5 mostraron valores similares de producción de PVD, luego de 72h de cultivo a 8°C ( $6061 \pm 1800$  y  $5570 \pm 1623$  de F/DO, respectivamente;  $P > 0,05$ , t de Student) (Figura 1.25 B).

En microaerobiosis luego de 48 h de cultivo, la producción de PVD fue significativamente mayor para la cepa mutante *anr* ( $P < 0,01$ )  $4900 \pm 900$ , mientras que para *P. extremaustralis* y

*P. protegens* Pf-5 los valores fueron de  $1300 \pm 73$  y de  $533 \pm 200$ , respectivamente (Figura 1.26).

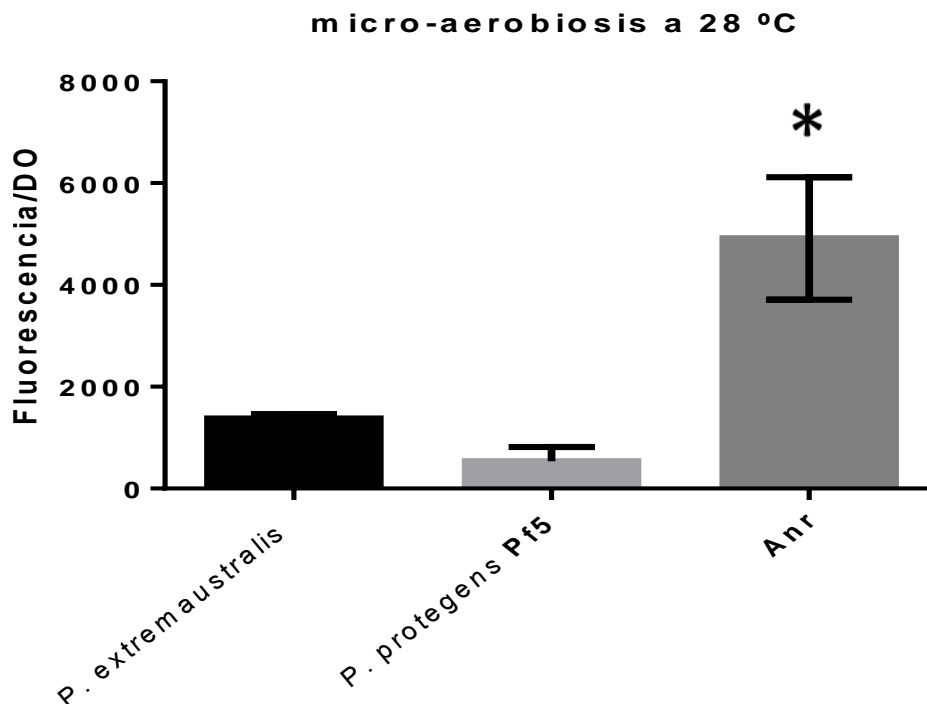


Figura 1.26: Cuantificación de pioverdinas por fluorescencia en cultivos microaeróbicos de *P. protegens*, *P. extremaustralis* y *P. extremaustralis* mutante *anr*. Los cultivos se realizaron a 28°C en microaerobiosis durante 48 h.

Estos resultados sugieren un efecto de ANR sobre la síntesis de PVD en *P. extremaustralis* que se apoyan también sobre análisis *in silico* de la secuencia de la región promotora de *pvdS* que mostró la presencia de probables sitios de unión a FNR, un regulador homólogo a ANR en *E. coli*.

Los resultados obtenidos muestran que en aerobiosis la producción de PVD aumentó con la disminución de la temperatura en ambas cepas. La producción de PVD fue mayor en aerobiosis que en microaerobiosis. El aumento en la producción de este compuesto en la mutante sugiere que Anr actuaría como represor.

### COMPROBACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE *P. EXTREMAUSTRALIS* CON LA PLANTA

Los resultados obtenidos demuestran que *P. extremaustralis* posee una serie de características genéticas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal y se comprobó la



funcionalidad de algunas de ellas. Pero ¿es capaz de interactuar con las plantas? ¿Cómo es esta interacción? En los siguientes apartados se analizan algunos aspectos relacionados con la interacción planta-bacteria.

### Quimiotaxis

La colonización de la raíz de las plantas está sujeta a la capacidad de la bacteria de ser atraída hacia ellas, de adherirse y sobrevivir en la superficie radicular.

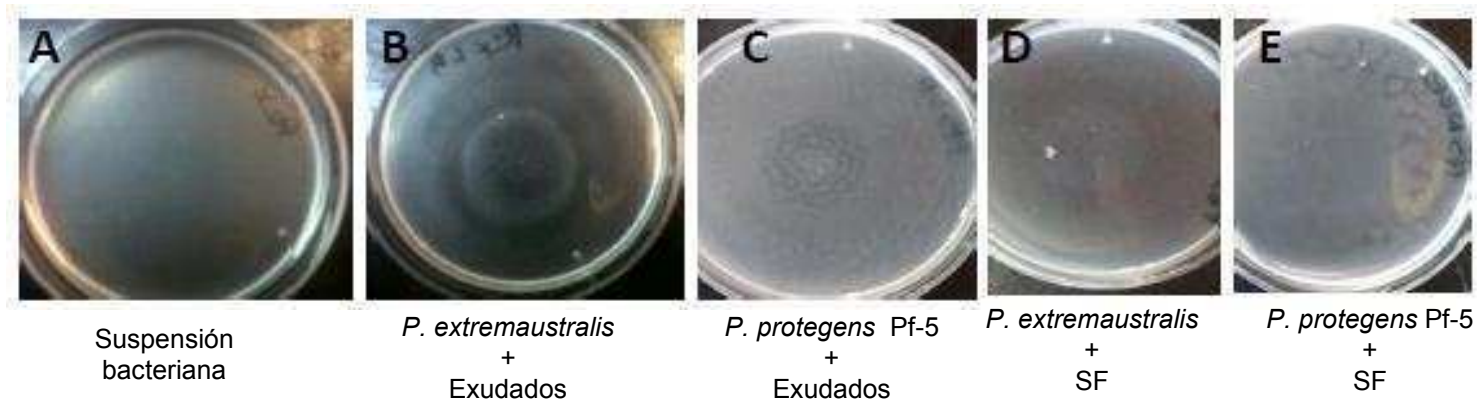


Figura 1.27: Quimiotaxis positiva hacia exudados radiculares de plantas de trigo. A) Suspensión homogénea de bacterias ( $DO_{600nm}=0.8$ ) en buffer de quimiotaxis sobre la que se colocaron 10  $\mu$ l de exudados radiculares (B, C) o solución fisiológica (D, E) en el centro de la placa. B y D corresponden a la suspensión de *P. extremaustralis*. C y E corresponden a *P. protegens* Pf-5.

Las bacterias son capaces de detectar cambios en la concentración de químicos en el ambiente y muestran una respuesta motriz positiva o negativa hacia ese compuesto mediada por flagelos o pilis acoplados a sensores quimiotácticos. Se realizó un ensayo cualitativo en el que se colocó una gota de 10  $\mu$ l de exudados radiculares concentrados en una placa de Petri sembrada con una suspensión bacteriana concentrada. Se puede observar cómo *P. extremaustralis* responde positivamente a los exudados radiculares por la formación de un halo de turbidez producto de la concentración de bacterias alrededor de la zona donde se colocó la gota (Fig. 1.27B). *P. protegens* Pf-5 presenta una respuesta positiva, pero menos clara (Figura 1.27C) y con un tiempo de respuesta más prolongado, la formación del halo de atracción de *P. extremaustralis* se visualizó claramente aproximadamente a los 15 minutos, mientras que Pf-5 mostro un patrón de agregación menos definido en un tiempo de 45 minutos. Se sugiere que la quimiotaxis positiva hacia la raíz y sus exudados es uno de los pasos principales en el proceso de interacción planta-bacteria siendo determinante en el proceso de colonización de la raíz (Dutta et al. 2013) y participa en procesos claves en esta interacción (Zhou et al. 2016; Notz et al. 2001). Se ha visto que bacterias con deficiencia en la movilidad o

quimiotaxis son menos eficientes colonizadoras de raíces (Weert et al. 2002). *P. extremaustralis* es una de las pocas *Pseudomonas* del grupo de las fluorescentes que posee un grupo extra de genes que codifican la síntesis de flagelos. Esta región de aproximadamente 40 kb con 40 marcos de lectura abiertos codifica un sistema completo de flagelos *flgA* (PE143B\_0120730) hasta (PE143B\_0126895) *flgN* (PE143B\_0126905) (Redondo-Nieto et al. 2013).

Las diferencias observadas en la movilidad de *P. extremaustralis* en comparación con Pf-5, quizá sean producto de las diferencias a nivel genómico mencionadas. Deben hacerse más estudios para definir a que compuestos presentes en los exudados radiculares es atraída esta bacteria y que mecanismos genéticos están involucrados en esta atracción.

## COMPROBACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE *P. EXTREMAUSTRALIS* CON RAICES

### Colonización de raíces de trigo:

La colonización de las raíces de trigo fue analizada mediante microscopía utilizando bacterias marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP). Luego de 20 días de la inoculación se observaron microcolonias (Fig. 1.28) localizadas principalmente en la raíz primaria en la zona de los pelos radiculares (Fig. 1.29). Un patrón similar se observó para *P. protegens* Pf-5 (resultados no mostrados).

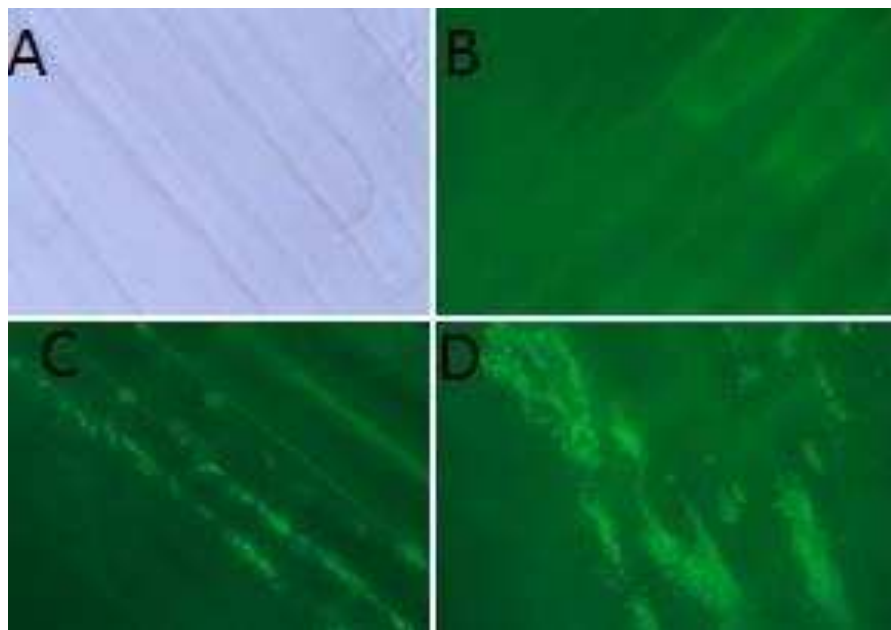


Figura 1.28: Ensayo de colonización de raíz de trigo. *P. extremaustralis* marcada con el plásmido pBBRMCS-2 conteniendo el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). Imagen de una raíz de trigo observada bajo luz blanca (A). Imagen de una raíz de trigo sin inóculo bacteriano en microscopio de fluorescencia: excitación a 450 nm, emisión 500 nm. (B). Imagen representativa de

raíz de trigo con inoculo de *P. extremaustralis*-GFP, cuando las plantas fueron cultivadas en medio MS (C) o MS modificado utilizando  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como única fuente de fósforo (D).

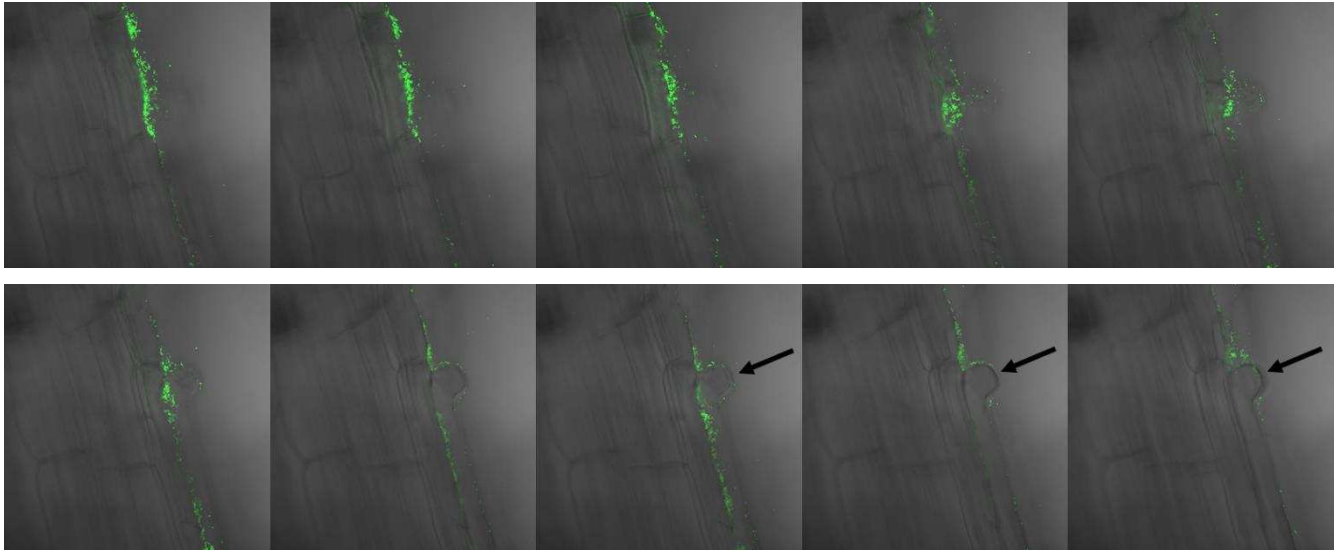


Figura 1.29: Imagen de microscopio confocal de la colonización de raíz de trigo por *P. extremaustralis*. Imágenes de la misma zona de la raíz en diferentes planos del eje "z". La flecha indica la zona de emergencia de un pelo radicular.

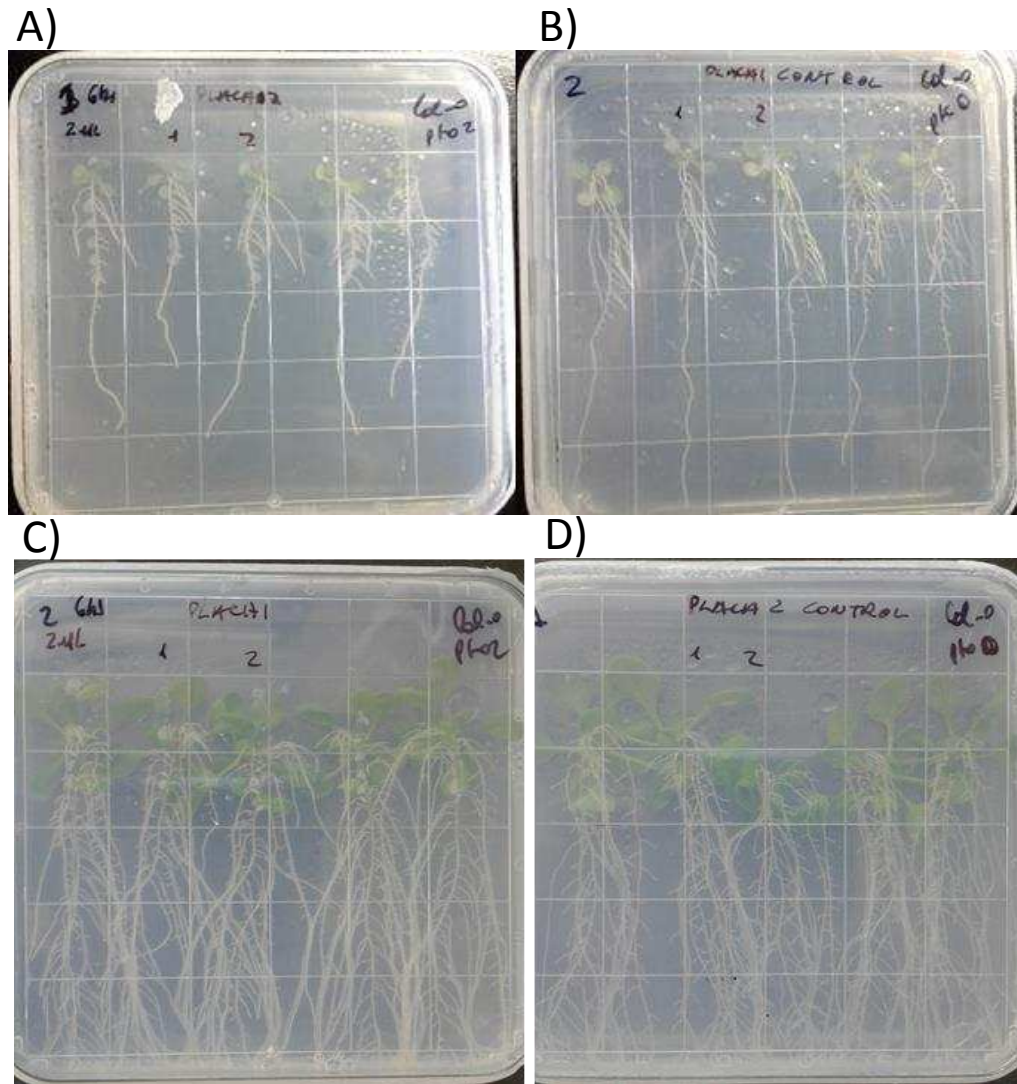
### **Desarrollo radicular de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Durante los ensayos de colonización de raíces en plantas de trigo, observamos que las plantas inoculadas con *P. extremaustralis*, *P. protegens* Pf-5 y las plantas sin inocular presentaban diferencias a nivel morfológico de las raíces.

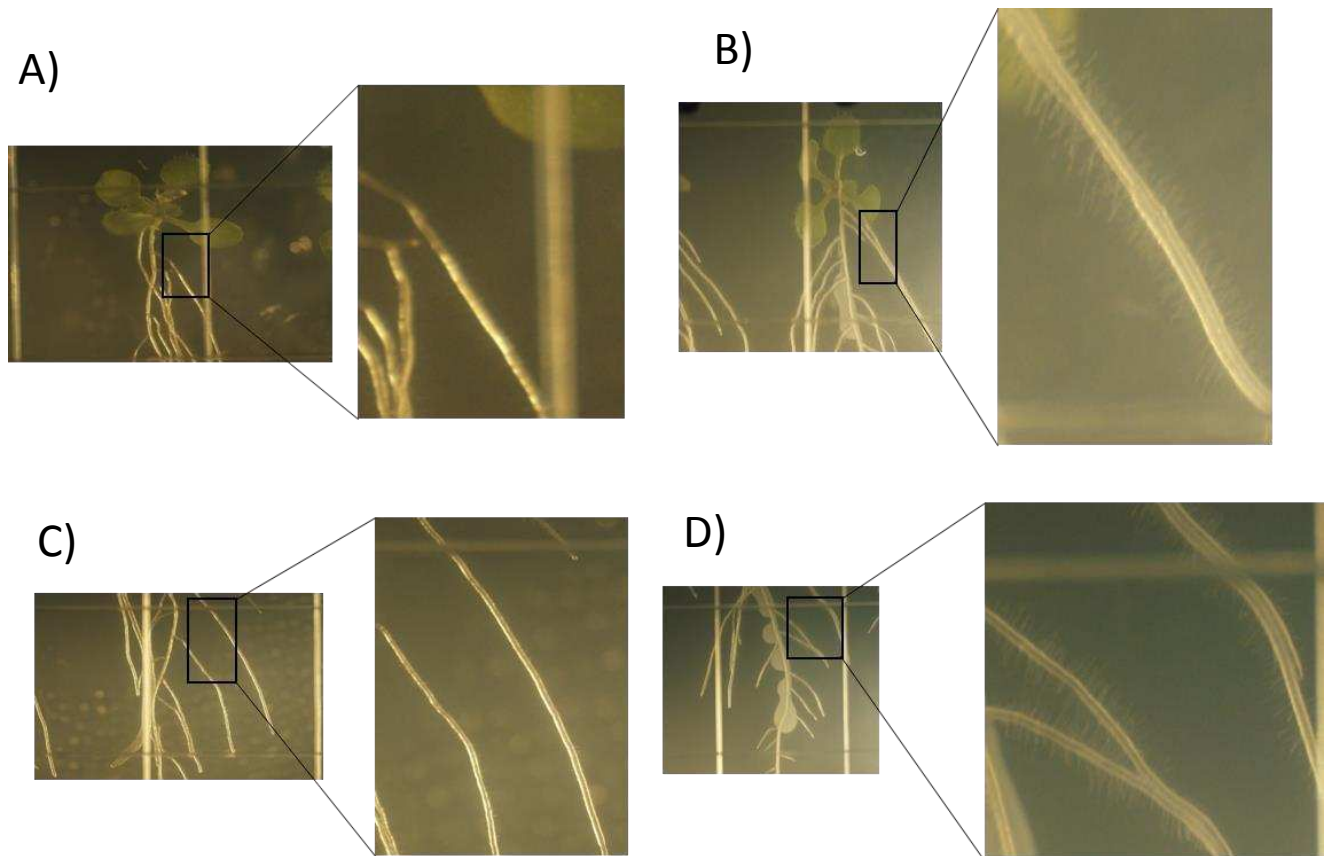
Se decidió avanzar sobre esta cuestión, y para esto se realizaron experimentos con plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0, cultivándolas en condiciones controladas en medio MS. Se inocularon las plantas con cultivos de *P. extremaustralis* de  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,8$ , utilizando plantas sin inocular como control.

A continuación se observa una imagen representativa de las plantas a dos tiempos de desarrollo post inoculación (Fig. 1.30), donde se muestra el desarrollo radicular de las plantas a los 4 días post inoculación (Fig 1.30 A). Se observan diferencias a nivel morfológico entre las plantas inoculadas y las plantas control, principalmente una inhibición de largo de la raíz principal cuando las plantas fueron inoculadas con *P. extremaustralis*, también se observaron diferencias en el patrón de desarrollo de las raíces laterales.

Otra de las diferencias que pudimos notar fue el cambio en el aspecto de las raíces, las plantas sin inóculo presentan raíces más traslúcidas y aparentemente más delgadas. La diferencia más notable entre los dos tratamientos fue detectada utilizando una lupa. Se observa una mayor abundancia de pelos radiculares cuando las plantas fueron inoculadas con *P. extremaustralis* así como una mayor proporción de raíz en la que se desarrollan dichos pelos radiculares (Figura 1.31).



**Figura 1.30:** Estado general y desarrollo radicular de las plantas de *Arabidopsis thaliana* col 0. A y C inoculadas con 2 µl de cultivo en fase exponencial de *P. extremaustralis*, B y D plantas control sin inóculo bacteriano. A y B estado de las plantas a los 4 días pos inoculación, C y D desarrollo a los 10 días post inoculación.



**Figura 1.31:** Detalle del desarrollo de pelos radiculares a los cuatro días post inoculación de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0. (A, C) plantas control sin inóculo bacteriano. (B, D) plantas inoculadas con 2  $\mu$ l de cultivo en fase exponencial de *P. extremaustralis*.

### **Efecto de *P. extremaustralis* en el crecimiento de plantas de trigo**

#### *En tubo con fosfato tricálcico y fosfato de potasio*

A fin de determinar el efecto de *P. extremaustralis* en la nutrición y sanidad de plantas de trigo, se cultivaron las plantas en un sustrato inerte (1:1 arena y perlita) y se inocularon con *P. extremaustralis* en medio MS y MS conteniendo fosfato de calcio, una fuente de fósforo no asimilable por las plantas, no se agregó sacarosa a este medio para impedir el excesivo crecimiento bacteriano. Luego de 10 días se determinaron algunos parámetros indicativos del crecimiento de las plantas. Se cuantificó el peso seco del vástago (Fig. 1.32A). Para la raíz se determinó: largo total, número de ramificaciones, raíces principales y peso fresco (Fig. 1.32 B-E).

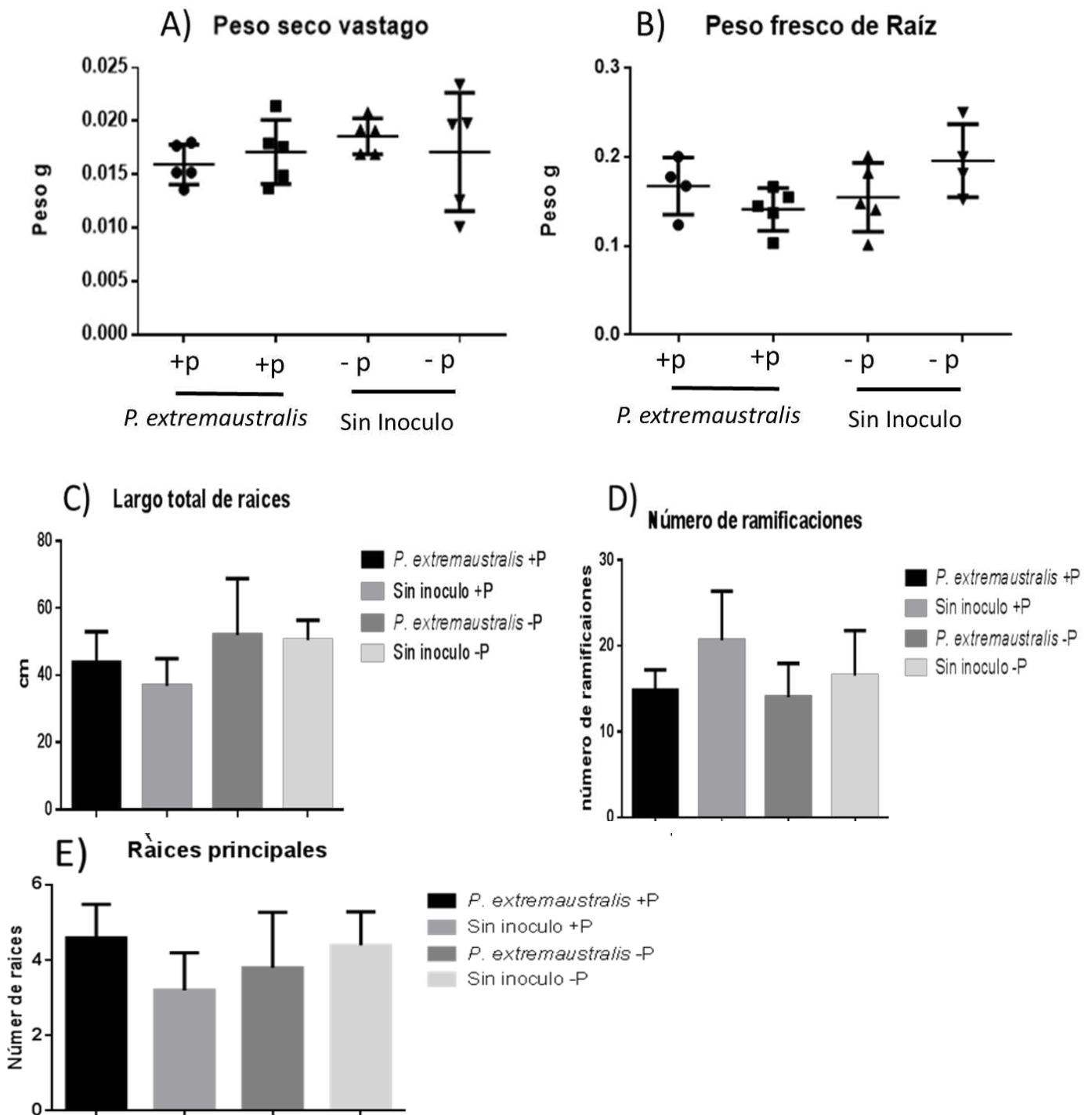


Figura 1. 32: Cuantificación de crecimiento de plantas de trigo cultivadas en medio Ms con fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ) asimilable por las plantas (+P) o fosfato tricalcico (-P) no asimilable por las plantas. Inoculadas con *P. extremaustralis*, o sin inoculo. Las barras de error representan el desvío estándar de 5 réplicas.

No se observaron diferencias en la biomasa de las plantas ni en los parámetros de la raíz en las condiciones experimentales ensayadas ( $P < 0,05$ , t-test).

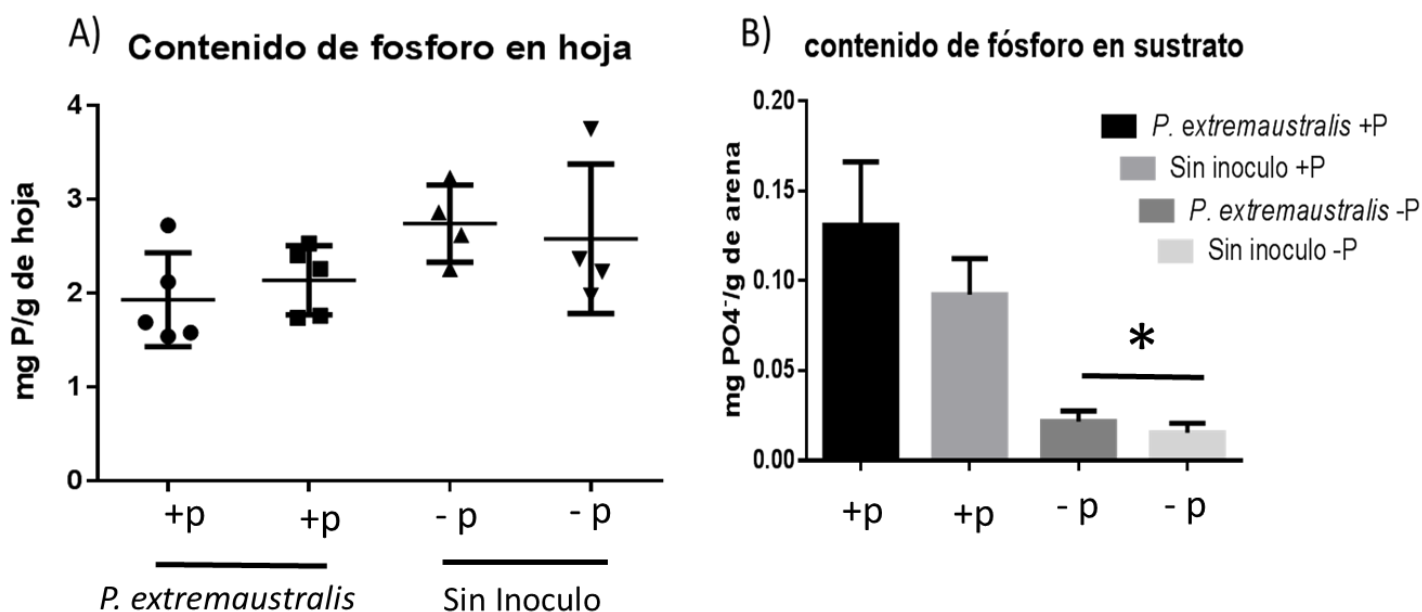


Figura 1.33: Concentración de fósforo total hojas de trigo cultivadas en medio MS fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) asimilable por las plantas (+P) o fosfato tricalcico (-P) no asimilable por las plantas. Inoculado con *P. extremaustralis* o sin inoculo v bacteriano, A). Concentración de fósforo disuelto en arena utilizada como sustrato de cultivo B). Las barras de error representan el desvío estándar de 5 réplicas.

El contenido de fósforo de las plantas que fueron inoculadas con *P. extremaustralis* fue menor que las que no fueron inoculadas cuando se usó como medio de cultivo MS con fuente de fósforo asimilable (Fig. 1.33A). Debido a esto, se cuantificó el fósforo soluble en el sustrato para determinar el efecto del agregado de la bacteria (Figura 1.33B). El contenido de fósforo soluble en el sustrato fue mayor en los casos en que la bacteria se encontraba presente, esto se verificó con ambas fuentes de fosforo. Si bien encontramos que la bacteria incrementa el fosforo soluble en el sustrato, esta diferencia no pudo cuantificarse como un mayor contenido de fosforo en las hojas de las plantas en estas condiciones. Estos resultados podrían indicar que esta bacteria si bien es capaz de solubilizar fósforo, en las condiciones ensayadas no mejoraría el estado nutricional de las plantas de trigo.

*En macetas con tierra tindalizada.*

Para determinar el efecto de *P. extremaustralis* en el crecimiento de plantas de trigo en un sistema más similar al natural se realizó un ensayo en el cual se cultivaron plantas de trigo en macetas conteniendo tierra tindalizada con contenido de fósforo asimilable de 13 mg/kg de suelo. Luego de 30 días de crecimiento se cosecharon las plantas y se realizó una medición de parámetros físicos (peso seco de vástago y raíz) y químicos (contenido de fósforo total en vástago y contenido de clorofila en hoja).

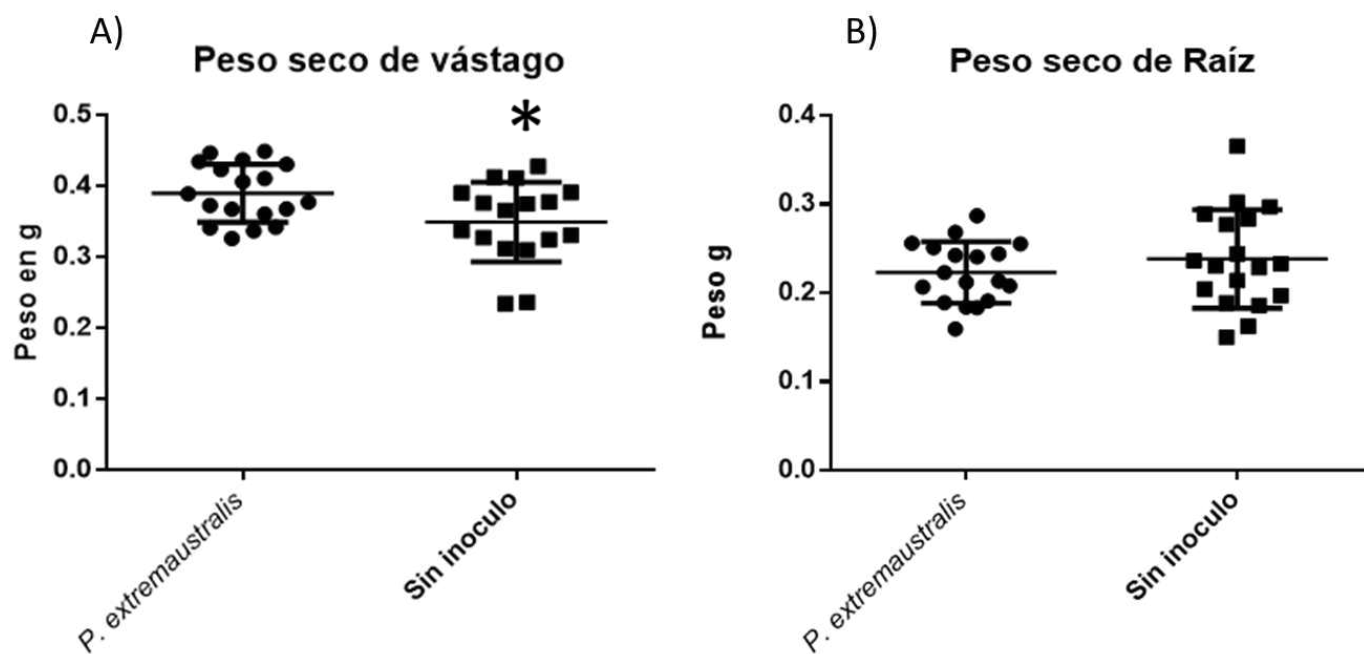


Figura 1.34 A) Peso seco de vástago y B) de raíz de plantas de trigo cultivadas en tierra tindalizada inoculadas con *P. extremaustralis* y sin inoculo. Las barras de error representan el desvío estándar de 18 réplicas.

En la Figura 1.34 A) y B) se observa el resultado de la medición de peso seco de vástago y de raíz. Se observa que la biomasa de vástago fue mayor cuando las plantas fueron inoculadas con *P. extremaustralis* (T test;  $P=0,0107$ ). El peso seco de la raíz no se vio afectado por la inoculación con la bacteria estudiada.



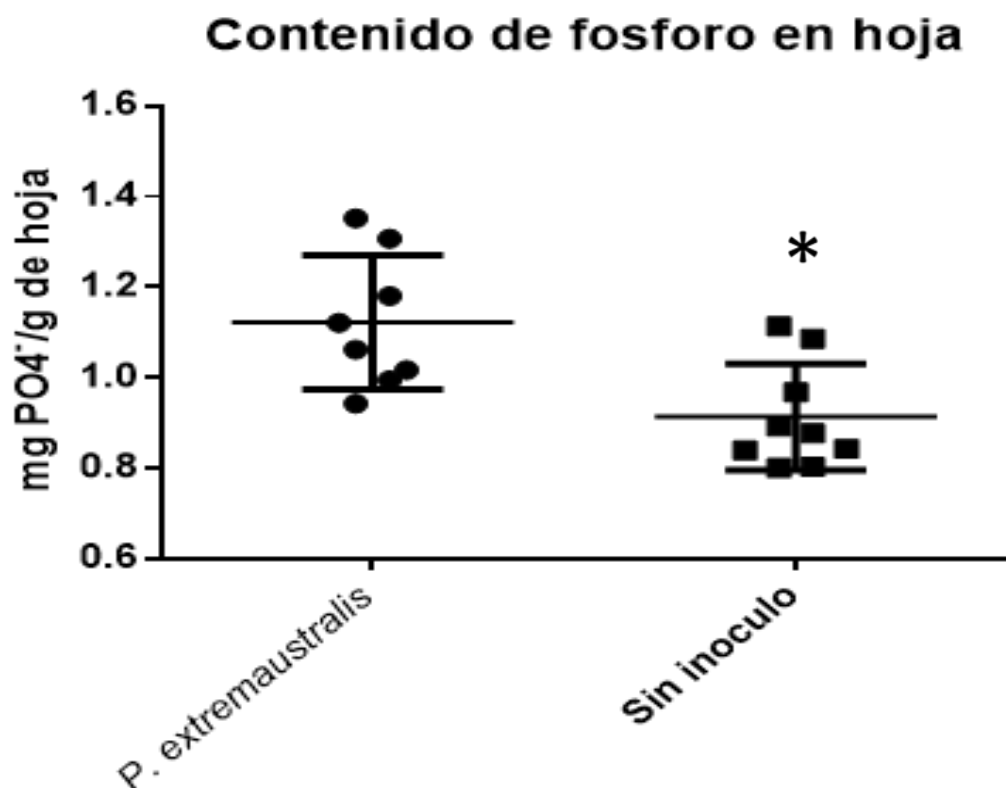
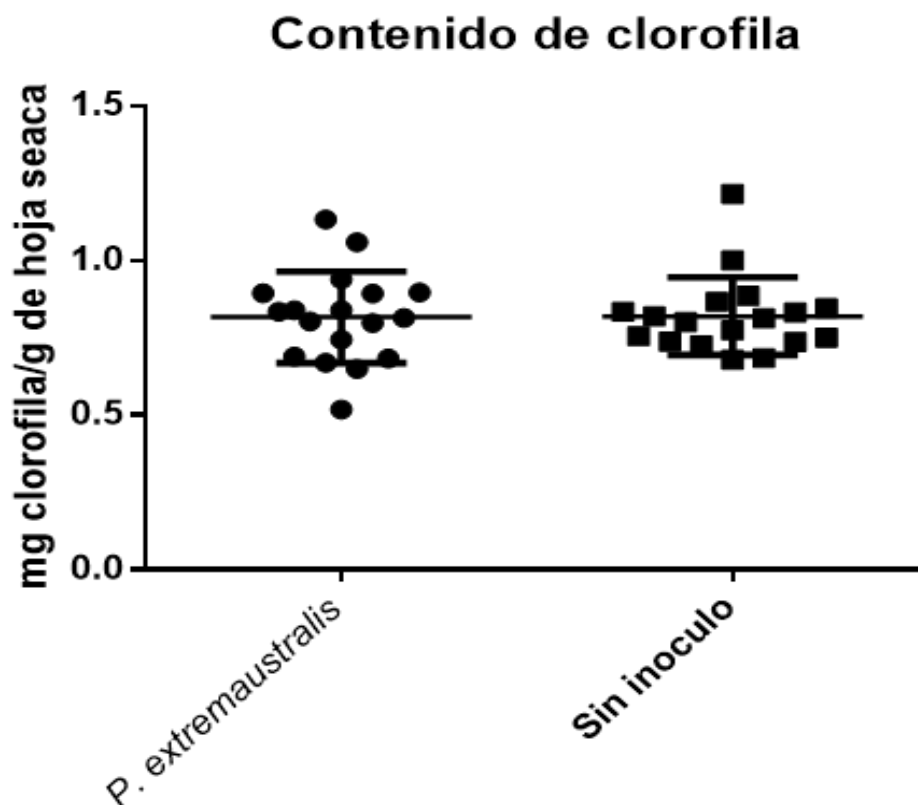


Figura 1.35: Contenido de fósforo total de plantas de trigo cultivadas en tierra tinalizada, inoculadas con *P. extremaustralis* y sin inoculo. Las barras de error representan el desvío estándar de 8 réplicas.

La cuantificación de fósforo total en planta en este ensayo arrojó un resultado diferente al obtenido en el ensayo anterior realizado en tubos de ensayo y durante menor tiempo. Puede observarse un contenido de fósforo mayor (T. test;  $P=0,0242$ ) en las plantas que fueron inoculadas con *P. extremaustralis* en comparación con las plantas que no fueron inoculadas (Fig. 1.35). El contenido de clorofila no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 1.36,  $P>0,05$ ).



**Figura 1.36:** Contenido de clorofila en hojas de plantas de trigo cultivadas en tierra inoculadas con *P. extremaustralis* y sin inoculo. Las barras de error representan el desvío estándar de 18 réplicas.

En estos ensayos observamos una diferencia en el desarrollo de la parte aérea de las plantas entre los dos tratamientos. En este caso el efecto de la bacteria parecería beneficioso, observándose un contenido de P mayor en hojas y un peso seco de vástago mayor cuando las plantas fueron inoculadas.

Dado que en los ensayos realizados, las plantas tuvieron un desarrollo de un mes, no pudimos determinar si hubo diferencias en el desarrollo radicular de las plantas, debido a la complejidad del análisis de raíces en esas condiciones. Sería interesante poder analizar el desarrollo de las raíces en plantas de trigo con un tiempo de crecimiento prolongado, dado que a plazos cortos no se observaron diferencias en el desarrollo de las raíces en trigo (Fig. 1.32 BCDE), pero se comprobó que *P. extremaustralis* tiene efecto en el desarrollo de raíces de *Arabidopsis* (Fig. 1.30).

Los resultados de los experimentos en tubo y en maceta indican que hay diferencias en el sistema utilizado cuando intentamos detectar el efecto de un microorganismo en el desarrollo de una planta. Los sistemas que no permiten el desarrollo de planta por confinamiento, como es el tubo de ensayo, restringen el tiempo en que el cultivo puede ser mantenido en

condiciones adecuadas, lo que puede ocasionar que no se detecten efectos sutiles que algunas bacterias sobre las plantas. La detección del efecto promotor del crecimiento vegetal por parte de un microorganismo, depende de las condiciones en las cuales se realice el ensayo. Por ejemplo, esto ocurre en bacterias en las que su actividad promotora se debe al biocontrol o en aquellas en las se debe a la biofertilización, en las cuales, si hay cantidades suficientes de nutrientes o si no se encuentran patógenos en el suelo, las bacterias no promueven el crecimiento de las plantas, al menos por estos mecanismos.

## DISCUSIÓN

### **Análisis de bacterias aisladas de suelos con distintos regímenes hídricos y de *P. extremaustralis* como potenciales promotores del crecimiento vegetal.**

La primera parte de esta tesis se centró en la búsqueda de bacterias que tuvieran la capacidad de promover el desarrollo vegetal con el objetivo de evaluar características de interés para su potencial utilización como inoculantes para la mejora de cultivos de interés agronómico. La primera aproximación fue realizar aislamientos de bacterias de distintos tipos de suelo y determinar sus actividades como PGPR, utilizando técnicas de microbiología tradicional. Se detectó la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico en 19 de los aislamientos testeados. Las cepas IIM-Man 4 e IIM-Man 5, al igual que *P. extremaustralis*, mostraron alta actividad de solubilización de fosfato según la clasificación de Meyer et al., (2011), que considera 4 categorías: 1, actividad muy baja entre 0,0 a 4,4 mm; 2, baja actividad entre 4,5 a 5,4 mm; 3, actividad media entre 5,5 a 6,4 mm y 4, actividad alta entre 6,5 a 7,5 mm que se definen en base a la diferencia entre el diámetro del halo de solubilización en placa y el diámetro de la colonia. Las 3 cepas estudiadas se ubicaron en la categoría 4. La producción de AIA se observó en un total de 22 cepas, se cuantificó para 12 de estos con valores comprendidos entre los 3 µg/ml y 60 µg/ml de AIA. Ninguno de los aislamientos testeados fue capaz de fijar nitrógeno en la prueba de crecimiento en medio JNFb.

Se seleccionaron 4 cepas que fueron probadas en cultivos con plantas de maíz en sistema axénico autotrófico. Los resultados obtenidos pusieron en evidencia la influencia de las bacterias seleccionadas en el desarrollo de las plantas. Los ensayos realizados inoculando raíces de las plantas maíz en un sistema axénico autotrófico con cepas puras de distintos aislamientos, mostraron resultados prometedores en cuanto a la capacidad de promover el crecimiento de plantas de maíz para los aislamientos IIM-Man 4 e IIA-Man30. Estos aislamientos deben ser analizados en condiciones más rigurosas (en suelo por ejemplo) para comprobar si mantienen sus características como promotoras del crecimiento vegetal.

Los ensayos para hallar bacterias que mostraran su funcionalidad como PGPR en suelos con distintos regímenes hídricos, presentados en la primera parte de esta Tesis Doctoral, se realizaron en el marco de un proyecto FONARSEC en el que participó la empresa Rizobacter Argentina S.A. A partir de estos ensayos, se encontraron cepas prometedoras en cuanto a su potencialidad como PGPR, que podrían ser probadas a campo para su aplicación. Sin embargo, desde el punto de vista del conocimiento básico, es necesario continuar con la identificación de los aislamientos y con un análisis de los genes responsables de las diferentes funciones para entender los mecanismos y las condiciones que llevan a su mejor desempeño como PGPR.

La segunda aproximación consistió en el estudio de características PGPR en *P. extremaustralis*, una bacteria estudiada en nuestro laboratorio, utilizando herramientas genómicas, genéticas y de microbiología tradicional. También se analizó la capacidad de interacción de esta bacteria con plantas y el efecto de esta interacción. Esta cepa muestra cercanía filogenética con *Pseudomonas* relacionadas a la promoción del crecimiento vegetal, tiene capacidad de tolerar diferentes tipos de estrés y produce PHB; además el conocimiento de su genoma permite un abordaje más global.

Mediante análisis bioinformáticos de la secuencia del genoma de *P. extremaustralis* se detectaron genes potencialmente involucrados en la solubilización de fosfato, por liberación de ácidos orgánicos, fitasas, producción de AIA y se probó que esta bacteria es capaz de realizar estas funciones. Además se detectaron genes que codifican la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa. La importancia de la enzima ACC deaminasa en la promoción de crecimiento vegetal se relaciona con la síntesis de etileno. Muchas plantas requieren etileno para la germinación, pero también es una hormona que tienen funciones relacionadas al desarrollo de la planta en situaciones de estrés frenando el desarrollo radicular en estas situaciones. El etileno es sintetizado a partir del precursor ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) durante el estrés biótico y abiótico. La enzima ACC deaminasa puede escindir el precursor del etileno, disminuyendo la concentración de este, resultando en el desarrollo de raíces más largas, por lo cual es considerada una característica beneficiosa para el crecimiento vegetal (Glick 2005; Hayat et al. 2010). También se detectaron genes que podrían estar involucrados en la resistencia al ácido fusárico. Este compuesto es una toxina producida

por hongos de los géneros *Fusarium* y *Gibberella* que altera la permeabilidad de la membrana plasmática afectando considerablemente la salud de las plantas (Hu et al., 2012). Los genes hallados en *P. extremaustralis*, codifican componentes de una bomba de eflujo y han sido descritos en otras bacterias como involucrados en la resistencia al ácido fusárico (Hu et al., 2012). Recientemente, ha sido demostrado que la producción de sideróforos incrementa la resistencia al ácido fusárico en *P. protegens* Pf-5 (Ruiz et al., 2015). *P. extremaustralis* posee ambos mecanismos que podrían contribuir a la resistencia a este compuesto.

Además, se analizó la presencia de genes relacionados al balance osmótico, que pueden ser relevantes para la supervivencia en condiciones de baja actividad de agua como ambientes áridos o fríos. La existencia de múltiples copias de algunos de ellos podría ser importante en la adaptación de esta bacteria a estrés osmótico en su ambiente natural debido al papel de la betaina, prolina y trehalosa en la estabilización de proteínas en el proceso de congelamiento y descongelamiento repetitivo (Prestrelski et al. 1993). Además, la presencia del gen *gsmT* permitiría la acumulación de sarcosina, un osmolito presente en *Archaeas* halófilas, que junto con la redundancia observada en el sistema de bombeo de potasio dependiente de ATP *kdpFACBDE*, pueden resultar importantes en la adaptación al estrés osmótico. Dado que el balance osmótico en ambientes cambiantes es de suma importancia para los microorganismos, proponemos que *P. extremaustralis* puede ser un buen modelo de estudio en suelos sometidos a estrés osmótico gracias a la batería de genes hallados relacionados con esta característica.

La mayoría de los genes identificados mostraron alta similitud con las secuencias homólogas pertenecientes a *P. protegens* Pf-5, una conocida PGPR. Además se encontraron algunos que no están presentes en esta bacteria lo que pone en evidencia algunas diferencias entre las dos especies.

Como ya se mencionó, *P. extremaustralis* 14-3b fue aislada de una muestra de agua procedente de una charca temporaria de la Antártida. La presencia de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal en su genoma parecerían raras a primera vista, considerando el ambiente del que procede. Sin embargo, la zona donde se realizó el aislamiento, Punta Cierva, una zona de interés científico localizada en la costa Danco

en el lado oeste de la Península Antártica a 64°09 S y 60°57 W, cerca de la base denominada Primavera (Ayub et al., 2004), posee algunas particularidades. Se caracteriza por un microclima benévolo, considerando la latitud, en comparación con otras regiones más septentrionales del continente Antártico, con temperatura media mensual que oscila entre 1,8 ° C y 2,2 ° C (Quintana 2001). La vegetación está bien desarrollada, con una cubierta continua durante el verano, cuando ocurre el deshielo, de musgos, gramíneas y líquenes, reportándose también la presencia de muchas especies de aves que habitan esta área (Quintana et al. 2000). Las características geomorfológicas y las condiciones climáticas y las biológicas proveen muchos microambientes. Estos datos sugieren que *P. extremaustralis* también podría estar en contacto con vegetación en ese ambiente. Además, un trabajo que analiza la presencia de organismos productores de PHA asociados a plantas en diferentes regiones de Alemania reporta la presencia de *P. extremaustralis* asociada a la rizosfera de canola (Gasser et al. 2009), lo que apoya que esta especie pueda tener características funcionales como PGPR y para interactuar con vegetales.

Para comprobar la interacción con plantas se realizaron distintos ensayos. La quimiotaxis es una característica relevante en la relación planta-bacterias. Se pudo determinar que *P. extremaustralis* es atraída por exudados radiculares de plantas de trigo y que respondió de manera diferente a *P. protegens* Pf-5. La respuesta de *P. extremaustralis* al agregado de exudados radiculares fue inmediata. Sería interesante determinar qué mecanismos actúan en el reconocimiento, por parte de la bacteria, de los compuestos presentes en los exudados, que se encuentran activos en la bacteria en ausencia de la planta, y los mecanismos por los cuales las bacterias mantienen el contacto con las raíces luego de este acercamiento inicial. Esta reportado que la movilidad bacteriana es fundamental en el proceso de atracción a la raíz y la colonización radicular (Weert et al. 2002; Vande Broek et al. 1998). Estas diferencias podrían ser atribuidas a diferencias en los sistemas de movilidad. En la mayoría de los genomas de las *Pseudomonas* disponibles al presente, los genes para la síntesis de flagelos polares están distribuidos en tres grupos (Redondo-Nieto et al. 2013). *P. extremaustralis* posee además otro *cluster* que posee 40 marcos abiertos de lectura que codifican un sistema de flagelos completo, este grupo de genes no es habitual en *Pseudomonas* del grupo *Fluorescens* y ha sido descrito

en *P. fluorescens* F113, bacteria que se caracteriza por su alta competencia en la rizósfera y en la que se ha propuesto que esta capacidad de competencia está relacionada a su alta movilidad (Redondo-Nieto et al. 2013).

Otra diferencia entre las cepas comparadas se da justamente en los sistemas de quimiotaxis. *P. extremaustralis* posee los sistemas quimiotácticos completos que codifican las proteínas Che2 y Che3, que se están ausentes en *P. protegens* Pf-5. Las diferencias en estos sistemas (movilidad y quimiotaxis) podrían estar relacionadas con el comportamiento diferente hacia los exudados radiculares.

La quimiotaxis positiva hacia la raíz de la planta es el primer paso en el proceso de colonización, pero para lograr una infección exitosa es fundamental que se establezcan interacciones estables entre los organismos. La interacción íntima entre las bacterias del suelo y las raíces de las plantas favorece el efecto de cualquier compuesto que liberen tanto las bacterias como las plantas sobre el otro organismo y es de suma importancia en los procesos tanto de simbiosis positiva, como en los casos de patogenicidad. Esta interacción estable entre bacterias y plantas puede observarse como la formación de colonias en la superficie radicular, el establecimiento en los espacios periplasmáticos e intercelulares, la formación de nódulos, etc. Las raíces de las plantas pueden dividirse en tres zonas con diferentes actividades y diferente desarrollo celular: tip radicular, zona de elongación y zona de maduración, en la que se desarrollan los pelos radiculares y las raíces laterales (Verbon y Liberman 2016). Se ha visto que uno de los aspectos de importancia en la interacción planta-bacteria es la forma en que éstas colonizan las diferentes partes de la planta. Las bacterias pueden adherirse para su crecimiento a casi en cualquier superficie, incluyendo las diferentes partes de las plantas. Cuando las interacciones son específicas el patrón de colonización es bien determinado, tanto en estructura (biofilm, microcolonias, monocapa, etc.) como en localización. Por ejemplo, el patógeno *Ralstonia solanacearum* ingresa dentro de las células de las hojas de tomate y forma estructuras similares a biofilms en los espacios intracelulares (Mori et al. 2016). La zona donde se localizan las bacterias cambia entre distintas especies, *Kluyvera ascorbata* coloniza los dos tercios superiores de la raíz de canola (Ma et al. 2001) y no se encuentran bacterias en el tip radicular. Incluso una misma bacteria puede colonizar diferentes partes de la raíz cuando



interactúa con plantas diferentes, tal es el caso reportado por Fan y colaboradores, quienes demostraron que la localización de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre la raíz depende de la especie de planta con la que interactúa (Fan et al. 2011). El patrón de colonización no determina qué tipo de interacción tendrá la bacteria con la planta, en el sentido de si será beneficiosa, perjudicial o neutra, dado que hay múltiples reportes de bacterias patógenas que presentan el mismo patrón de colonización que bacterias PGPR (Danhorn y Fuqua 2007; Mansfield et al. 2012). Sin embargo, en algunos casos tanto donde y de qué manera se ubica la bacteria en la planta determinará el efecto que ésta pueda tener en la misma. Un ejemplo de esto es la capacidad de formar biofilm, en *Bacillus subtilis* que es de suma importancia en la determinación de su actividad PGPR (Chen et al. 2013).

En este trabajo se trató de determinar el tipo de interacción que tiene *P. extremaustralis* con diferentes plantas. Se comprobó la colonización de raíz en plantas de trigo, maíz y *Arabidopsis* en diferentes condiciones de cultivo. Se observó que *P. extremaustralis* es capaz de adherirse a raíces de trigo con un patrón de colonización similar al encontrado en *P. protegens* Pf-5 y otras conocidas promotoras del crecimiento vegetal y que forma agregados en la zona de maduración de la raíz, donde ocurre el crecimiento de raíces laterales y formación de pelos radiculares. También se observó que su patrón de colonización era diferente cuando las plantas de trigo eran cultivadas en medio de cultivo rico o deficiente en fósforo. Estas diferencias no parecen estar asociadas a diferencias en el número de bacterias dado que los valores de recuentos en placa y de células fluorescentes al microscopio fueron similares. Por microscopía confocal, se pudo determinar que las microcolonias estaban localizadas principalmente en la zona de maduración de la raíz primaria y laterales. Se observó que se encuentra en la zona de pelos radiculares, solo en la superficie radicular. No se observó colonización de los espacios intercelulares ni periplásmicos y sólo se detectó el ingreso de bacterias dentro de los cuerpos celulares en células de la corteza que se encontraban dañadas. Durante los ensayos para determinar el patrón de colonización se observó que la morfología de las raíces de las plantas inoculadas con *P. extremaustralis*, las inoculadas con *P. protegens* Pf-5 y las plantas control, sin inoculación bacteriana, presentaban algunas diferencias morfológicas. Estas observaciones, que resultaron interesantes, nos impulsaron a hacer un

análisis más detallado de esto para lo cual se estableció una colaboración con el grupo encabezado por el Dr. José Estevez del Instituto Leloir, que se encuentra en marcha. Se comenzaron ensayos de desarrollo radicular en *Arabidopsis thaliana* en co-cultivo con *P. extremaustralis*, en los que se observó un acortamiento de la raíz principal y un aumento en la densidad de pelos radiculares cuando las plantas fueron inoculadas con *P. extremaustralis*, además de menor desarrollo de raíces laterales. Se pudo visualizar un patrón de desarrollo diferente al de las plantas control y la presencia de raíces más gruesas y blancas en las plantas inoculadas. Luego de 10 días de cultivo las plantas tratadas presentaban un aspecto general similar al de las plantas control. Cambios similares en la morfología de la raíz se han reportado en especies del género *Azospirillum* y *Pseudomonas*, con algunas diferencias principalmente a nivel de desarrollo de raíces laterales (Zamioudis et al. 2013; Cassán et al. 2014). El patrón de acortamiento de la raíz principal y el mayor desarrollo y densidad de pelos radiculares se ha observado luego de la inoculación de maíz con *Azospirillum brasilense*, que promueve el desarrollo de pelos radiculares aumentando la superficie de absorción de la raíz (Fallik et al. 1994). Los cambios en la morfología de la raíz en estos trabajos se asociaron principalmente a la síntesis de la hormona AIA (Spaepen et al. 2008). Los efectos observados en la morfología de la raíz por la producción de AIA por parte de las bacterias son variados y dependen de la dosis y el tipo de inoculación. La cuantificación de la producción de AIA dio buenos resultados para las cepas *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5. Los valores obtenidos fueron 18,5 µg/ml y 8,2 µg/ml respectivamente, la producción de AIA fue mayor en *P. extremaustralis* tanto a 28°C como a 8°C. Ambas especies poseen las vías de síntesis denominadas IAM y IAN (Cassán et al. 2014). Es de gran interés determinar si la alta producción de compuestos con grupo indol derivados de triptófano producidos por *P. extremaustralis* es responsable de los cambios en el desarrollo de la raíz observados en *Arabidopsis thaliana*. Para esto se propone continuar con ensayos de desarrollo radicular, construyendo alguna mutante en la síntesis de esta hormona, aprovechando las ventajas de conocer su genoma y cuáles son los genes probablemente involucrados en la síntesis de este compuesto, descritos en este trabajo.

Dado que la síntesis de sideróforos es de relevancia en la promoción de crecimiento vegetal, un aspecto que se analizó en profundidad fue la síntesis de pioverdina. Se realizó la búsqueda

en el genoma de *P. extremaustralis* hallándose genes relacionados a la síntesis, regulación y transporte de este sideróforo. El análisis de la región regulatoria de los genes permitió predecir la presencia de promotores típicamente descritos, además de sitios de unión a FUR y a PVDS (Leoni et al. 2000; Venturi et al. 1995) ubicados de manera similar a lo reportado en *P. aeruginosa* PA01. La producción de pioverdinas fue mayor en *P. protegens* Pf-5 que en *P. extremaustralis* solo a 28°C. Cuando ambas cepas fueron cultivadas a 8°C produjeron cantidades similares de PVD, es interesante remarcar que en relación al crecimiento de las bacterias (fluorescencia/DO) la producción de PVD fue mayor a 8°C con respecto a 28°C. También se analizó la producción de PVD en microaerobiosis y aerobiosis dado que la búsqueda de secuencias de unión a reguladores en la región río arriba del gen *pvdS* mostró la presencia de sitios con alta similitud al sitio de unión a FNR (Scott et al. 2003), el cual se sabe también es reconocido por el regulador de *Pseudomonas* ANR (Ugidos et al. 2008). Esta búsqueda se realizó en forma automática con el programa PRODORIC que busca sitios consenso para el FNR de *E. coli* y para el ANR de *P. aeruginosa*. El sitio consenso para *P. extremaustralis*, estudiado en nuestro laboratorio, mostró leves diferencias con el propuesto para ambas bacterias (Tribelli et al., 2013a). Además este sitio consenso o “logo genómico” para ANR posee distinta frecuencia para cada base que lo compone, lo que determina que para determinados genes el sitio FNR de *E. coli* pueda dar un mejor ajuste mediante esta búsqueda automática, como ocurrió en el caso de los genes de pioverdinas. La ubicación de este potencial sitio de unión de ANR se encuentra cercana a la región ATG de *pvdS* en ambas cepas. Dado que ANR es el principal regulador de la transición de aerobiosis a anaerobiosis en *Pseudomonas*, nos preguntamos si ANR podría tener un efecto en la síntesis de PVD y para ello se incorporó una cepa mutante *anr* en el análisis. Se observó que *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 produjeron mayor cantidad de PVD en aerobiosis en comparación con microaerobiosis. La cepa mutante produjo mayor cantidad que la cepa salvaje en ambas condiciones. Estos resultados muestran un efecto represor de ANR sobre la producción de PVD en *P. extremaustralis*. Si bien todavía no hemos podido demostrar un efecto directo sobre la expresión de los genes de síntesis o regulatorios, hay reportes indican que ANR tiene efecto sobre la transcripción de genes involucrados en la incorporación de hierro en otras

*Pseudomonas*. Se ha observado que mutantes *anr* de *P. aeruginosa* presentan una expresión alterada de los genes de incorporación de hierro, aumentando entre 2 y 5 veces la expresión de genes relacionados a la síntesis de PVD, como *pvdA*, *pvdN*, *pvdM*, y *pvdS* (Hammond et al. 2015) y disminuyendo la síntesis de transportadores de PVD involucrados en el ingreso de PVD a la célula, en coincidencia con lo hallado en este trabajo. Estos resultados también son coincidentes con resultados de transcriptómica en condiciones de microaerobiosis de *P. extremaustralis* mediante la técnica de RNA-seq de nuestro laboratorio que muestran que el gen *pvdA* (locus\_tag: PE143B\_0117850) se encuentra reprimido en microaerobiosis (Tribelli, resultados no publicados).

La solubilización de fósforo es uno de los mecanismos más importantes por el cual las *Pseudomonas* del grupo de las Fluorescentes pueden favorecer el desarrollo de las plantas. *P. extremaustralis* es una especie naturalmente resistente a condiciones extremas como son las bajas y altas temperaturas y el estrés oxidativo (Ayub et al. 2004; Ayub et al. 2009). Por este motivo, se analizó la solubilización de fósforo en condiciones de estrés por frío para evaluar su potencial para ser aplicada en suelos con esas características. Se probó que es capaz de solubilizar fósforo orgánico (fitato de sodio) e inorgánico (fosfato tricálcico) manteniendo la capacidad solubilizadora a diferentes temperaturas. La comparación con *P. protegens* Pf-5 mostró diferencias en la solubilización de fosfato de calcio y mineralización de fitato cuando fueron cultivadas en frío, siendo mayor la capacidad solubilizadora y mineralizadora de fósforo de *P. extremaustralis* a 8°C, aunque ambas mostraron buen crecimiento en esas condiciones. Esto podría estar relacionado con el hecho de que *P. extremaustralis*, por proceder de un ambiente frío, posee su fisiología mejor adaptada a esas condiciones, dado que en comparación con *P. protegens* Pf-5 posee una batería más completa de proteínas relacionadas con la adaptación al frío (Csp, Cap, y 3 ORF con dominios de adaptación al frío) y un menor tiempo de retardo cuando es cultivada en frío (Raiger Lustman et al. 2015). Esto también está apoyado por los resultados del estudio del transcriptoma en condiciones de baja temperatura en *P. extremaustralis* que permitieron la identificación de nuevos componentes involucrados en los mecanismos de adaptación al frío en esta bacteria, tal como el papel de la oxidación del etanol para el crecimiento en esas condiciones (Tribelli et al. 2015).

Se analizó también la influencia de la síntesis de PHB, uno de los compuestos producidos más destacables de esta bacteria, en relación a la solubilización de fósforo. Se observó que una cepa mutante para la síntesis de este polímero (mutante en *phbC*) solubiliza mayor cantidad de fosfato tricálcico que la cepa salvaje. Por otro lado, la cepa salvaje cuando es previamente cultivada en medio de acumulación del polímero (con alta relación C/N y con octanoato de sodio como fuente de carbono) es capaz de solubilizar mayor cantidad de fósforo que cuando es precultivada en el mismo medio sin octanoato, ambos resultados hacen pensar que un exceso de carbono que no es destinado a la síntesis de PHB favorecería la solubilización, pudiéndose redigir el carbono a la síntesis de ácidos.

Los mecanismos implicados en la solubilización de fósforo inorgánico involucran la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Miller et al. 2010). *P. extremaustralis* y *P. protegens* Pf-5 mostraron diferencias en la producción de ácidos orgánicos liberados al medio. No se encontraron diferencias en la naturaleza de los ácidos liberados al medio extracelular entre las diferentes condiciones de cultivo para ninguna de las cepas pero sí se vieron afectadas las concentraciones de cada uno, que en todos los casos fue menor a 8°C. Si bien hubo diferencias en la concentración y tipos de ácidos entre las especies bacterianas esto no redundó en una diferencia en el pH del medio, el cual alcanzó valores entre 3,5 y 4 a 28°C y entre 5 y 5,5 a 8°C luego de 72 h de cultivo. Tampoco se observó diferencia en la capacidad solubilizadora de fósforo en ninguna condición en medio líquido, a diferencia de lo ocurrido en medio sólido, ambas solubiliaron cantidades similares de fósforo a las dos temperaturas analizadas. La capacidad solubilizadora de *P. extremaustralis* resultó diferente en medio líquido y en medio sólido, en medio sólido mantiene la capacidad solubilizadora cuando es cultivada a 8°C a diferencia de los cultivos en medio líquido donde se ve disminuida. Para determinar si la diferencia en la solubilización depende del modo de crecimiento planctónico vs biofilm se realizaron cultivos en placa *multiwell* hasta el desarrollo de biofilm. Sin embargo, los resultados mostraron el mismo patrón de ácidos observado en los cultivos en medio líquido en Erlenmeyers, sin diferencias en la solubilización de fosfato tricálcico tanto a 8 y a 28°C. Con el objetivo de determinar si *P. extremaustralis* era capaz de solubilizar fosfato en condiciones más similares al ambiente natural, como por ejemplo unida a las raíces de las

plantas, se realizaron estudios en presencia de planta y bacteria con distintas características. Los experimentos con plantas utilizando medios de cultivo pobres en fósforo soluble no mostraron un efecto beneficioso de *P. extremaustralis* en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos ensayos se realizaron en condiciones controladas en la cuales las plantas se cosecharon a los 10 días de sembradas, tiempo de desarrollo corto, en los cuales la nutrición de la planta es en gran medida aportada por las reservas de la semilla. Por este motivo, el tiempo de cultivo en estos experimentos puede haber sido insuficiente para observar diferencias entre el tratamiento con la bacteria y las plantas control, sin inoculo. Para poder observar la interacción en un período de tiempo mayor, que permitiera el mejor desarrollo de las plantas, se realizaron experimentos controlados en macetas, utilizando como sustrato tierra tinalizada perlita 1:1, durante 30 días y con un número mayor de réplicas por tratamiento (18 plantas). En este caso el crecimiento de las plantas mostró resultados interesantes, observándose diferencias en el peso seco del vástago entre el tratamiento con *P. extremaustralis* y el control sin inoculo, y la concentración de fósforo total en la planta. En conjunto, los resultados muestran que *P. extremaustralis* es capaz de interactuar con las plantas evidenciando efectos sobre las mismas. Estos resultados son sumamente interesantes para seguir investigando la interacción de esta bacteria con distintos tipos de plantas, a fin de determinar los mecanismos por los cuales modifica el desarrollo radicular. Asimismo, sería interesante analizar la capacidad promotora del crecimiento de plantas de trigo en condiciones más rigurosas en presencia de los microorganismos nativos del suelo, haciendo uso de la capacidad de esta bacteria de afrontar diferentes condiciones de humedad del suelo y diferentes temperaturas.

## Capítulo 2: Influencia de plantas GM sobre las comunidades bacterianas del suelo.

### Introducción:

Durante la primera parte de esta tesis se estudió el efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas y en particular nos planteamos que ocurriría con esas capacidades en situaciones de estrés. Se hizo referencia a la liberación de compuestos ricos en carbono por las raíces de las plantas (rizodepositos) y como estos son de gran importancia en la interacción de la plantas con las bacterias del suelo, haciendo énfasis en las maneras en que estas interacciones pueden afectar la salud de las plantas, mejorando la incorporación de nutrientes, estimulando el crecimiento por la síntesis de hormonas e incluso aliviando los síntomas de estrés abiótico.

Se destacó la importancia de las bacterias sobre la salud de las plantas, principalmente haciendo hincapié en la utilización de inoculantes bacterianos para el aumento de la productividad de cultivos de interés agronómico. De alguna manera, se planteó la interacción planta-bacteria desde la bacteria hacia la planta.

En esta parte de la tesis se enfocará esta temática en la dirección contraria, se estudiará la influencia de las plantas sometidas a estrés sobre la comunidad de bacterias asociadas a ellas. Para esto se analizará el impacto de diferentes genotipos de plantas de maíz (*Zea mays*) en la composición de las comunidades bacterianas del suelo en diferentes condiciones de humedad.

Estudiar la interacción planta-bacteria en ambas direcciones es necesario porque se debe conocer la composición, ecología, dinámica y actividad de las comunidades microbianas del suelo, si queremos utilizar los microorganismos como una herramienta para el desarrollo de una agricultura sostenible.

El empleo de plantas GM y sus líneas parentales para el estudio de interacciones a nivel de comunidades es una buena aproximación ya que se reducen las variables genéticas, se simplifican las diferencias entre las líneas a estudiar a un solo gen. Reducir las variables en el estudio de la interacción de un organismo con la microbiota asociada es de gran ayuda en el análisis de procesos multifactoriales complejos.

Además de las posibilidades que brinda el estudio de plantas GM en comparación con sus líneas parentales, es necesario comprender los efectos que puede tener la incorporación de nuevas tecnologías en la producción de alimentos. Particularmente en este aspecto es necesario realizar un estudio global de los cambios que puede producir la introducción de

un nuevo evento de transgénesis, desde los cambios en los microorganismos del suelo, el efecto en los demás cultivos hasta en los cambios socioculturales y económicos que pueden llegar a tener. Los cambios en los sistemas de producción de alimentos tienen efectos en todos los aspectos sociales.

Las plantas pueden impactar directa o indirectamente en las funciones y diversidad de las comunidades microbianas del suelo. Los microorganismos juegan un papel fundamental en el ambiente debido a que son parte fundamental de procesos tales como la degradación de materia orgánica, intervienen en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, mantienen la calidad ambiental y fertilidad del suelo.

La estructura, riqueza y diversidad de la microbiota del suelo depende de las condiciones físico químicas como, la humedad, el pH, las disponibilidad de fuentes de carbono, y concentración de diferentes nutrientes. Los estudios desarrollados durante los últimos años sobre la estructura de comunidades de hongos y bacterias del suelo también han demostrado que las diferentes especies de plantas pueden influenciar fuertemente la composición y actividad de la microbiota de la rizosfera, modelando las comunidades bacterianas de manera característica especie-específica (Philippot et al. 2013). Esto se debe a que las plantas pueden modificar los factores fisicoquímicos mencionados en el suelo cercano a las raíces. Estos cambios asociados a la presencia de diferentes especies vegetales se pueden explicar por las diferencias en la morfología de las raíces, la composición de los rizodepositos y material vegetal en descomposición, los cuales contribuyen fuertemente en el desarrollo de los microorganismos del suelo. También se sabe que los microorganismos de la rizosfera pueden ser afectados diferencialmente por el genotipo de las plantas. La comparación de la microbiota de diferentes variedades de maíz, en 5 suelos a través de la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, mostró que un alto porcentaje de la variación en la diversidad microbiana se debía a la variedad de planta utilizada, concluyendo que distintos genotipos de la misma especie muestran diferencias en las bacterias de la rizosfera y estas diferencias se mantienen en diferentes suelos (Lundberg et al. 2013).

Los trabajos realizados sobre metabolitos específicos liberados en la rizosfera mostraron que pueden desencadenar múltiples respuestas en diferentes microorganismos del suelo (Berendsen et al. 2012). Por ejemplo, los flavonoides pueden atraer no solo simbioses como *Bradyrhizobium japonicum*, sino también patógenos, además pueden estimular la germinación de esporas y desarrollo de hifas de hongos del suelo, mostrando una conexión entre los diferentes genotipos y como podrían modelar la microbiota asociada a sus raíces y por lo tanto los procesos que se dan en el suelo (Sessitsch et al. 2002).



## **Plantas genéticamente modificadas y su efecto en la microbiología del suelo.**

El empleo con fines comerciales de plantas GM con capacidad de resistir tanto herbicidas como estrés biótico y abiótico, se viene desarrollando a nivel mundial desde los últimos 30 años, estos cultivos dominaron los sistemas de producción agrícola de muchas regiones, incluido Argentina en pocos años (GAIN Report 2012). El desarrollo de plantas GM se incrementa año tras año y actualmente en Argentina están habilitados para la comercialización 4 eventos en algodón, 42 en maíz y 8 en soja (fuente: ISAAA, <http://www.isaaa.org>).

Muchas de estas plantas fueron transformadas con genes que producen toxinas para insectos, como las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, o que producen compuestos que inhiben el desarrollo de algún patógeno del suelo (gen *Rpi-vnt1* que confiere resistencia a patógenos fúngicos en papa. Muchos de estos “nuevos” compuestos producidos por las plantas GM se expresan de manera constitutiva y se acumulan en tallo, hoja y raíces siendo degradados en última instancia por los microorganismos del suelo, por este motivo se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales las plantas GM podrían afectar a los microorganismos del suelo (Liu, et al. 2010). Estos comprenden: los niveles de actividad de las proteínas transgénicas expresadas por las raíces de las plantas GM que se acumularían en el suelo produciendo un efecto directo sobre los microorganismos. Por otra parte, los cambios en la composición de los exudados de las raíces, actuarían a nivel de la rizósfera afectando la estructuración y funcionalidad de las comunidades microbianas. Además, la posible transferencia de genes a plantas silvestres podría provocar la modificación de la afinidad con organismos simbióticos, tales como rizobacterias y hongos micorrízico-arbusculares (MA), que podría afectar la productividad de los cultivos a largo plazo o afectar la interacción de las plantas con los microorganismos utilizados como promotores del crecimiento vegetal.

Numerosos estudios se dedicaron intentar comprender como afectan los cultivos de GM a las comunidades microbianas del suelo en estructura y funcionalidad (Turrini et al. 2015). Algunos estudios han analizado aspectos relacionados con el impacto de estos organismos sobre el medio ambiente por cambios en el manejo agrícola producto de la implementación de plantas transgénicas que están asociadas a nuevos manejos y tecnologías, como la aplicación de herbicidas post emergencia y siembra directa (Carbonetto et al. 2014).

Los resultados de estos trabajos indican que es difícil realizar generalizaciones dado que distintos eventos transgénicos muestran diferentes efectos sobre las comunidades del suelo (Turrini et al., 2015). Por este motivo, el estudio comparativo de la diversidad de la comunidad bacteriana asociada a plantas transgénicas resulta de interés para determinar posibles alteraciones.

Si bien el uso de estos organismos ha resultado sumamente beneficioso para incrementar la producción vegetal es necesario realizar estudios que evalúen el efecto de la introducción de los mismos en el ecosistema.

En los ejemplos que acabamos de mencionar de estudios que determinaron el impacto de plantas GM en el suelo, y en la mayoría de los reportes, los efectos se deben a la liberación de compuestos específicos que afectan directamente a los hongos y bacterias (Rasche et al. 2006). Al mismo tiempo se ha avanzado sobre el conocimiento de los compuestos que al ser secretados por las raíces seleccionan específicamente poblaciones de microorganismos (Bais et al. 2006), y sobre como la composición de exudados radiculares depende de factores externos. En maíz por ejemplo, la composición de los exudados es diferente en situaciones en las que un nutriente es limitante (Carvalhais et al. 2011). Por lo tanto las plantas pueden modelar la comunidad de la rizosfera de manera diferente dependiendo de sus características genéticas y de los factores ambientales del entorno, como la disponibilidad de nutrientes.

Como ya mencionamos, en esta parte de la tesis, se analizó el impacto de plantas de maíz GM que portan el gen Hahb-4 en dos situaciones de humedad en dos suelos diferentes. La pregunta que se propone responder es la siguiente: ¿cómo afecta la adaptación de las plantas al estrés a la comunidad bacteriana asociada a las raíces durante estrés hídrico?

## **Plantas Hahb-4**

Las plantas están continuamente expuestas a cambios ambientales adversos. Una de las situaciones de estrés que limita el crecimiento de las plantas en mayor medida es la falta de agua, que puede desencadenar respuestas a estrés que detienen el crecimiento.

La expresión de ciertos genes confiere resistencia a estrés incrementando la capacidad de adaptación a cambios ambientales. Por ejemplo, el factor de transcripción Hahb-4 de girasol (*Helianthus annuus* L.) es regulado por la disponibilidad de agua, ácido abscísico y la salinidad del suelo. La sobre-expresión de este gen inhibe la percepción de etileno y ácido jasmónico, retrasando la senescencia de las plantas sometidas a estrés hídrico llevando a una respuesta heteróloga conservada en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Manavella et al. 2008).

La utilización de plantas que posean este gen resulta de interés para el estudio del efecto sobre las comunidades del suelo porque este efecto será producto de una diferencia en la percepción del estrés generado por la falta de agua. Se plantea que las plantas modificadas con el factor de transcripción Hahb4 pueden afectar a la comunidad bacteriana por una diferencia en el metabolismo activo de la planta y no por la liberación de proteínas tóxicas, antibióticos o por inhibir el crecimiento de algún organismo en particular.

Por otra parte, la liberación al mercado de plantas tolerantes a sequía se aprobó recientemente en Argentina. La comercialización de un evento de soja GM con el gen Hahb-4 (evento: IND-ØØ41Ø-5) tolerante a la sequía se autorizó en 2015, y no se han realizado estudios hasta la fecha que examinen la interacción entre las plantas tolerantes a la sequía y las comunidades bacterianas.

## Producción de Maíz

En Argentina el maíz es el tercer cultivo en importancia junto con la soja y el trigo. En el año 2014 se produjeron 33 millones de toneladas y se cosecharon cerca de 4.8 millones de hectáreas (FAOSTAT 2014). Además de ser un cultivo de importancia económica por el volumen de producción, es estratégico en el sistema productivo actual por su importancia en las rotaciones con soja.

La producción de maíz en Argentina se extiende desde Salta hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, con su zona núcleo en Córdoba, noroeste de Buenos Aires, sur de Santa Fe y Entre Ríos. Por lo que se espera que plantas de maíz GM tolerantes a la sequía puedan ser de utilidad para incrementar la producción de este cultivo en áreas marginales de menores precipitaciones, correspondientes a regiones subhúmedo/semiáridas de la clasificación de De Martone (Fig. 2) incorporadas al sistema productivo en los últimos años.

## Análisis de la diversidad de la comunidad bacteriana

En la actualidad las técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento constituyen una herramienta adecuada para el estudio de las comunidades bacterianas e involucran el análisis del DNA total de la comunidad. Existen distintas posibilidades para realizar esta evaluación en cuanto a que se va a secuenciar, así se puede analizar un gen marcador en toda la comunidad lo que permite determinar la diversidad taxonómica y actualmente se denomina secuenciación de amplicones (amplicon sequencing) y el gen utilizado es generalmente el que codifica la subunidad pequeña del ribosoma (16S rRNA). Por otro lado, se podría analizar la diversidad funcional total de la comunidad, lo que se denomina metagenómica, que permite secuenciar todos los genes pertenecientes a los genomas presentes en el DNA total de la comunidad de un ambiente. Los estudios de comunidades bacterianas basadas en secuenciación de amplicones utilizan *primers* universales correspondientes a algunas de las nueve regiones variables (V1-V9) presentes en el gen 16S rRNA.

Los resultados del análisis de comunidades microbianas por secuenciación de amplicones permiten utilizar herramientas del campo de la ecología de comunidades. Uno de los objetivos básicos del análisis de comunidades es la cuantificación de la diversidad biológica. La ecología de comunidades utiliza estimadores (índices) para realizar esta cuantificación. Los análisis de la denominada alfa diversidad se basan en el estudio de un único sitio. Este análisis de diversidad, también conocido como diversidad "intra-hábitat", emplea distintos índices que consideran la riqueza (cantidad de especies, u OTU [unidades taxonómicas operacionales], en el caso de secuencias), la equitatividad o grado

de uniformidad (distribución de abundancias de las especies encontradas) o su opuesto la dominancia. Los índices dan distinto valor a cada uno de estos componentes de la diversidad de manera que generalmente se emplean varios de ellos para caracterizar la diversidad alfa. Los índices más conocidos son el de Shannon, cuyo valor depende del número de especies y del grado de uniformidad del reparto de los individuos en las especies, y el índice de Simpson, que considera la dominancia y mide la probabilidad de que dos organismos extraídos al azar de una comunidad pertenezcan a la misma especie (Rodríguez y Fraga 1999). Estos índices tratan de reflejar, si hay o no dominancia de algunas pocas especies en la comunidad, en otras palabras si el número de “individuos” (lecturas en el caso de secuencias) se distribuye uniformemente entre las diferentes especies (OTUs). Esta información resulta de utilidad porque la comunidad es diferente si posee una especie que tiene el 91% de los individuos y 9 especies con el 1 % o si en cambio tiene 10 especies con el 10 % de los individuos cada una.

Por otro lado, los análisis de la denominada diversidad beta o diversidad entre hábitats permiten ver cambios entre sitios. Existen también distintos estimadores ecológicos utilizados para este tipo de análisis, siendo los más utilizados Bray Curtis, Weighted Unifrac y Unweighted Unifrac (Lozupone y Knight 2005; Lozupone et al. 2011). El análisis de Bray Curtis tiene en cuenta la presencia y abundancia de especies. Unifrac, tiene en cuenta además la relación filogenética entre organismos y mide el cambio en historia evolutiva. En el caso de Weighted Unifrac se consideran las abundancias relativas de cada linaje u OTU para dar un peso a cada rama del árbol, mientras que Unweighted Unifrac sólo tiene en cuenta la presencia o ausencia de cada especie u OTU en cada muestra. Los índices de  $\beta$  diversidad pueden entonces ser clasificados en dos grandes grupos, cualitativos (los cuales tienen en cuenta las abundancias relativas de cada taxón), como Bray Curtis y Weighted Unifrac y cualitativos (los cuales solo tienen en cuenta presencia/ausencia de cada taxón) como Unweighted Unifrac. Si bien ambos pueden dar información de la distancia entre comunidades, funcionarán de manera diferente dependiendo del origen de la diferencia entre estas comunidades.

Los índices cualitativos describen mejor las diferencias entre comunidades dentro de un gradiente o que han sufrido una perturbación que determina cambios en las proporciones de las especies en la población, como por ejemplo en incremento repentino de un nutriente que permite la “explosión” de un determinado grupo de organismos capaces de utilizar ese nutriente.

Las medidas cualitativas, que ignoran la abundancia relativa, describen mejor a las poblaciones que se diferencian por características que determinan que organismos viven ahí. Por ejemplo los ambientes extremos como aguas termales, o las comunidades en que sus diferencias son producto de su origen, como se vio en los estudios de comunidades bacterianas de intestino de ratón (Lozupone et al. 2007; Ley et al. 2005).

Independientemente de que tipo de métrica sea, el objetivo de todas ellas es, en última instancia, construir matrices de distancias donde se comparan todas las muestras entre sí en función de la composición de especies.

Para que los valores de los índices de diversidad alfa y beta sean comparables entre muestras, es necesario que el esfuerzo de muestreo haya sido similar y normalmente se recurre a un procedimiento denominado rarefacción, utilizado para estandarizar tamaño de muestra desigual, que se basa en el submuestreo al azar de la muestra.

Los datos de secuenciación de amplicones del gen del 16S rRNA permiten entonces utilizar estimadores ecológicos para cuantificar la diversidad y permiten hacer comparaciones sujetas a comprobación estadística entre la diversidad de distintos hábitats o la diversidad de un mismo hábitat.

Dado que se plantea que las plantas GM que llevan el factor de transcripción Hahb4 no liberan proteínas tóxicas al medio su principal efecto sobre la comunidad bacteriana estará dado por la diferencia en la respuesta de la planta frente al estrés. En base a esto, se postula la siguiente hipótesis.

**Hipótesis de trabajo:**

*Se hallará mayor similitud en las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas Hahb4 que en las asociadas a la rizosfera de plantas salvajes en la comparación entre sequía y buena irrigación.*

En base a esto se planteó el siguiente objetivo específico:

**Objetivo específico:**

3.- Análisis de la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas de maíz genéticamente modificadas resistentes a la sequía, a través de la tecnología de secuenciación de amplicones.

## Materiales y Métodos

Para el desarrollo de esta parte del trabajo se seleccionaron suelos que poseen diferencias agroclimáticas, de salinidad y régimen de lluvias. A partir de los mismos se realizaron aislamientos de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y experimentos utilizando plantas de maíz genéticamente modificadas para analizar la diversidad de la comunidad bacteriana.

### *Material vegetal y suelos utilizados:*

Las semillas de maíz utilizadas para este trabajo fueron desarrolladas y provistas por INDEAR en el marco del proyecto FONARSEC (FSBIO-Agrobiotecnología-03).

Se utilizaron cinco líneas de plantas de maíz (*Zea mays*), dos líneas GM que expresan el gen Hahb4 que confiere resistencia a sequía y salinidad (Manavella *et al.*, 2006; Manavella, Dezar, Ariel, *et al.*, 2008; Manavella, Dezar, Bonaventure, *et al.*, 2008): 3H y 4H. Otras dos líneas fueron segregantes negativas transformadas con Hahb4 pero sin expresión del mismo: 2N y 4N y la variedad parental salvaje que fue utilizada como control B104 (Hallauer *et al.*, 1997). Las semillas de maíz fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en hipoclorito de sodio 3% v/v durante 10 minutos y posteriormente lavadas tres veces consecutivas con agua bi-distilada estéril.

Las semillas se pre germinaron en placa de Petri con agar 0.3% para poder seleccionar un lote de plántulas homogéneo. En el estadio en que las plántulas tenían una radícula de aproximadamente 2 cm de largo y comenzaban a desarrollar la primera hoja se las colocó en macetas individuales conteniendo suelo obtenido de dos localidades seleccionadas por su régimen hídrico: Rio Cuarto (Córdoba, Argentina; 33°11'50"S; 64°07'40"W, descrito como sub húmedo (Hurtado *et al.*, 2006; Rubí Bianchi *et al.*, 2010), con precipitaciones anuales entre 800/900 mm e Inés Indart (Buenos Aires, Argentina; 34.290369 S, 60.499936 W) clasificado como húmedo (De Martonne, 1926; Rubí Bianchi *et al.*, 2010), con precipitaciones anuales entre 1000/1100 mm anuales.

El suelo fue homogeneizado y pasado por zaranda de 3 mm para romper agregados grandes que puedan dar heterogeneidad en el armado de las macetas, luego colocado en macetas de 3L de capacidad conteniendo 1,3 kg de suelo seco. Cada maceta se pesó individualmente para evitar efectos en el crecimiento de las plantas por diferencias en la cantidad de sustrato.

*Capacidad de campo de los suelos utilizados:*

La capacidad de retención de agua de cada suelo se determinó colocando 100 g de suelo en estufa a 70°C hasta peso constante y luego se colocaron 50 g en bureta de 500 ml de capacidad en la que se colocó viruta de acero en el extremo inferior impedir la pérdida de suelo pero permitir que el agua escurra libremente. Se fijó un recipiente en la parte inferior para recolectar el excedente de agua escurrido del sistema. Por último se agregaron 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada dentro de la probeta. Este sistema se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 3 días. Luego de transcurrido este tiempo se realizó la medición de agua contenida en el recipiente de recolección. La capacidad de campo del suelo se determina realizando el cálculo de la diferencia en gramos de agua colocada y agua recolectada en el recipiente de recolección, dividido por los gramos de suelo colocados en la probeta y multiplicado por 100. De esta manera se obtiene un valor porcentual de cantidad de agua que es capaz de retener cada suelo, en gramos de agua/gramos de suelo.

*Ensayos en cámara de cultivo:*

Los ensayos con plantas GM se realizaron en cámara de cultivo con condiciones controladas de temperatura (25-30°C) e iluminación (16/8 h luz/oscuridad), con dos tratamientos de humedad de suelo: 30 a 50% de la capacidad de campo (déficit hídrico) y 80 a 100% de la capacidad de campo (buena irrigación). Este régimen hídrico se comenzó a aplicar a partir de los 15 días luego de colocadas las plántulas en las macetas, para favorecer una buena implantación y desarrollo de las plantas durante la primera etapa de crecimiento. Hasta ese momento todas las macetas fueron mantenidas con una humedad de 100% de capacidad de campo.

Para lograr el nivel de humedad propuesto para cada tratamiento se tomaron muestras de tierra de cada maceta cada 3 días, estas se pesaron y secaron en horno microondas hasta peso constante, se calculó la cantidad de agua en cada muestra y se regó cada maceta con la cantidad de agua necesaria para lograr la humedad correspondiente.

Cada tratamiento consto de 5 réplicas (5 macetas) con una única plántula, para cada variedad de semilla para cada uno de los tratamientos de irrigación En total se contó con 50 macetas para cada suelo.

*Determinación de parámetros relacionados con el crecimiento vegetal:*

Luego de finalizado el experimento se determinaron: la biomasa del vástago mediante la cuantificación del peso seco en estufa a 105°C hasta alcanzar peso constante.

*Toma de muestras de suelo:*

Se tomaron muestras de 5 macetas al azar antes de colocar las semillas, considerando ese el día cero, se denominó a estas muestras "T0". Luego de 45 días se tomaron muestras "T1" de cada maceta con sacabocado haciendo cuatro perforaciones a 5 cm de la plántula, cubriendo toda la profundidad de la maceta. Estas muestras se mezclaron y preservaron en freezer a -80 °C hasta la extracción de DNA. A los 60 días se retiraron las plantas de las macetas y se recolectó la tierra adherida a las raíces "T2" que se preservaron de la misma manera descripta anteriormente.

En esta instancia también se tomaron muestras de las raíces de cada planta para realizar mediciones de colonización de hongos micorrizico-arbusculares utilizados para medir el impacto de cada tratamiento en la colonización de hongos. Mientras la parte aérea de la planta se colocó en estufa para realizar mediciones de parámetros de crecimiento como peso seco.

*Extracción de DNA:*

Para la extracción de DNA total se utilizaron 0,250 g de suelo seco y procesado con mortero, se utilizó para la extracción el kit comercial "Powersoil DNA extraction kit" de MoBio, según las especificaciones del fabricante.

Las extracciones de DNA se cuantificaron con nano drop y se preservaron en freezer a -80°C hasta el momento de la secuenciación.

*Secuenciación de amplicones del gen 16s rRNA:*

Para los estudios de diversidad de las comunidades, se enviaron a secuenciar 3 réplicas para cada tratamiento seleccionado. La secuenciación se realizó utilizando los servicios de MR DNA (Molecular Research), Texas, USA, utilizando un secuenciador Illumina MiSeq y el siguiente procedimiento. Se amplificó la región variable V1-V3 del gen que codifica el 16S RNA



ribosomal con los primers 27F y 519R. Se agregó al *primer forward* una secuencia de identificación (*barcode*) para la individualización posterior de cada muestra.

El protocolo de PCR para la amplificación consistió en 28 ciclos utilizando la enzima *HotStar Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen USA)* siguiendo el protocolo descrito a continuación: 94°C por 3 minutos, seguido de 28 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 40 segundos y 1 minuto a 72°C, luego de lo cual se realizó una elongación final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se verificaron en gel de agarosa 2% para determinar la correcta amplificación, se juntaron las muestras y prepararon las bibliotecas de DNA para la secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y filtradas por calidad removiendo secuencias menores a 150 pb o que presentaran ambigüedad en alguna base. Se eliminaron las secuencias quimeras y se construyeron tablas de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) agrupando las secuencias por similitud, el nivel máximo de similitud al cual se agrupó fue 97% (divergencia del 3%), se realizaron agrupamientos con similitudes diferentes (Tabla 2.1) para construir tablas de OTUs a diferentes niveles taxonomicos. Utilizando la secuencia consenso de cada OTU para realizar la asignación taxonómica con BLASTn utilizando las bases de datos DPII, Green Gene y NCBI.

Tabla 2.1: Grado de similitud con el cual se agruparon las secuencias para la construcción de las diferentes tablas de OTUs.

Identidad con la secuencia de referencia	Clasificación
> 97%	OTU "Especie"
Entre 97% y 95%	Género
Entre 95% y 90%	Familia
Entre 90% y 85%	Orden
Entre 85% y 80%	Clase
Entre 80% y 77%	Phylum
< 77%	Desconocido

#### *Análisis bioinformaticos:*

Los análisis se realizaron utilizando la plataforma QIIME y el paquete estadístico R. Se indican los programas utilizados y estadísticos aplicados en cada caso en el texto de resultados.

## Esquema del diseño experimental:

Los cultivos fueron realizados por quintuplicado, cinco macetas por tratamiento, consideramos “tratamiento” a la combinación de tipo de planta cultivada y régimen de irrigación porque nuestro sujeto experimental es el suelo y no las plantas (en cuyo caso el tratamiento sería el nivel de humedad y el suelo utilizado). De esta manera realizamos 10 tratamientos en este experimento, la combinación de 5 variedades de plantas por dos regímenes de irrigación. A lo largo de este capítulo nos referiremos al nivel de humedad de la siguiente manera, buena irrigación o normal (80-100% de la capacidad de campo) y déficit hídrico o sequía (30-50% de la capacidad de campo). Se fijó el nivel de humedad en base a la capacidad de campo (CC) de cada suelo siendo 100% la totalidad de agua retenida por gramo de suelo y 30%, el 30% de esta cantidad.

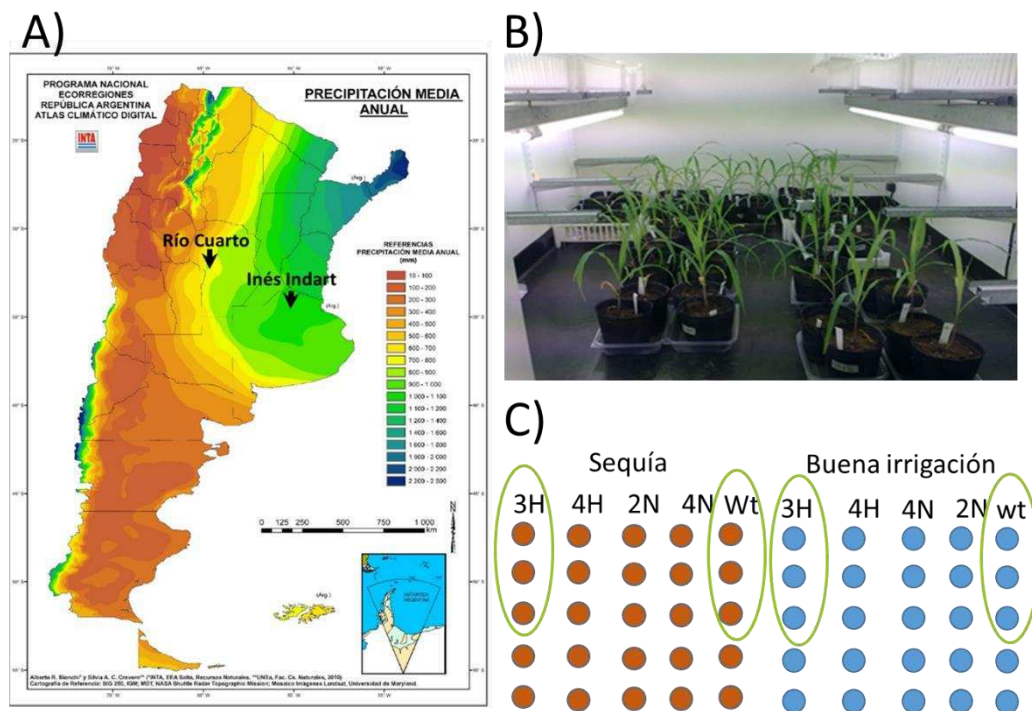


Figura 2.1: Diseño experimental para el estudio del impacto de plantas genéticamente modificadas resistentes a sequía. A) Ubicación geográfica, indicando índices de precipitación media anual (Rubí Bianchi *et al.*, 2010), de las localidades de donde se extrajeron los suelos. B) sistema de cultivo en condiciones controladas. C) Diseño experimental, se indica el nivel de humedad, tipo de planta y número de réplicas (cada círculo representa una maceta donde se colocó solo una planta de maíz). Se destacan las muestras que se enviaron a secuenciar (círculos verdes).

Se enviaron a secuenciar 24 muestras (llamaremos muestra a cada una de las extracciones realizadas y/o secuenciadas). Seleccionamos para la secuenciación 3 muestras de las extracciones de suelo de macetas que contenían planta "3H" (Hahb-4) en las dos condiciones de humedad (buena irrigación y sequía) y los correspondientes controles de la planta "B104" (Wt o salvaje) Figura 2.1 C. Las secuenciaciones se realizaron para los ensayos con los distintos suelos, Río Cuarto e Inés Indart, al tiempo final (60 días). Se seleccionó la planta "3H" porque fue la que mejor desarrollo y aspecto tuvo en los dos suelos ensayados.

# Resultados:

## Suelos

El suelo de Rio Cuarto fue clasificado como: Mollisol suborden Udol, con textura arenoso arcilloso, contenido de nitrato: 28 mg/Kg; fosforo asimilable 17.1 mg/kg; materia orgánica 1.7%; nitrógeno total: 0.07 mg/Kg; carbón: 1mg/Kg; pH: 5.6). La Capacidad de campo de este suelo fue de  $49 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ g}$  de suelo

Inés Indart: contenido de nitrato: 11.7 mg/Kg; fosforo asimilable 20.7 mg/kg; materia orgánica 3.75%; nitrógeno total: 0.187 mg/Kg; carbón: 2.17mg/Kg; pH: 5.8) clasificado como húmedo según el índice de De Martonne. La capacidad de campo de este suelo fue de  $54 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ g}$  de suelo.

## Crecimiento de las plantas

El crecimiento de las plantas en las diferentes condiciones de cultivo se determinó midiendo el peso seco del vástago, como estimador de biomasa. Se llevó a cabo en primera instancia, el cultivo de las plantas con el suelo obtenido de Rio Cuarto. En este experimento se registró, además del peso seco del vástago, el número de días hasta la senescencia de las plantas. Uno de los efectos reportados que tienen las plantas portadoras del gen Hahb-4 es un retraso en la senescencia (Dezar *et al.*, 2005). Para realizar esta medición se tomaron las muestras de suelo correspondientes al tiempo 60 días y se suspendió el riego para todas las plantas, se midieron los días que tardaron las plantas en alcanzar un estado de marchitez, los resultados de peso seco y senescencia para el suelo de Rio Cuarto se presentan en la Figura 2.2 A y B.

Para el experimento utilizando el suelo de Inés Indart sólo se cuantificó el peso seco del vástago, Figura 2.2 C. Luego de las mediciones realizadas, las plantas se destruyeron por incineración de acuerdo al acuerdo de transferencia de material.

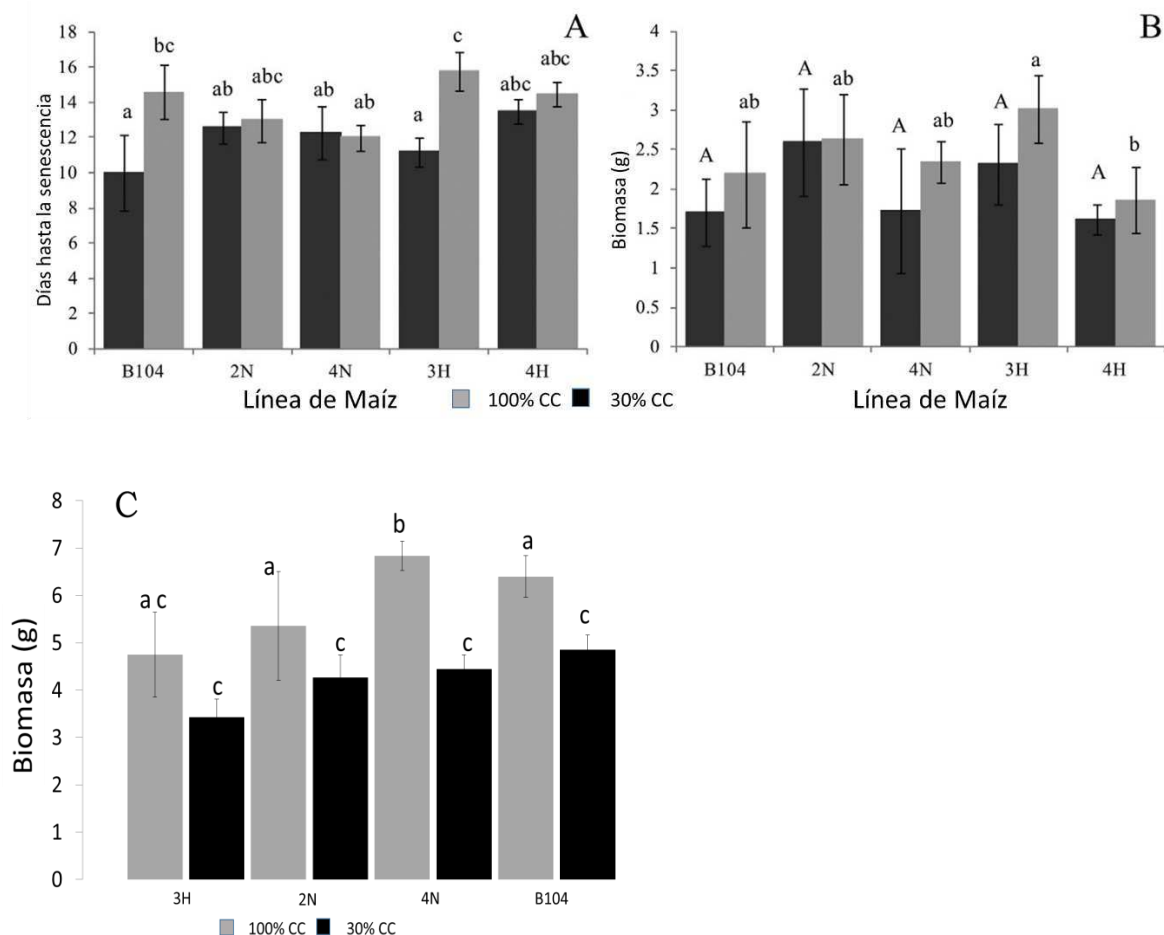


Figura 2.2: Biomasa del peso seco del vástago las diferentes variedades de maíz en las dos condiciones de cultivo: buena irrigación; 100 % CC; Déficit hídrico; 30 % CC. A) Días hasta la senescencia plantas cultivadas en suelo de Río Cuarto. B) Biomasa de vástago plantas cultivadas en tierra de Río Cuarto. C) Biomasa de vástago de plantas cultivadas en tierra de Inés Indart. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los ensayos con el suelo de Río Cuarto se realizaron en colaboración con el laboratorio de Microbiología del suelo (DBBE, FCEyN, UBA) y también se utilizaron para hacer un estudio comparativo de la colonización de hongos micorrizico-arbusculares (HMA) que formaron parte de la Tesis doctoral de Roxana Colombo (FCEN-UBA) y dieron origen a un trabajo publicado en colaboración (Colombo *et al.*, 2017). Se evaluó el efecto de las líneas de maíz e intensidad de irrigación (IR, sequía frente a bien regado) sobre dos parámetros de la planta: los días hasta la senescencia (DTS) y la biomasa del vástago. Los resultados revelaron un efecto de la interacción entre líneas de maíz e IR (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Los días hasta la senescencia variaron significativamente entre los tratamientos. La planta 4H (a ambos IR) y 3H (cuando se mantuvieron a 100% CC) sobrevivieron más tiempo, junto con B104 cuando se mantuvo a 100% CC (Fig. 2.2A). Las plantas de maíz salvaje fueron las primeras en senescer cuando se mantuvieron a 30% de capacidad de campo mientras que las líneas GM que no expresaban el Hahb4 mostraron valores intermedios DTS (Fig. 2.2 A). Los análisis estadísticos realizados con la biomasa de maíz mostraron un efecto principal

de la variable "línea de maíz". Los valores de la biomasa fueron estadísticamente diferentes entre las líneas al 100% de CC ( $p < 0,05$ , Fig. 2.2B). Se registraron valores más altos para la línea 3H y los valores más bajos para las plantas de maíz 4H. Los valores de biomasa no variaron entre los tratamientos cuando las plantas se mantuvieron 30% de CC (Fig. 2.2B, igual letra mayúscula para todas las barras).

Para el experimento de Inés Indart, sólo se contó con la planta 3H que expresa el Hahb4. Se observó que la biomasa de las plantas responde en primer medida al régimen hídrico al cual se sometieron, indicando que la diferencia de humedad entre las dos condiciones fue suficiente para generar estrés en las plantas (Fig. 2.2C). Las plantas que expresan Hahb-4 (3H) no presentaron una mayor biomasa en sequía con respecto a las plantas control (Fig. 2.2C).

Si bien en las variables medidas la resistencia a estrés hídrico de las plantas Hahb-4 no fue claramente significativo, es probable que el efecto del gen se refleje en algún parámetro de su fisiología no cuantificado o en un tiempo de cultivo más prolongado.

### **Secuenciación de amplicones del gen que codifica el 16S rRNA.**

El DNA total extraído del suelo procedente de los experimentos realizados con la planta de maíz salvaje y con la planta GM 3H en las dos condiciones de riego para los suelos de Inés Indart y Río Cuarto fue secuenciado mediante secuenciación de alto rendimiento (*Illumina MiSeq*) utilizando los *primers* universales para bacterias 27F y 519R que amplifican las regiones V1-V3 del gen 16S rRNA. Se obtuvieron un total de 1.569.782 secuencias, que pasaron el estándar de calidad y pudieron ser clasificadas taxonómicamente, luego de la limpieza y filtrado de las secuencias, tal como se describió en materiales y métodos. Para la clasificación taxonómica, las secuencias previamente filtradas por calidad se agruparon (*clusterizaron*) con un nivel de similitud del 97 %, a cada uno de estos grupos de secuencias se le asignó un número de OTU (OTU, del inglés *Operational taxonomic unit*, es la unidad taxonómica mínima utilizada). Como ya se mencionó, cada OTU está compuesto por un grupo de secuencias con similitud mayor o igual a 97%. La secuencia consenso de este grupo se utilizó para la clasificación taxonómica de cada OTU utilizando como referencia las bases de datos RDPII, NCBI y GreenGene. Luego de la clasificación taxonómica continuamos trabajando sólo con los OTUs que pudieron ser clasificados dentro del Dominio Bacteria, se eliminaron secuencias que no pudieron ser clasificadas o que fueron clasificadas en otro grupo taxonómico, por ejemplo cloroplastos, mitocondrias, hongos, etc. Luego de este procedimiento se confeccionó una tabla de OTUs, que contiene en las columnas cada una de las muestras y en las filas cada OTU, en la intersección se ubica el número de lecturas correspondientes a cada OTU en cada muestra. A continuación se eliminaron de esta tabla los OTUs que sólo tenían una lectura en una sola muestra (*singletons*) para disminuir las secuencias poco representativas. Luego de este

procesamiento de las secuencias y clasificación de OTUs se obtuvo la tabla de OTUs depurada con la cual se realizaron todos los análisis de comunidades bacterianas que trataremos en este capítulo.

Se resumen los datos más relevantes de la tabla de OTUs (Tabla 2.2) para el conjunto de las muestras de Río Cuarto e Inés Indart.

Tabla 2.2: Resumen de los datos más relevantes de la secuenciación luego del procesamiento de las lecturas y clasificación taxonómica. *Core* OTUs: OTUs presentes en todas las muestras de un suelo

	Número de lecturas	Número mínimo de lecturas en una muestra	Número máximo de lecturas en una muestra	Número OTUs totales	<i>Core</i> OTUs	% de OTU más abundante	Géneros totales (sin <i>singletons</i> )	% Género más abundante
Río Cuarto (12 muestras)	790.058	58.921	81.280	15.439	2.900	1,5	669	20 ± 2
Inés Indart (12 muestras)	779.724	50397	91969	13.118	2.098	2,03	722	14± 2

A partir de las tablas obtenidas se calcularon las curvas de rarefacción para cada muestra, estas curvas se realizan con el fin de determinar si el esfuerzo de muestreo fue suficiente (Gotelli y Colwell, 2001) y si es adecuado describir a la comunidad de bacterias de cada suelo a partir de las secuencias obtenidas. Las curvas de rarefacción se calculan realizando un sub-muestreo del total de secuencias de cada muestra, con intervalos crecientes de 5000 secuencias al azar, se grafica el número total de OTUs encontrados en cada sub-muestreo en función del tamaño de este. Si la secuenciación fue suficientemente profunda se observará que hay una disminución en el incremento del número de OTUs al incrementar el tamaño del sub-muestreo. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 2.3, como el promedio de todas las muestras para los suelos de Río Cuarto (12 muestras) e Inés Indart (12 muestras) donde se observa esta tendencia. Las curvas de rarefacción son utilizadas para el cálculo de índices de diversidad, dado que es necesario estandarizar los valores para un número desigual de lecturas entre muestras.

### Curva de rarefacción:

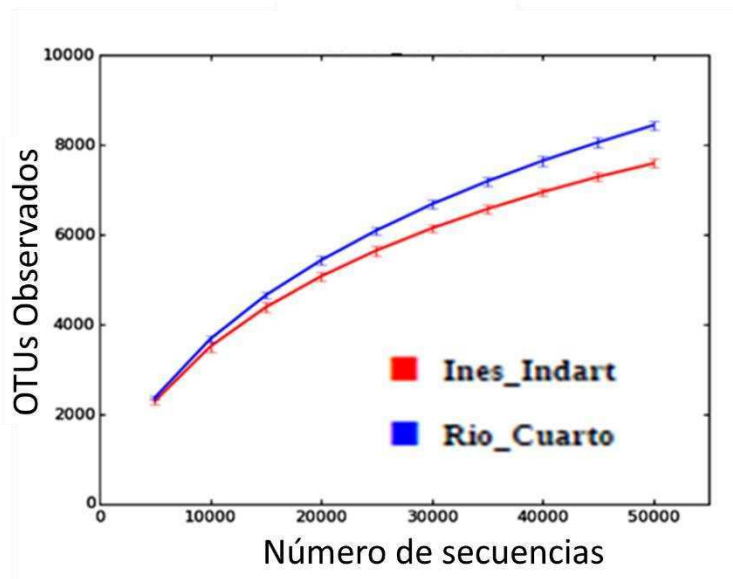


Figura 2.3: Curvas de rarefacción para ambos suelos (n=12). Las barras de error representan el desvío estándar de 12 muestras.

### Biodiversidad

Luego del análisis de los parámetros cualitativos de la secuenciación se comenzó con el análisis de los parámetros cuantitativos para analizar la diversidad de la comunidad bacteriana. Para esto se utilizaron las tablas de OTUs generadas a distintos niveles taxonómicos según el criterio estipulado en la Tabla 2.1 de materiales y métodos.

La definición de biodiversidad involucra el conocimiento de las especies presentes en una determinada región. Tiene dos componentes: la riqueza específica que es el número de especies que tiene un ecosistema y la equitabilidad que mide la distribución de la abundancia de las especies, es decir, cuán uniforme es esa comunidad. En base a las distintas formas que existen para estimar estos componentes se definen distintos índices ecológicos que tratan de reflejar la influencia de cada uno de estos componentes.

#### *Cálculo de índices ecológicos para el estudio de la diversidad Alfa.*

Los índices de diversidad se calculan como el promedio de diversidad en un conjunto de sub-muestras, dentro de una misma muestra realizado para estandarizar el número desigual de lecturas. El índice de Chao (Chao, 1984) estima el número total de especies presentes en una comunidad a partir de un muestreo (en el caso de secuencias se utiliza el número de OTUs) y da idea de la riqueza de cada muestra de manera directa, indica cuántas especies hay. También se calcularon los índices de diversidad de Simpson y



Shannon. Estos tienen en cuenta la riqueza y la abundancia de las especies dentro de la muestra. Los análisis se realizaron con *Qiime* utilizando el programa `alpha_diversity.py` para lo cual se realizaron múltiples rarefacciones de las lecturas de cada muestra con el programa `multiple_rarefactions.py` tomando 5.000 OTUs al azar cada vez, hasta alcanzar las 50.000 secuencias por muestra. Se utilizó este valor debido a que se debe tomar el mismo número de secuencias para cada muestra en esta comparación y 50000 lecturas es el número mínimo hallado en las muestras (Tabla 2.2). En cada punto de las rarefacciones se calcularon los índices mencionados y se determinó el número de OTUs presentes (curva de rarefacción, Figura 2.3).

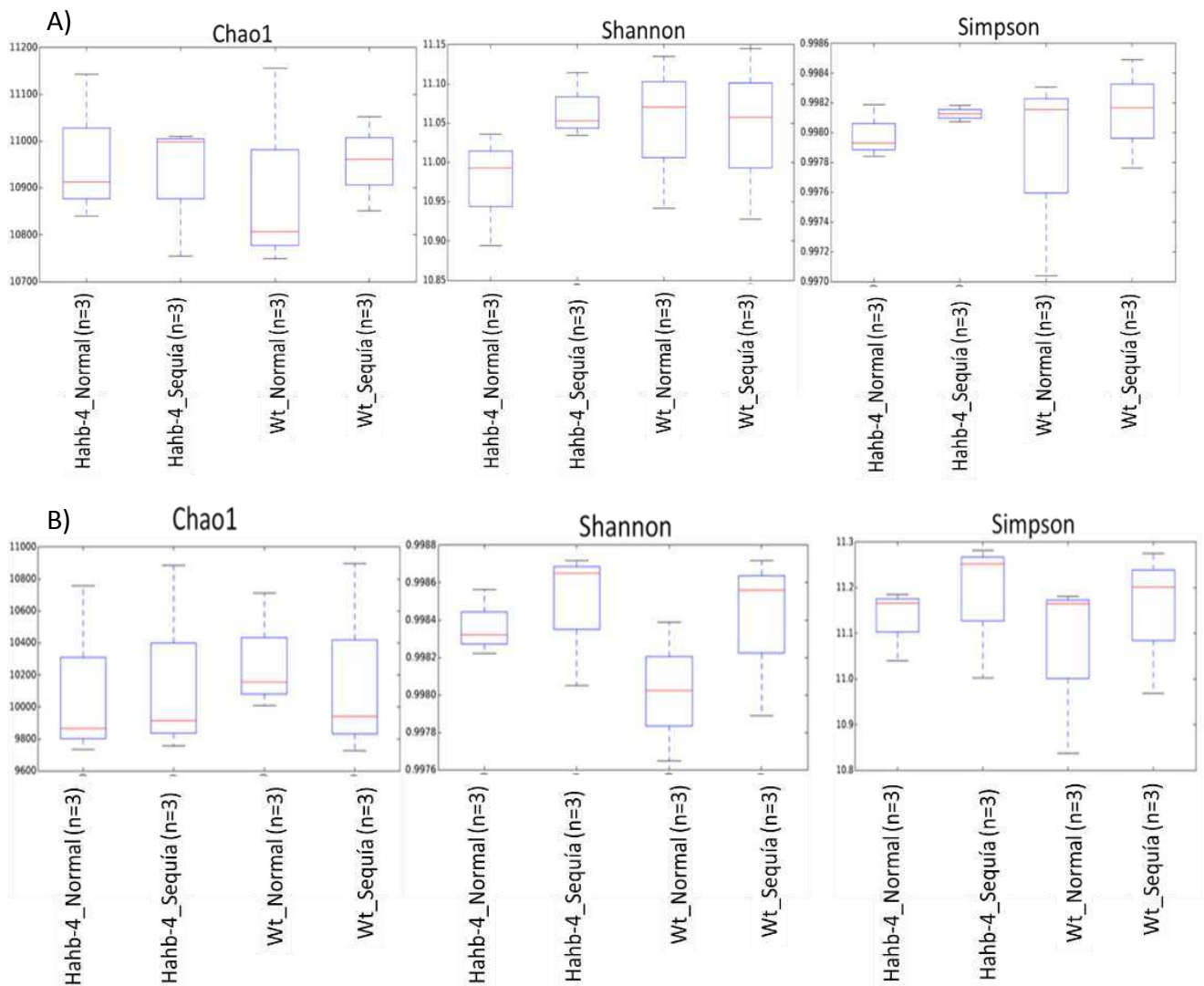


Figura 2.4: Índices de Chao1, Shannon y Simpson para las muestras del suelo de Rio Cuarto (A) e Inés Indart (B). Se realizaron para cada tratamiento (Wt\_sequia; Wt\_Normal; Hahb-4\_sequia y Hahb-4\_normal). Donde Normal representa: 100% CC y Sequia: 30% CC. Cada tratamiento contó con n= 3 réplicas independientes. No se observaron diferencias significativas en ningún caso.

Los resultados del cálculo de los índices de Chao1, Shannon y Simpson se muestran en las Figuras 2.4 A y B. Se indican los valores para el punto final de la rarefacción.

Los índices se calcularon para cada genotipo de planta (salvaje WT y GM: Hahb4) y para ambas condiciones de irrigación (Normal/Sequía). Podemos observar que los tratamientos no modificaron los índices de alfa diversidad en ninguno de los suelos. Estas diferencias se pusieron a prueba con el programa `compare_alpha_diversity.py` el cual utiliza el estadístico no paramétrico de Monte Carlo para estimar diferencias en los índices de alfa diversidad de cada muestra.

Debido a que no se observaron diferencias significativas como se indicó en la Fig. 2.4, se calcularon los mismos índices para ambos suelos agrupando todos los tratamientos ( $n=12$ ), con el fin de poder comparar los suelos entre sí. En la Figura 2.6 observamos los índices de Shannon, Chao1 y Simpson de todas las muestras correspondientes a cada suelo. Se observaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) para los índices de Chao1 y Shannon, con valores mayores para el suelo de Río Cuarto.

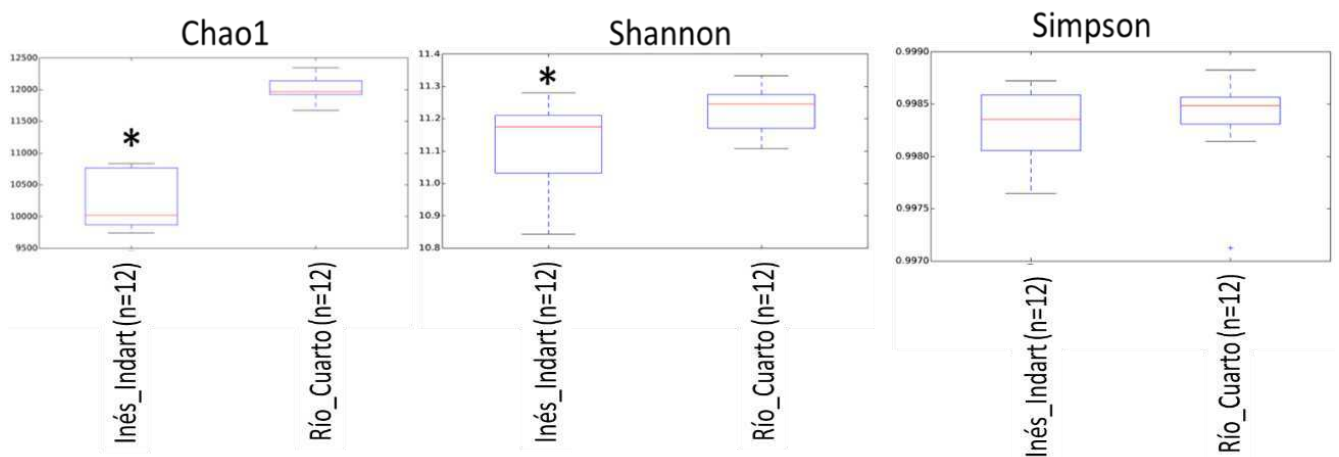


Figura 2.5: Índices de alfa diversidad Chao1, Shannon y Simpson comparando las 12 muestras de cada suelo, se indican diferencias significativas con asterisco ( $p<0,05$ )

### *Análisis de la composición de las comunidades*

A fin de determinar la estructura general de las comunidades bacterianas en cada tratamiento en cada suelo, se realizó una comparación (promedio de tres réplicas independientes) de la composición taxonómica a nivel de Phylum (Figura 2.6). Se observa gran homogeneidad en la composición de la comunidad bacteriana a este nivel taxonómico entre tratamientos e incluso entre suelos. Los Phyla más abundantes en todos los tratamientos fueron *Proteobacteria*, con aproximadamente el 30% de las lecturas, *Acidobacteria* con el 17 %, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* con el 10% cada uno. Se identificaron un total de 28 Phyla compartidos por ambos suelos y dos presentes solo en el suelo de Río Cuarto, *Chlorobi* y *Chrysogenetes* con el 0,01 y 0,008 % de las lecturas, respectivamente.

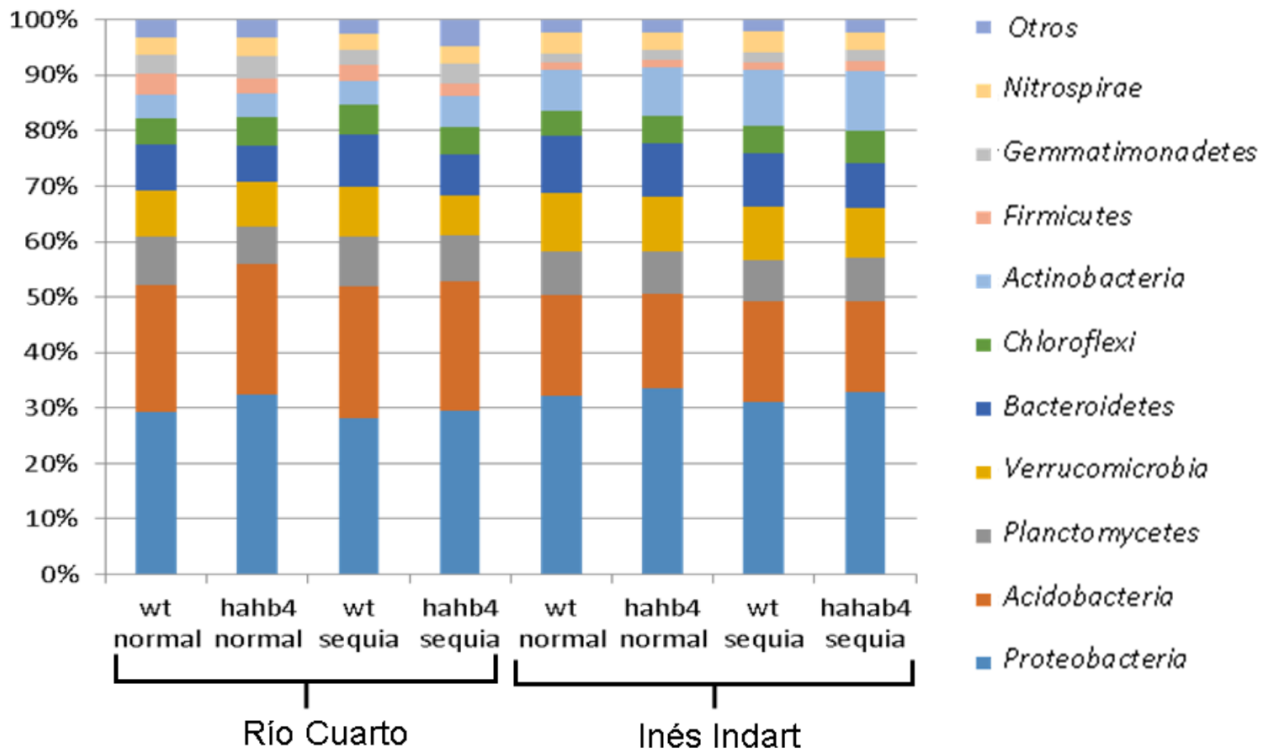


Figura 2.6: Composición bacteriana a nivel de Phylum para cada tratamiento para ambos suelos. Los tratamientos se indican debajo de cada columna al igual que los suelos a los que pertenece cada muestra. RC suelo de Río Cuarto; II suelo de Inés Indart. Dentro del grupo denominado Otros se incluyen Phyla que tienen menos del 0,1 % del total.

*Comparación a nivel de Phylum de ambos suelos*

Para poder determinar si existen diferencias significativas entre los distintos Phyla entre los dos suelos se realizó una comparación agrupando las 12 muestras de cada uno. Se observaron diferencias significativas para 8 Phyla (Figura 2.7), encontrándose *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* más abundantes en Inés Indart, mientras que *Tenericutes*, *Nitrospirae*, *Firmicutes* y *Acidobacteria* fueron más abundantes en el suelo de Río Cuarto. Dentro del grupo denominado Otros (Figura 2.7) se incluyeron Phyla que poseen menos del 0,1% en del total, en total suman menos del 1%. Los Phyla *Chlorobi* y *Chrysiogenetes* son los únicos que están presentes en un suelo y ausentes en el otro, se encuentran solo en el suelo de Río Cuarto pero ambos con una abundancia menor a 0,1 %.

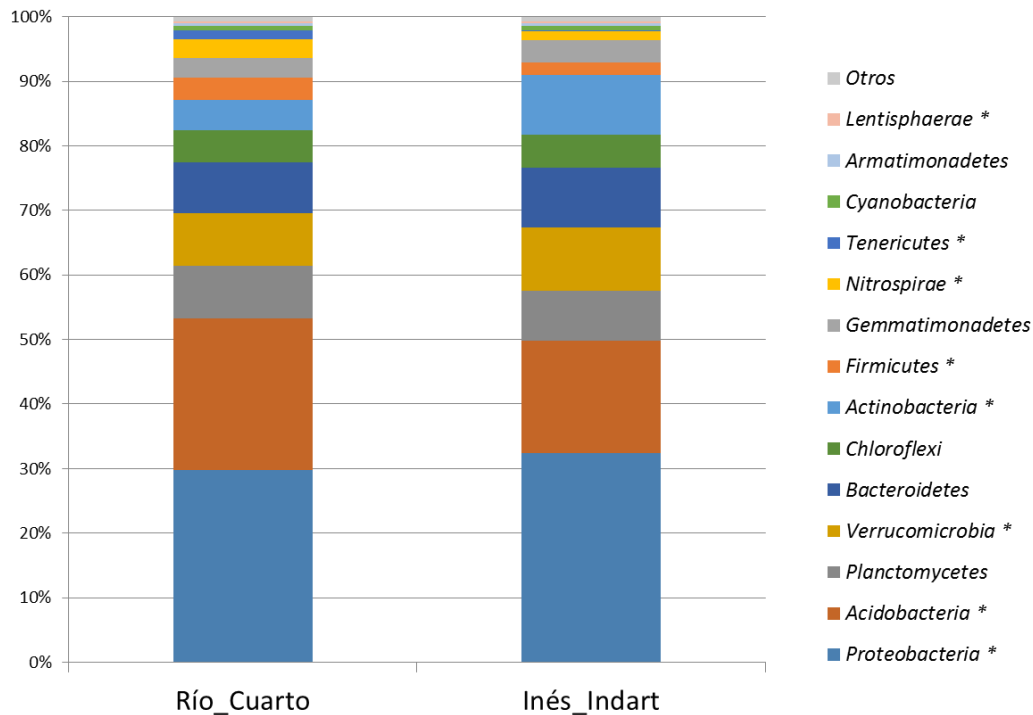


Figura 2.7: Abundancias relativas de todos los *Phyla* encontrados en ambos suelos, se indica con asterisco sobre la leyenda los *Phyla* con diferencias significativas entre ambos suelos. Se consideraron significativos aquellos *Phyla* que presentaron un  $p < 0,05$ , utilizando el estadístico no paramétrico Kruskal Wallis.

### INDICES DE $\beta$ DIVERSIDAD

A continuación se describen los análisis de beta diversidad realizados sobre las comunidades bacterianas de los diferentes suelos para cada tratamiento (riego y tipo de planta). La estimación de la diversidad  $\beta$  es un parámetro rutinariamente utilizado para la descripción ecológica de un grupo de comunidades, son métricas que describen las distancias entre comunidad. Se pueden interpretar como una medida de cuanto se asemejan dos o más comunidades y se utilizan habitualmente para describir cambios dentro de una comunidad separada temporalmente. En este caso nos servirá para determinar si los tratamientos tienen un efecto sobre las comunidades del suelo. Se utilizaron tres índices diferentes. Los índices utilizados fueron: Bray-Curtis, Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac. Estos últimos tienen en cuenta la filogenia de las especies presentes, realizan una cuantificación de la proporción de ramas que poseen especies pertenecientes a ambas comunidades en un árbol filogenético construido con todas las especies. La diferencia entre ambos es que Weighted UniFrac al igual que Bray-Curtis contempla la abundancia relativa de cada especie mientras que Unweighted UniFrac, es un índice cualitativo (Lozupone *et al.*, 2007).

Los análisis de  $\beta$  diversidad se realizaron en Qiime utilizando el programa `beta_diversity.py` con el cual realizamos una matriz de distancia de todas las muestras con el método de Bray-Curtis para ver la agrupación (clusterización) de las muestras.

Luego se realizaron los alineamientos y *clusterización* de las secuencias representantes de cada OTU con el programa `align_seqs.py` y `make_phylogeny.py`. Para el cálculo de los índices de beta diversidad filogenéticos (UniFrac). A partir del árbol filogenético generado en el paso anterior se calculó la beta diversidad de cada muestra con las tres métricas mencionadas anteriormente utilizando el programa `jackknifed_beta_diversity.py` el cual calcula las matrices de distancia y realiza el análisis de Coordenadas principales (PCoA). Este resultado se graficó con el programa `make_2d_plots.py` y lo podemos observar en las Figuras 2.8 y 2.9. Se realizó un análisis estadístico para cada comparación con el programa `compare_categories.py`, utilizando el método no paramétrico ANOSIM. Las comparaciones estadísticas asociadas a los gráficos PCoA de Río Cuarto se presentan en las Tablas 2.3 y 2.4. En la primera comparación se verificó si había diferencias significativas en los índices de  $\beta$  diversidad entre los tratamientos (Tabla 2.3). No se observan diferencias en ninguna de las comparaciones. La misma comparación se realizó para el suelo de Inés Indart mostrando diferencias no significativas en todas las comparaciones (datos no mostrados). En la Tabla 2.4 se encuentran los valores de ANOSIM para cada métrica de  $\beta$  diversidad también para el suelo de Río Cuarto, obtenidos a partir de la comparación de “humedad” (100% Vs. 30% de capacidad de campo) y “tipo de planta” (Wt Vs. Hahb4). En esta comparación agrupamos dos tratamientos para lograr un *n* mayor. Realizamos este agrupamiento porque, como se mencionó en el párrafo anterior, no se observaron diferencias entre tratamientos. Se observa que solo hay diferencias significativas cuando el análisis se realizó comparando plantas wt Vs. plantas Hahb4  $p < 0,05$ , con los índices de Bray-Curtis y Weighted UniFrac (Tabla 2.4).

Tabla 2.3: Análisis estadístico de los índices de diversidad de Bray Curtis agrupando las muestras por tratamiento (n=3). No se observan diferencias significativas en ninguna comparación.

ANOSIM Beta diversidad Río Cuarto por tratamiento	Wt_Normal n=3	Wt_sequía n=3	Hahb-4_Normal n=3	Hahb-4_Sequía n=3
Wt_Normal	--	R= - 0,033 p= 0.59	R= -0,018 p= 0,38	R= 0,59 P=0,09
Wt_sequía	--	--	R= 0,48 p= 0,097	R= 0,33 P=0,105
Hahb-4_Normal	--	--	--	R=0,55 P=0,085
Hahb-4_Sequía	--	--	--	--

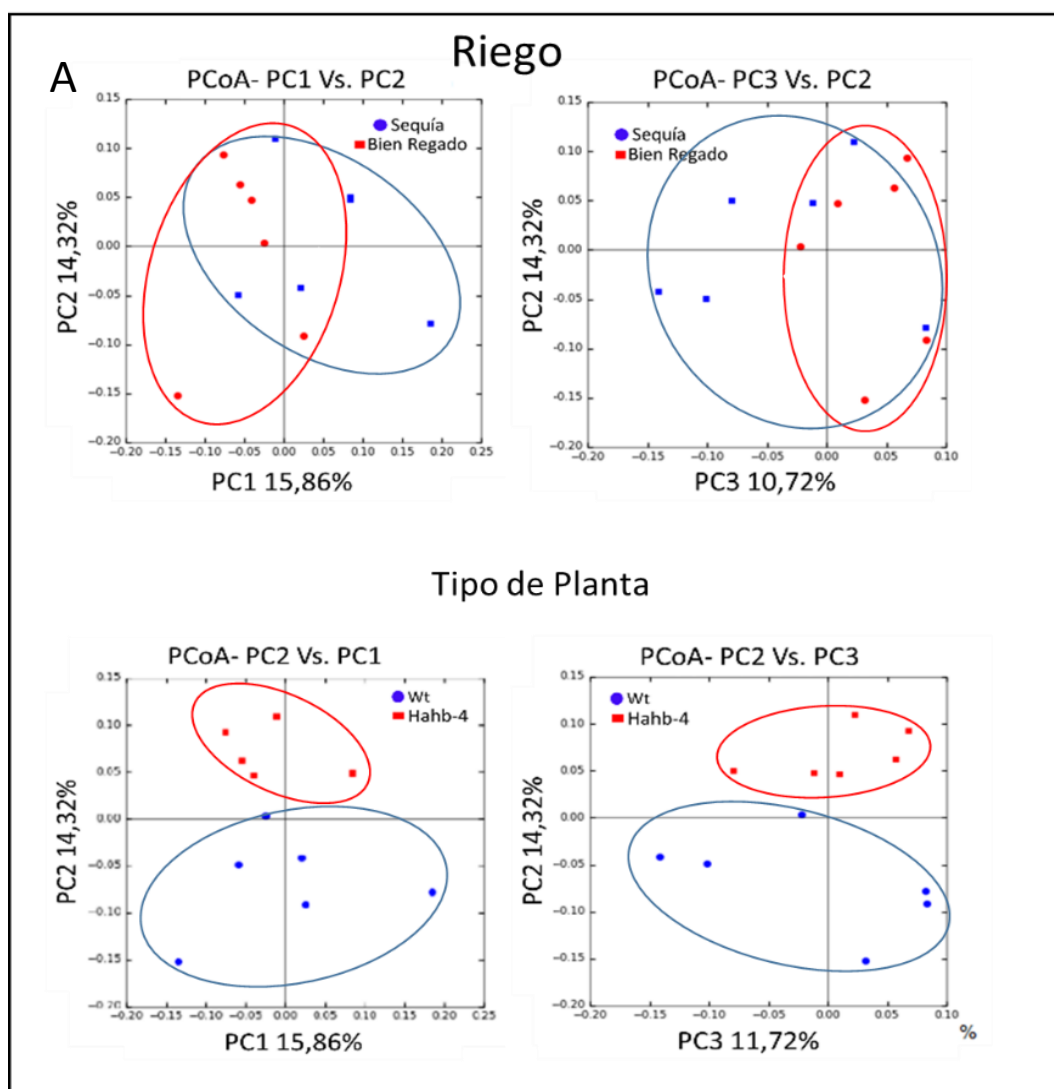
Tabla 2.4: Comparación estadística con ANOSIM para cada métrica de beta diversidad calculada en las muestras de Río Cuarto. Se compararon las muestras según régimen de humedad (100% CC Vs 30% CC) y las muestras según tipo de planta (Wt Vs Hahb4)

ANOSIM Beta diversidad Río Cuarto	100% CC Vs. 30% CC( n=6)	Wt Vs. Hahb4 (n=6)
Bray Curtis	R= 0,15P= 0,064	R= 0,29 P=0,003
Weighted UniFrac	R=0,062 P=0,269	R= 0,32 P=0,004
Unweighted UniFrac	R=0,187 p=0,0749	R=0,18 P=0,085

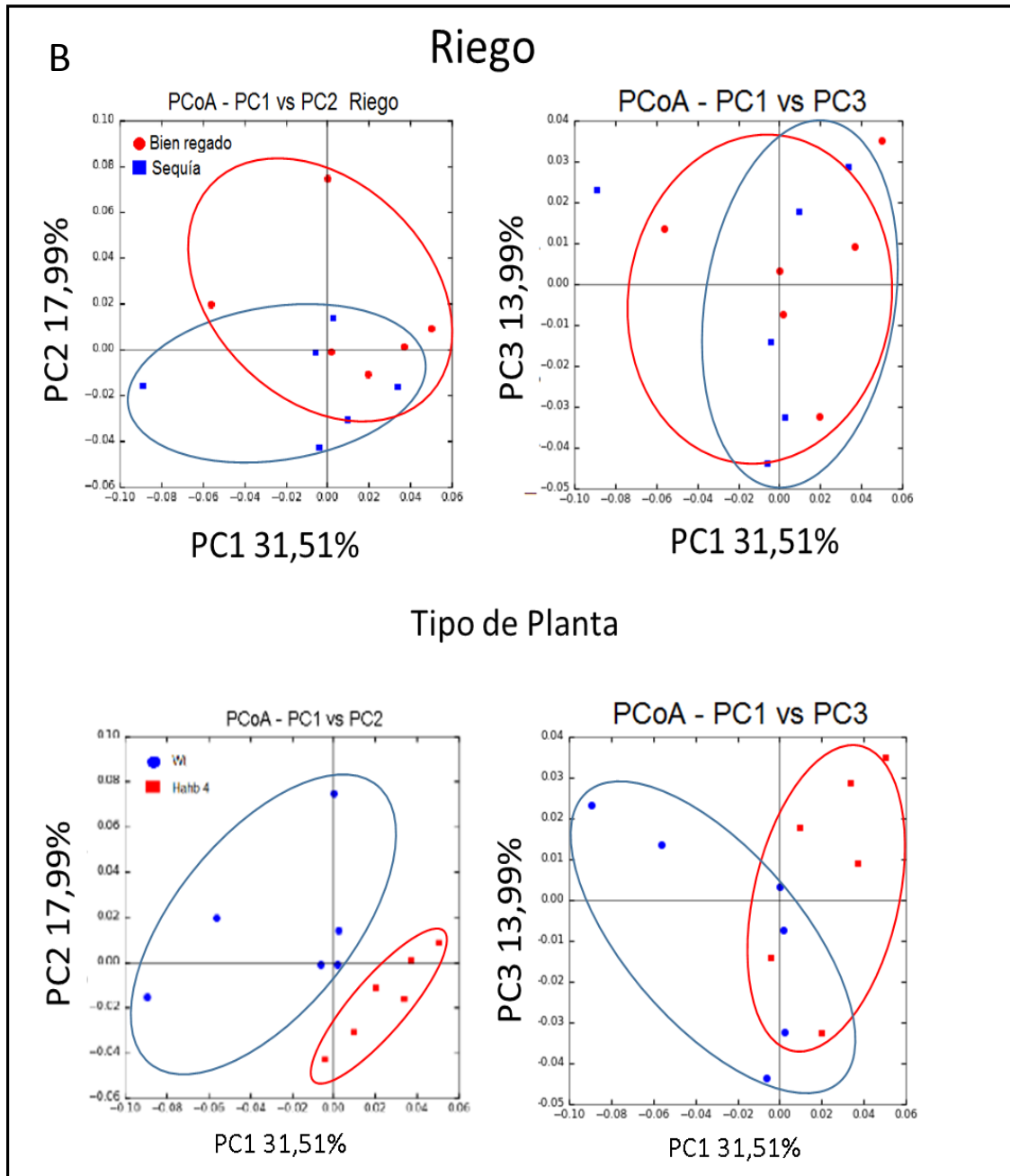
En las figuras siguientes, podemos observar los gráficos de PCoA para las tres métricas de  $\beta$  diversidad calculadas. Para visualizar mejor este análisis se realizaron dos tipos de gráficos para cada métrica. Uno en el que se agrupan las muestras por el nivel de humedad y otro en el que se agrupan las muestras por tipo de planta. Se indica a que corresponde cada color en cada caso.

PCoA para el suelo de Río Cuarto:

**Bray-Curtis**



Weighted UniFrac



Unweighted UniFrac

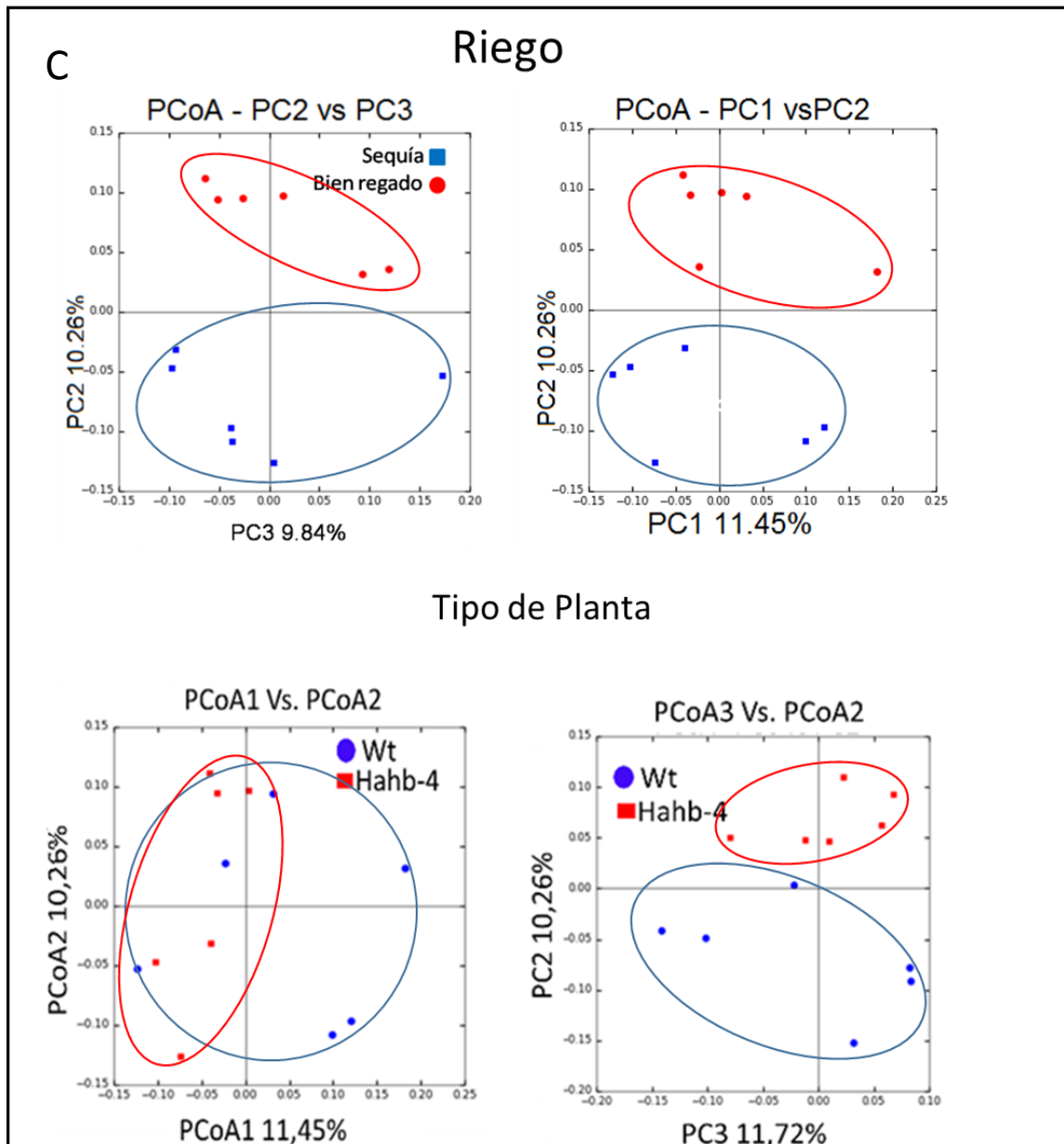


Figura 2.8: Gráficos de Coordenadas principales de las tres métricas calculadas, para el suelo de Río Cuarto. A: Bray Curtis; B: Weighted UniFrac; C: Unweighted UniFrac. Se indica en cada caso a que corresponden los agrupamientos. Los ejes representan el porcentaje de variación explicada.

En la comparación de tipo de planta vemos un efecto significativo de las plantas en la  $\beta$  diversidad cuando se estima con parámetros que toman en cuenta la abundancia de los



OTUs (Bray Curtis, Weighted UniFrac). Las muestras que contenían plantas salvajes, son significativamente más similares entre sí que las muestras que contienen plantas transgénicas. Esto solo se observa cuando analizamos las comunidades con parámetros cuantitativos, esto podría indicar que el tipo de planta tiene un efecto diferencial sobre la comunidad bacteriana, pero este efecto se manifiesta en el cambio de proporciones relativas de algunos grupos bacterianos, no tendría efectos “deletéreos” sobre grupos particulares de bacterias, ya que no hay cambios significativos en la composición de OTUs. Dado que las diferencias se observan tanto en Bray-Curtis como en Weighted UniFrac podemos suponer que el efecto de las plantas no se da exclusivamente sobre grupos filogenéticamente cercanos, si así fuese las diferencias solo se observarían en Bray-Curtis porque UniFrac disminuye las diferencias si los grupos afectados entre las comunidades comparadas, comparten las mismas ramas del árbol filogenético utilizado para calcular la métrica.

En el análisis Unweighted UniFrac, si bien no es significativo, podemos observar un efecto del riego más marcado que el efecto del tipo de planta en la composición de la comunidad bacteriana. Vemos en la figura 2.8 C que las muestras agrupan mejor si consideramos el tratamiento “riego”, que si consideramos el tratamiento “tipo de planta” (figura 2.8 C). Dado que esta diferencia no se observó en los análisis con estadísticos que tienen en cuenta la abundancia relativa de los grupos, lo que podría indicar que el nivel de humedad en el suelo afecta principalmente o en mayor medida a grupos bacterianos de baja abundancia relativa en la comunidad. Esto se debe a que los parámetros cuantitativos tienden a disminuir las diferencias entre comunidades si estas se dan por cambios en grupos con pocos individuos.

A continuación se realizó el cálculo de distancias para las muestras del suelo de Inés Indart, se realizaron los análisis estadísticos comparando cada tratamiento (no mostrado) y para las muestras por nivel de humedad y tipo de planta (Tabla 2.5).

*Beta diversidad suelo de Inés Indart.*

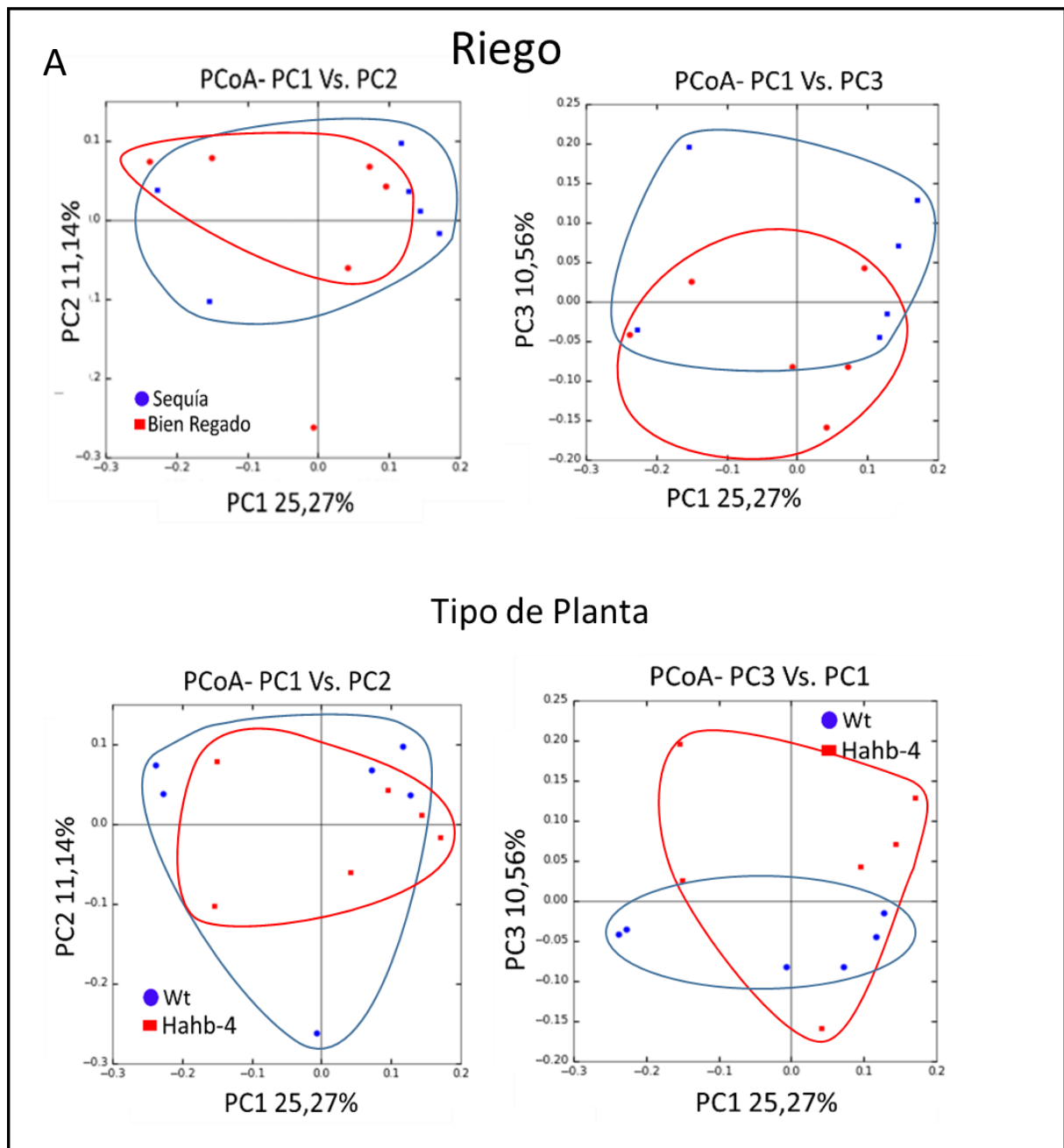
Tabla 2.5: Comparación de las distancias calculadas con las tres métricas para las muestras del suelo de Inés Indart. Método ANOSIM, comparando las muestras por humedad (100% CC Vs 30% CC) y las muestras por tipo de planta (Wt Vs. Hahb-4)

Beta diversidad Inés Indart	100 % CC Vs. 30% CC	Wt Vs. Hahb-4
Bray Curtis	R= -0,027 P=0,47	R= 0,040 p= 0,25
Weighted UniFrac	R= -0,038p = 0,49	R= -0,018 p= 0,38
Unweighted UniFrac	R= -0,040 p = 0,70	R= -0,040 p= 0,70

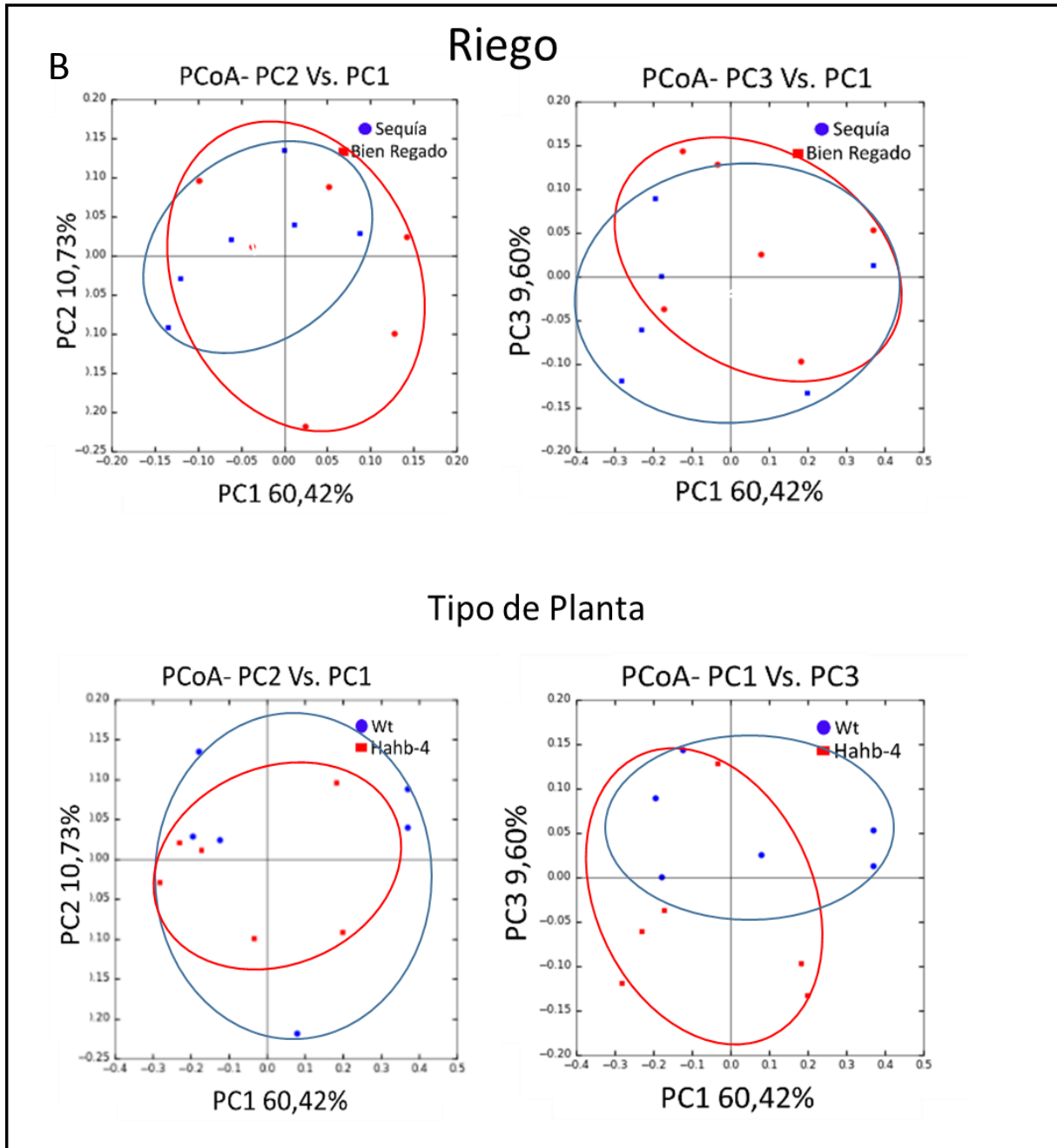
Podemos observar que no hay diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

Gráficos de PCoA para las muestras del suelo de Inés Indart. Al igual que con el suelo de Río Cuarto se agrupan las muestras según nivel de humedad (A) y tipo de planta (B)

**Bray Curtis**



Weighted UniFrac:



Unweighted UniFrac:

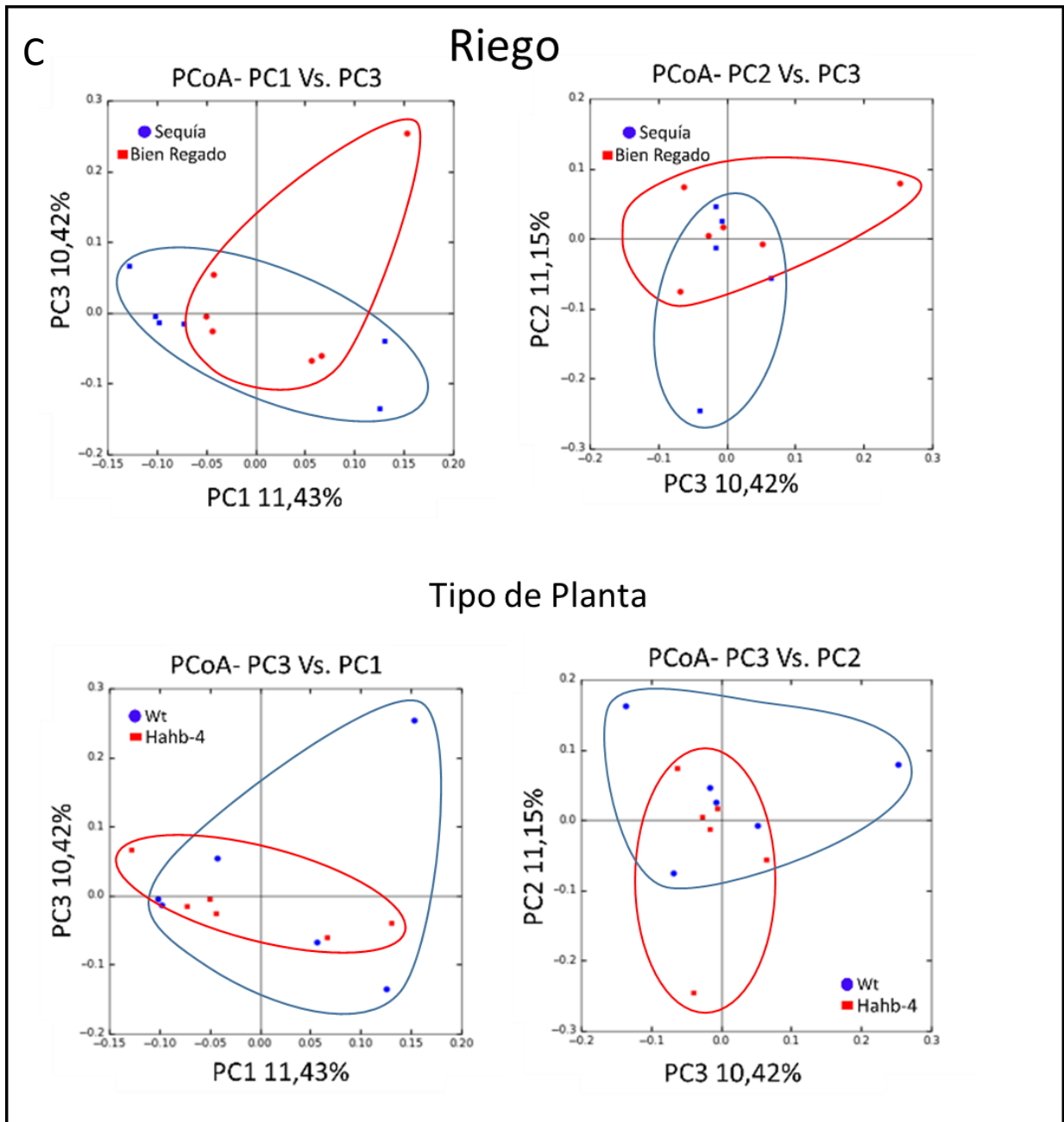


Figura 2.9: Gráficos de Coordenadas principales de las tres métricas calculadas, para el suelo de Inés Indart. A: Bray Curtis; B: Weighted UniFrac; C: Unweighted UniFrac. Se indica en cada caso a que corresponden los agrupamientos. Los ejes representan el porcentaje de variación explicada.

A diferencia del suelo de Río Cuarto no vemos una agrupación clara de las muestras, esto indica que los tratamientos tuvieron un efecto menos marcado en este suelo. Además de que no se hallaron diferencias significativas, la dispersión de los puntos que representan cada muestra, en los gráficos de coordenadas principales es homogénea para los dos

agrupamientos realizados, esto podría deberse a que las distancias entre tratamientos son similares a las distancias entre réplicas.

La medida de cuanto se asemejan las muestras entre sí y cuanto se asemejan las réplicas entre sí es un indicador del efecto de los tratamientos en las comunidades.

Las comparaciones en el apartado anterior se realizaron con matrices de distancia que se crean comparando todas las muestras entre sí, de esta manera se genera un agrupamiento de las muestras donde las más similares se ubican más cerca. En el suelo de Rio Cuarto observamos que las muestras tienen una tendencia a agruparse por tipo de planta y también se observó un efecto, pero menor, por nivel de humedad. Pero en estos análisis no se determinó la diferencia de distancias entre grupos ¿Hay grupos que se parecen más entre sí que a otros? ¿Podemos, por ejemplo, determinar si el cambio en la humedad afectó más en un grupo de plantas que en otro?

La hipótesis de este experimento en parte plantea que las plantas Hahb-4 afectarán el suelo de tal manera que el tratamiento de sequía afectará en menor medida a la comunidad bacteriana que cuando es aplicado con las plantas Wt. Si esto es así deberíamos observar que la distancia promedio entre las réplicas los tratamientos Hahb-4\_sequía y Hahb-4\_normal será menor que la distancia promedio de las réplicas entre los tratamientos Wt\_sequía y Wt\_normal.

Para determinar esto se calculó la diferencia de distancias entre grupos con el programa `make_distance_boxplot.py` el cual grafica las distancias entre grupos de muestras especificadas y realiza la comparación estadística con prueba-t para cada grupo de distancias.

La figura 2.10 A y B muestra los gráficos de las distancias entre pares de tratamientos para los suelos de Rio Cuarto e Inés Indart respectivamente.

En particular nos interesó comparar si la diferencia de distancia entre los pares (Wt\_sequía Vs. Wt\_normal) es igual a la distancia (Hahb-4\_sequia Vs. Hahb-4\_normal) y si la distancia entre los pares (Hahb-4\_sequía Vs. Wt\_sequía) es igual a la distancia entre (Wt\_normal Vs. Hahb-4\_normal).

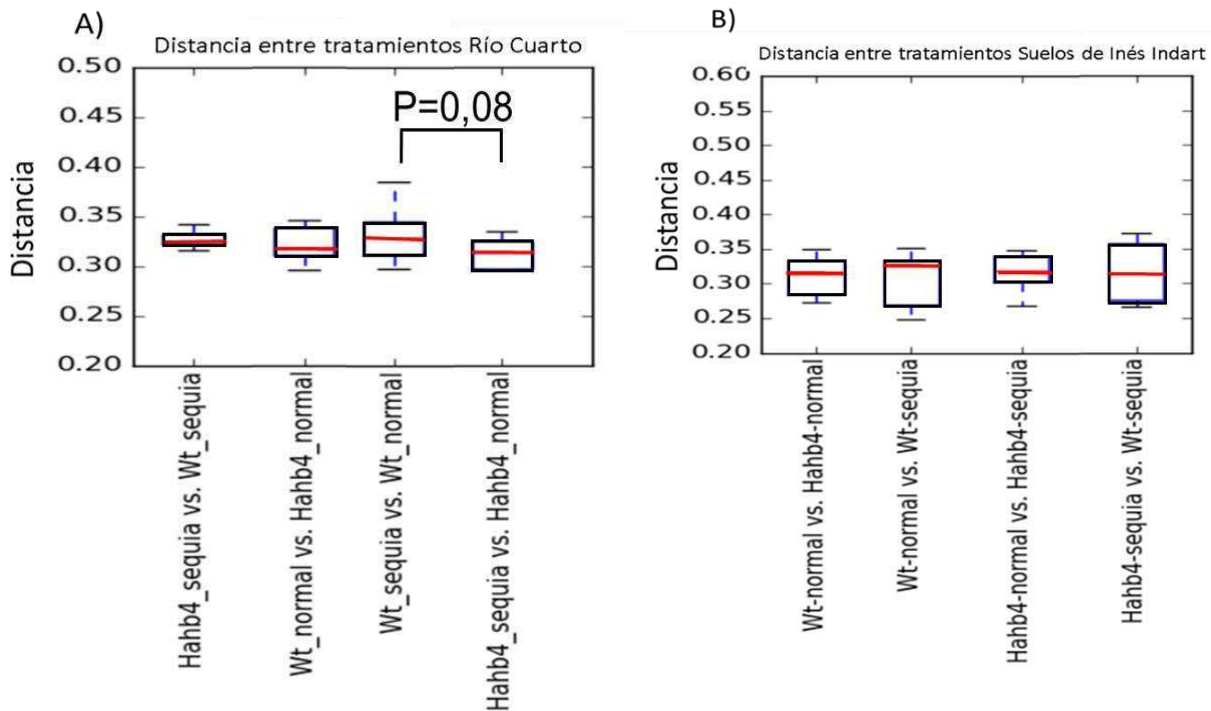


Figura 2.10: Distancia entre pares de muestras, grafico de mediana, rango e intercuartiles. A) Suelo de Río Cuarto, B) suelo de Inés Indart.

Se observa en esta figura que las distancias entre grupos son muy similares, no se encontraron diferencias en ninguna de las comparaciones. En el suelo de Río Cuarto se observó la tendencia esperada (Hahb-4\_sequia Vs. Hahb-4\_normal) < (Wt\_sequia Vs. Wt\_normal) sin embargo esta diferencia es no significativa ( $p=0,08$ ).

*Análisis a nivel de género*

Las diferencias observadas en los análisis anteriores nos llevaron a realizar un análisis más específico para tratar de dilucidar qué grupos están significativamente afectados en cada tratamiento. Para esto se utilizaron las tablas de abundancia relativa de OTUs por género para independizarnos del tamaño de la muestra, de la cantidad de lecturas por muestra. Se realizó un análisis estadístico a nivel de género para determinar si existen diferencias en abundancia relativa de cada uno entre cada tratamiento, utilizando el programa group\_significance.py en Qiime y el estadístico no paramétrico Kruskal Wallis. Se consideraron significativamente diferentes aquellos géneros que presentaban un p de la prueba menor a 0,05. La comparación se realizó entre tratamientos (3 réplicas en cada grupo comparado). Se presenta el resumen de estos resultados en las Tablas 2.6 a 2.9. Se

observó un mayor número de géneros diferencialmente afectados por sequía en las plantas GM en comparación con la planta salvaje para los dos suelos estudiados (Tabla 2.7 y 2.9).

Tabla 2.6: Suelo de Inés Indart. Géneros significativamente diferentes entre los tratamientos: wt\_sequia Vs. wt\_normal; Hahb4\_sequia Vs. Hahb4\_normal

Inés Indart	
tratamiento	Número de Géneros con $p < 0,05$
wt_sequia Vs. wt_normal	32
Hahb4_sequia Vs. Hahb4_normal	52
Géneros con $p < 0,05$ presentes en ambos	0

Tabla 2.7: Suelo de Inés Indart. Géneros significativamente diferentes entre los tratamientos: sequia\_wt Vs. sequia\_hahb4; normal\_Hahbb4 Vs. normal\_wt

Inés Indart	
tratamiento	Número de Géneros con $p < 0,05$
Sequía_wt Vs. sequia_hahb4	44
Normal_wt Vs. normal_hahb4	49
Géneros con $p < 0,05$ presentes en ambos	4

Tabla 2.8: Suelo Río Cuarto. Géneros significativamente diferentes ente los tratamientos: wt\_sequía Vs. wt\_normal; Hahb4\_sequia Vs. Hahb4\_normal.

Río Cuarto	
tratamiento	Número de Géneros con $p < 0,05$
wt_sequía Vs. wt_normal	66
Hahb4_sequia Vs. Hahb4_normal	97
Géneros con $p < 0,05$ presentes en ambos	10

Tabla 2.9: Suelo Río Cuarto. Géneros significativamente diferentes ente los tratamientos: sequía\_wt Vs. sequia\_Hahb4; normal\_wt Vs. normal\_Hahb4.

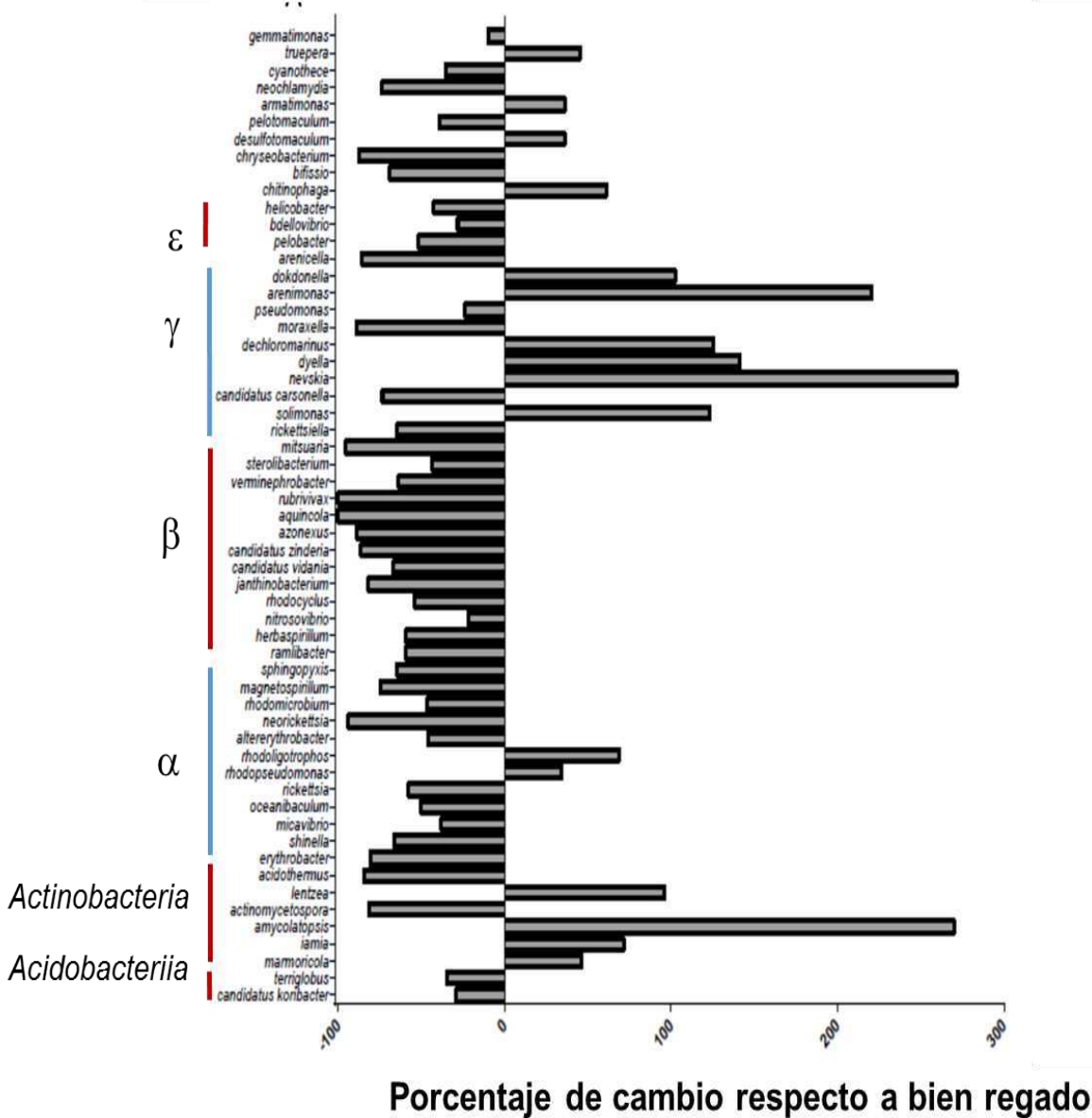
Río Cuarto	
tratamiento	Número de Géneros con $p < 0,05$
Sequía_wt Vs. sequia_Hahb4	101
Normal_wt Vs. normal_hahb4	73
Géneros con $p < 0,05$ presentes en ambos	10

Además se agruparon las muestras por tratamiento de humedad y tipo de planta, reuniendo de esta manera 6 réplicas en cada grupo, se realizó esto debido a que no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los suelos analizados (Tabla 2.3). Se compararon los grupos a nivel de género determinadas diferencias significativas en su abundancia relativa en los tratamientos de humedad y tipo de planta (Figura 2.11 A y B). Se muestran las diferencias en la abundancia relativa solo de los grupos

significativamente afectados. El valor presentado en el eje x es el porcentaje de cambio respecto al valor en la condición de mayor irrigación (100% de capacidad de campo). De esta manera un género que disminuya su abundancia relativa en la condición 30% CC respecto al 100% CC se muestran en esta figura un valor negativo y en los géneros en los que se vea un aumento en la abundancia relativa en la condición 30% CC respecto al 100% de CC presentan un valor positivo.

**Géneros afectados por humedad**

A) Suelo de Río Cuarto: Número de géneros afectados por el nivel de humedad





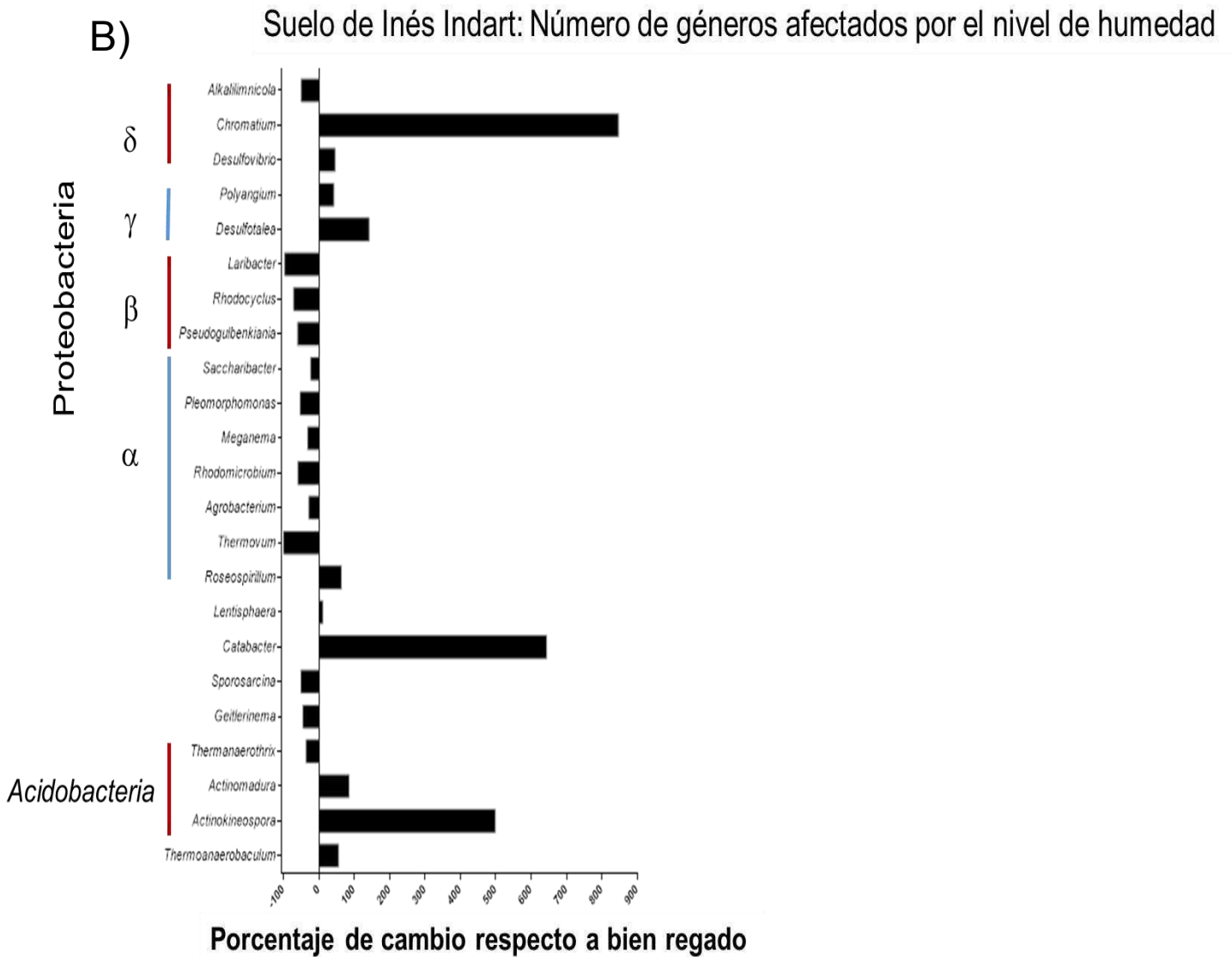


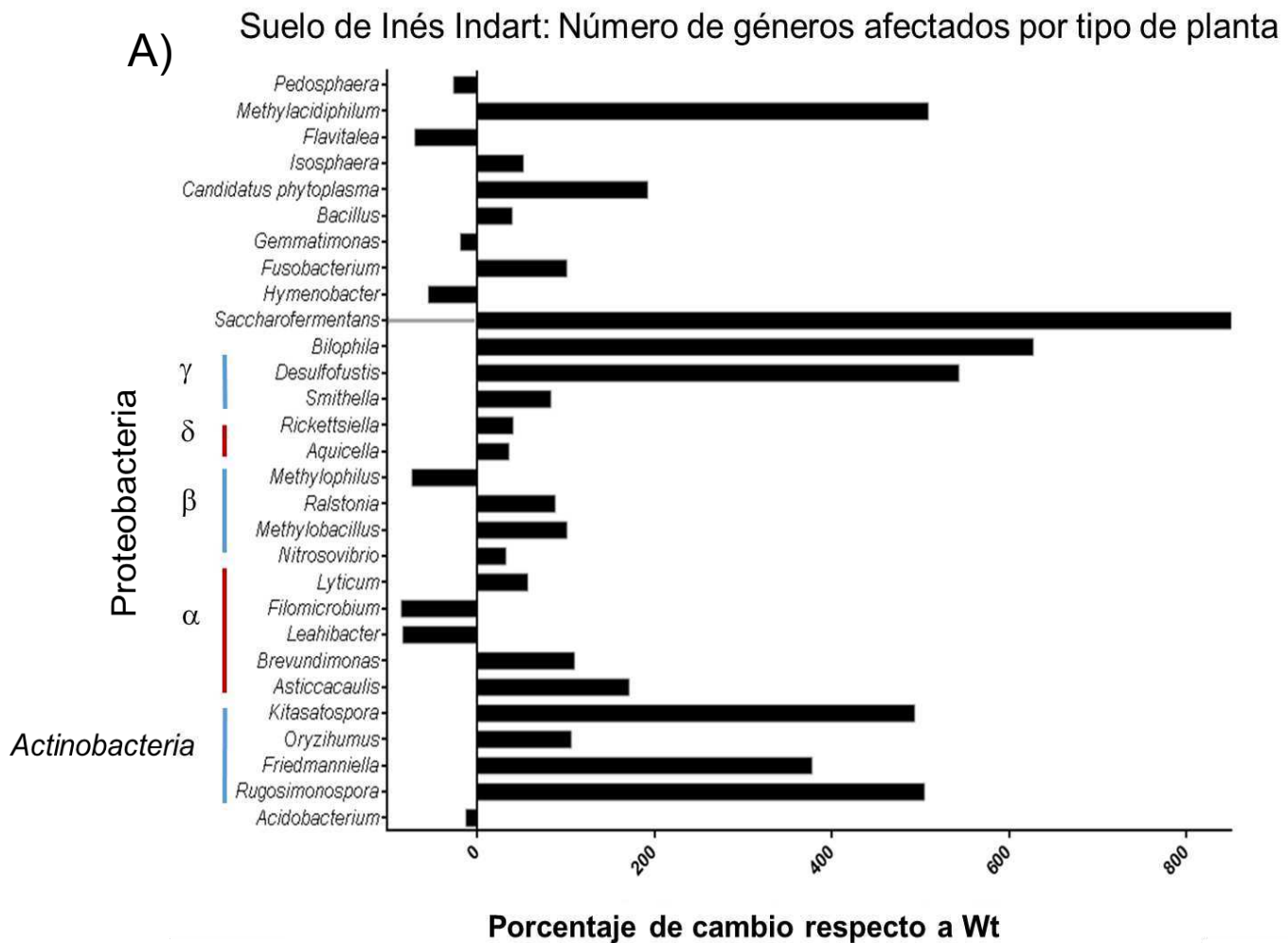
Figura 2.11: Cambio porcentual de Géneros, cambio en porcentaje de lecturas en la condición de sequía respecto a la condición bien regado. A) suelo de Río Cuarto, B) Suelo de Inés Indart.

Se encontraron 23 géneros significativamente afectados en el suelo de Inés Indart y 59 en el suelo de Río Cuarto (Fig. 2.11), de los cuales 10 géneros tuvieron una abundancia mayor en la condición de 30% de CC en el suelo de Inés Indart y 16 en el suelo de Río Cuarto. Los géneros que mostraron mayor porcentaje de cambio en la condición de sequía en el suelo de Inés Indart fueron: *Chromatium* perteneciente a las Gamma Proteobacterias y *Catabacter* dentro de los Firmicutes, mientras que en el suelo de Río Cuarto fueron *Amycolatopsis* perteneciente al grupo de las Actinobacterias, *Nevskia* y *Arenimonas* dentro de las Gamma Proteobacterias (Fig. 2.11). El porcentaje de los géneros diferencialmente afectados en Inés Indart estuvo comprendido entre 0,0017 para *Laribacter* y 0,64 *Saccharibacter* (promedio 0,026%), mientras que para Río Cuarto varió entre 0,00024% para *Acidothermus* y 2,93 % para *Gemmatimonas* (promedio 0,15 %).

Los análisis realizados a nivel Género confirman lo observado en los índices de  $\beta$  diversidad. El suelo de Rio Cuarto parece haber sido más afectado por el nivel de humedad que el suelo de Inés Indart dado que una mayor cantidad de géneros presentan diferencias entre los tratamientos.

**Géneros afectados por tipo de planta**

Se realizó el mismo análisis descrito en el apartado anterior pero en este caso agrupando las muestras por el tipo de planta, 6 muestras que contenían plantas Hahb4 y 6 muestras que contenían plantas Wt. Se realizó la comparación para ambos suelos.



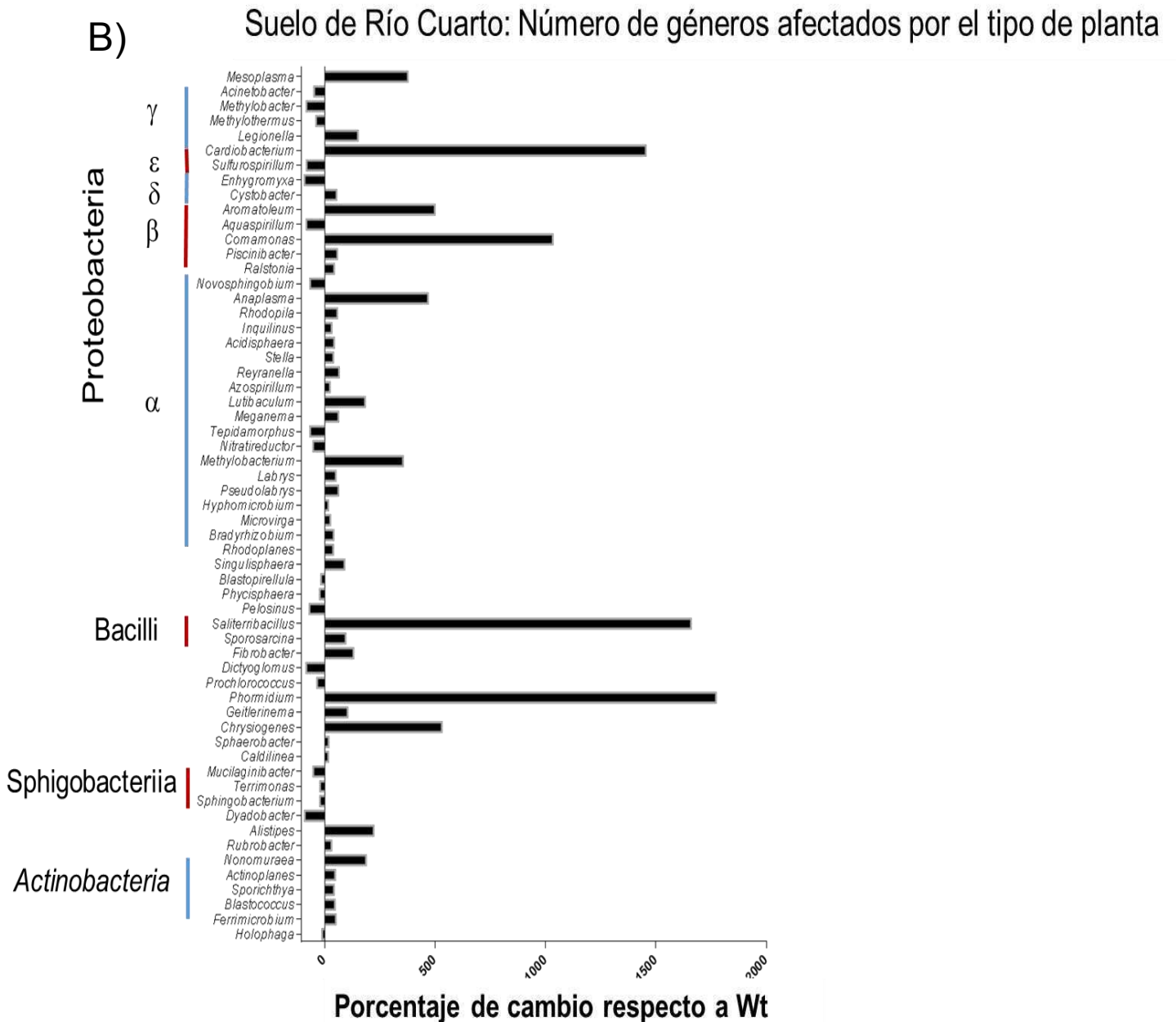


Figura 2.12: Cambio porcentual de géneros, visualizado como cambio en porcentaje de lecturas en la condición de Wt respecto a la condición Hahb-4. A) Suelo de Inés Indart; B) suelo de Río Cuarto.

Se observaron 61 géneros con diferencias significativas en las muestras de Río Cuarto y 29 en las muestras del suelo de Inés Indart (Fig. 2.12). La comparación para determinar diferencias en las dos condiciones la realizamos de la siguiente manera, se consideraron solo los géneros con diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) y se tomó de cada uno, como valor de referencia, el promedio de su proporción (% de lecturas con respecto a las lecturas totales de la muestra) en las muestras que contenían plantas Wt. Y se calculó el porcentaje de cambio al comparar este valor con el promedio de las muestras que contenían plantas

Hahb-4. De esta manera, Géneros que tengan un porcentaje mayor de lecturas en las muestras con plantas Hahb-4 tendrán un valor positivo en la Figura 2.12, y los Géneros que tengan un porcentaje de lecturas menor en las muestras con plantas Hahb-4 respecto a las Wt tendrán un valor negativo. La cantidad de géneros afectados por el tipo de planta fue mayor en ambos suelos que la cantidad afectada por el riego. Sin embargo la mayoría de los géneros afectados entre Hahb-4 y wt tuvieron un porcentaje de lecturas mayor en las muestras con Hahb-4.

El género que mostró mayor porcentaje de cambio en relación a la planta Hahb-4 en el suelo de Inés Indart fue: *Saccharofermentans* perteneciente a *Firmicutes*, mientras que en el suelo de Río Cuarto los géneros con mayor variación fueron *Saliterribacillus* perteneciente al grupo de los Firmicutes, *Cardiobacterium* dentro de las Gamma Proteobacterias y *Phormidium* dentro de las Cyanobacterias (Fig. 2.12). El porcentaje de lecturas respecto al total que tienen en la muestra los géneros diferencialmente afectados en Inés Indart estuvo comprendido entre 0,00027% para *Leahibacter* y 12% para *Acidobacterium* (promedio 0,68 %), mientras que para Río Cuarto varió entre 0,0030% para *Dyadobacter* y 2,8 % para *Rhodoplanes* (promedio 0,18 %).

Al igual que en la comparación entre nivel de humedad, el suelo de Inés Indart parece menos afectado, esto afirma lo observado en los índices de  $\beta$  diversidad, que no mostraron un efecto significativo en ninguna condición en este suelo.

**Distribución de géneros por abundancia relativa**

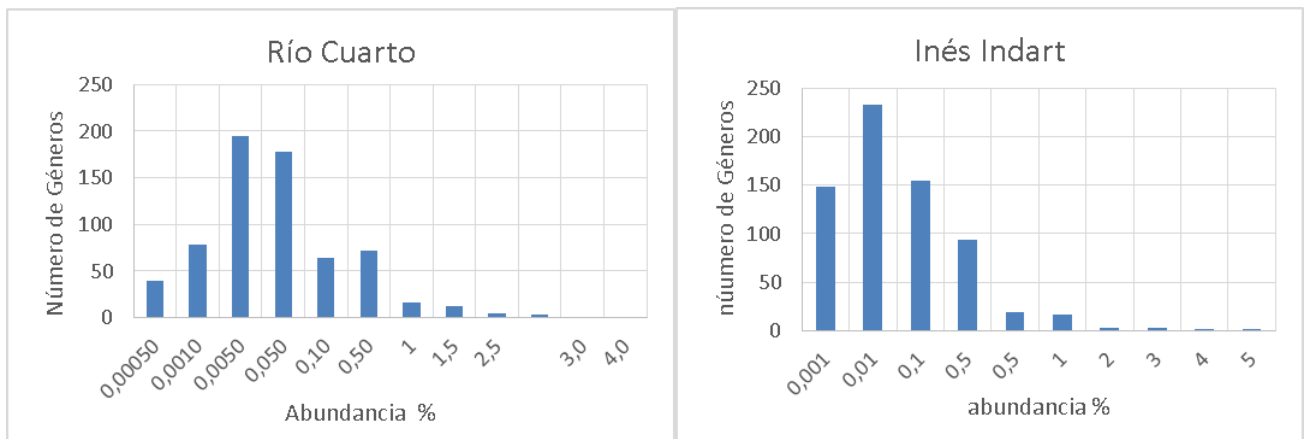


Figura 2.13: Histogramas de distribución de número de géneros bacterianos según su abundancia relativa. Se realizaron a partir de las tablas de abundancia relativa agrupando los OTUs a nivel de género.

Luego de analizar el porcentaje de representatividad de los géneros diferencialmente afectados por el nivel de humedad o el tipo de planta en el que se observa un porcentaje

promedio bajo en los dos suelos (menor a 0,05%), nos preguntamos cual sería el porcentaje de lecturas de cada uno de los géneros en toda la comunidad, como se distribuyen los géneros en la comunidad. Para ello se analizó la distribución general de los géneros en los dos suelos (Fig. 2.13), Utilizando el promedio de las 12 muestras secuenciadas para cada suelo. Como se puede observar la amplia mayoría de los géneros tienen una abundancia relativa entre 0,1 y 0,01%. Los Géneros con abundancia relativa mayor a 1% son muy escasos (25 para Inés Indart y 23 para Rio Cuarto), podemos concluir de esta manera que la mayoría de los Géneros afectados por las condiciones analizadas se encuentran en el porcentaje de representatividad promedio de la población.

## Discusión:

El cultivo de plantas transgénicas (o modificadas genéticamente GM) ha llevado a la búsqueda de información sobre el impacto directo e indirecto que éstas pueden tener sobre los ambientes naturales y los ecosistemas agrícolas. Si bien gran parte de esas investigaciones buscan garantizar la seguridad en términos de salud humana, estos organismos pueden tener a nivel ambiental diferente grado de impacto que puede variar de acuerdo con los rasgos genéticos de las plantas GM. Estas modificaciones o alteraciones se verifican en espacio y tiempo como resultado de las complejas interacciones que ocurren a nivel de la microbiota tanto aérea como subterránea (Wolfenbarger y Phifer 2014). Estos efectos también están relacionados con la naturaleza de los genes introducidos en las plantas transgénicas, muchos actúan como toxinas hacia determinados grupos de organismos y son exudados por las raíces (Turrini et al. 2004). En este caso resulta evidente la necesidad de evaluar los efectos de dicha modificación genética en los microbios de la rizosfera y en el suelo. Estudios realizados en diferentes cultivos muestran que la inserción del gen Bt puede alterar la producción de exudados afectando la estructura y abundancia de la comunidad bacteriana en la rizósfera (Devare et al. 2004; Singh et al. 2013). Sin embargo, en algunos casos estos cambios fueron menores que los cambios estacionales (Singh et al. 2013).

Las plantas GM tolerantes a la sequía, utilizadas en este trabajo llevan el gen que codifica el factor de transcripción Hahb-4 (familia HD-Zip) de girasol (*Helianthus annuus* L.). Su sobreexpresión inhibe la percepción de etileno y ácido jasmónico, retardando la senescencia de la planta bajo condiciones de sequía (Manavella et al. 2008). Por lo antes mencionado, se plantea que el efecto de esta modificación genética impactará menos a la microbiota del suelo en comparación con el caso de la toxina Bt, sin embargo podría modificar la fisiología de la planta generando una variación en determinadas características por ejemplo, desarrollo de raíces, exudados, etc., que podrían impactar indirectamente sobre la microbiota del suelo. Por otra parte, la liberación al mercado de plantas tolerantes a sequía se ha iniciado recientemente, como por ejemplo soja GM con el gen Hahb-4 en 2015 en Argentina. Sin embargo, no se han realizado estudios hasta la fecha que examinen la interacción entre las plantas tolerantes a la sequía y las comunidades bacterianas.

En este trabajo se realizó un experimento manipulativo en cámara de cultivo bajo condiciones controladas para analizar el efecto de las plantas Hahb4 bajo dos regímenes hídricos sobre la diversidad bacteriana en dos tipos de suelo. Del conjunto de resultados podemos destacar en primera instancia que las comunidades bacterianas de los suelos respondieron de manera diferente al tratamiento de humedad, las comunidades de Inés Indart se vieron menos afectadas que las comunidades de Río Cuarto. Las plantas también tuvieron una respuesta diferente en los dos suelos. Se observó menor crecimiento en el suelo de Río Cuarto y no se detectaron diferencias en el peso seco entre los tratamientos

de humedad, mientras que en el suelo de Inés Indart solo una línea de plantas no tuvo diferencia entre los tratamientos de humedad (3H).

En los análisis de diversidad se hallaron diferencias significativas en la diversidad  $\alpha$  entre suelos para los índices de Chao y Shannon, ambos fueron mayores en Río Cuarto. En el análisis de  $\alpha$  diversidad entre tratamientos en los suelos por separado no se observaron diferencias significativas en ningún caso, indicando que el nivel de humedad y tipo de planta no tuvieron un efecto significativo a nivel de composición de especies.

En los análisis de  $\beta$  diversidad, no se observaron diferencias en ninguna de las comparaciones en el suelo de Inés Indart.

Se observó un efecto significativo del tipo de plantas en la  $\beta$  diversidad en el suelo de Río Cuarto. Las muestras que contenían plantas salvajes, fueron significativamente más similares entre sí que las muestras que contenían plantas transgénicas. Este efecto sólo se detectó cuando con los parámetros que toman en cuenta la abundancia de los OTUs (Bray Curtis, Weighted UniFrac), lo cual podría indicar que el tipo de planta tiene un efecto diferencial sobre la comunidad bacteriana que se manifiesta en el cambio de proporciones relativas de algunos grupos bacterianos, no tendría efectos “deletéreos” sobre grupos particulares de bacterias, ya que no hay cambios significativos en la composición de OTUs, si así fuese el caso hubiésemos detectado estas diferencias con el parámetro Unweighted UniFrac. Por lo tanto podemos concluir que la composición de la comunidad bacteriana entre tratamientos es equivalente en cuanto a las especies que la componen. Dado que las diferencias se observan tanto con Bray-Curtis como con Weighted UniFrac podemos suponer que el efecto de las plantas no se da exclusivamente sobre grupos filogenéticamente cercanos, las plantas no afectaron a un grupo particular de bacterias. Si así fuese las diferencias solo se observarían en Bray-Curtis porque UniFrac disminuye las diferencias entre comunidades si los grupos afectados son filogenéticamente cercanos, es decir, si comparten las mismas ramas del árbol filogenético utilizado para calcular la métrica.

En el análisis Unweighted UniFrac, si bien no fue significativo, se pudo observar un efecto del riego más marcado que el efecto del tipo de planta en la composición de la comunidad bacteriana. Las muestras agruparon mejor si consideramos el tratamiento “riego”, que si consideramos el tratamiento “tipo de planta”. Dado que esto no se observó en los análisis que tienen en cuenta la abundancia relativa de los grupos, se puede suponer que el nivel de humedad en el suelo afectó a las comunidades en el suelo de Río Cuarto principalmente por su efecto en grupos bacterianos de baja abundancia relativa en la población.

El análisis de la composición de grupos taxonómicos jerárquicos (a nivel Phylum) mostró la presencia de los mismos grupos mayoritarios (Proteobacterias y Acidobacterias) en ambos suelos, si bien se pudieron detectar diferencias significativas en la proporción de algunos de los grupos entre ambos suelos. Estos resultados podrían ser complementados o validados con otros enfoques moleculares, como PCR cuantitativa (qPCR), en los cuales se deben seleccionar cuidadosamente los *primers* diseñados para detectar grupos

taxonómicos particulares que mostraron diferencias en el análisis de secuenciación masiva (Grilli et al., 2016; Zappellini et al., 2015).

Un resultado interesante del trabajo es que mediante un análisis estadístico se pudieron detectar géneros sobrerrepresentados dependiendo de la irrigación o del tipo de planta. Así, en el suelo de Río Cuarto pudimos detectar la presencia de 16 géneros bacterianos que mostraron un incremento significativo en condición de sequía con respecto a la condición de riego abundante (Fig. 2.11). Entre ellos se encontraron varios representantes de Actinobacterias, organismos con forma de bacilo que pueden formar filamentos, con respiración principalmente aeróbica y que son habitantes comunes del suelo y de los materiales vegetales. Se detectaron 4 géneros pertenecientes a este grupo: *Marmoricola*, *lamia*, *Amycolatopsis* y *Lentzea*. La relación con la sequía de *Marmoricola* y *lamia* ha sido reportada, señalándolos como bien distribuidos en muestras de arena del desierto de varios lugares en Chad (Favet et al. 2013). Los géneros *Amycolatopsis* y *Lentzea* pertenecen a la familia *Pseudonocardiaceae*, la cual posee representantes que también han sido detectados en desiertos, poniendo en evidencia su capacidad de tolerar la sequía (Favet et al. 2013; Aouiche et al. 2015). Se encontraron representantes del género *Armatimonas* pertenecientes al Phylum Armatimonadetes, un pequeño grupo de bacterias Gram negativas aerobias quimioheterótrofas y *Chitinophaga* pertenecientes a los Bacteroidetes. Dentro del grupo de los Deinococcales, el género *Truepera* fue propuesto como extremófilo potencial, contiene varias especies termófilas tolerantes a la radiación y posiblemente estén bien adaptados a las condiciones de estrés causadas por la sequía estacional y salinidad (Favet et al. 2013; Li et al. 2015). También se encontraron representantes anaerobios estrictos como la bacteria reductora de sulfatos *Desulfotomaculum* perteneciente al grupo de los Firmicutes. El phylum con mayor número de representantes entre los diferencialmente aumentados en sequía fue el de las Proteobacterias con 1 representante de las Alfa-Proteobacterias, uno de las Beta-Proteobacterias y 6 representantes de las Gamma-Proteobacterias. *Rhodoligotrophos* el género hallado para las Alfa-Proteobacterias fue encontrado asociado a concentraciones crecientes de salinidad en asociación con alcachofas (Yang et al. 2016), condición que podría asemejarse a la sequía. También se detectó sobrerrepresentado *Paludibacterium* perteneciente a las Beta-Proteobacterias. Entre las Gamma-Proteobacterias se encontraron *Solimonas*, *Nevskia* y *Dyella*, con especies asociadas al suelo, y *Dechloromarinus*, *Arenimonas* y *Dokdonella*.

En el suelo de Inés Indart, este análisis permitió detectar la presencia de 12 géneros bacterianos que mostraron un incremento significativo en condición de sequía con respecto a la condición de riego abundante (Fig. 2.11). Entre ellos se detectó el Género *Thermoanaerobaculum*, un representante del Phylum Acidobacteria, un grupo que constituye una abundante fracción de la comunidad microbiana del suelo. Dentro del Phylum Actinobacteria, considerados como los microorganismos predominantes en la microbiota del suelo que poseen representantes de zonas áridas (Miransari 2011; Mohammadipanah y Wink 2016), se hallaron 4 géneros, 3 de ellos pertenecientes a la



familia *Pseudonocardiaceae*: *Actinokineospora* algunas especies miembros de este género han sido reportadas para el desierto del Sahara y asociadas a la rizosfera (Aouiche et al. 2015; Intra et al. 2013); *Labedaea* también posee especies aisladas de la rizosfera (Lee 2013) y este género ha sido descrito como cercano a los representantes del género *Actinokineospora*. El tercer género hallado dentro de la Familia *Pseudonocardiaceae*, *Saccharomonospora* fue también reportado como un género xerofílico. Dentro de las Actinobacterias pero perteneciente a la Familia *Thermomonosporaceae*, el género *Actinomadura* ha sido reportado como habitante de regiones áridas, miembros de este grupo son considerados como las especies termotolerantes más ampliamente difundidas en suelos desérticos (Mohammadipanah y Wink 2016). Se encontró un único representante de *Firmicutes* perteneciente al género *Catabacter* así como del Phylum Lentisphaerae con un representante del género casi homónimo *Lentisphaera*. En el caso del Phylum Proteobacteria se hallaron 5 géneros con mayor representación en suelos sometidos al tratamiento de estrés hídrico. En la clase de Alphaproteobacteria, sólo el género *Roseospirillum*, mientras que 3 géneros dentro de la clase de las Deltaproteobacteria, pertenecientes al orden Desulfovibrionales pero dentro de distintas familias se hallaron los géneros *Desulfotalea* y *Desulfovibrio* ambas sulfato reductoras. El género *Polyangium* también fue descrito como representante del suelo. Entre las Gammaproteobacteria se encontró el género *Chromatium* una bacteria clasificada entre las bacterias fotosintéticas del azufre.

A partir de estos análisis se puede observar que hay una gran diversidad de especies en suelo poco explorada aún. Las diferencias a nivel género entre distintos regímenes hídricos resultaron más fáciles de interpretar dado que en algunos casos se contó con bibliografía, en muchos casos muy reciente, que permitieron apoyar los resultados pudiendo señalar a algunos de los géneros encontrados como asociados a áreas desérticas. En el caso de las diferencias a nivel género asociadas al tipo de planta esta explicación no resulta tan evidente. En el suelo de Rio Cuarto se observó mayor cantidad de géneros significativamente afectados por el tipo de planta que en Inés Indart. Se detectaron 59 géneros con  $P < 0,05$  de los cuales 40 estuvieron aumentados en las muestras con plantas Hahb-4 (Fig. 2.12). Estos géneros se distribuyeron a lo largo de 13 Phyla, siendo el Phylum que más géneros tiene con diferencias entre los dos tipos de planta el de las Proteobacteria de los cuales 19 géneros pertenecen a Alfaproteobacteria (16 aumentados en Hahb-4 y 3 disminuidos); 5 Géneros pertenecen a Betaproteobacteria (4 aumentados y 1 disminuido), 5 a Gammaproteobacteria (2 aumentados y 3 disminuidos), 2 pertenecen a Deltaproteobacteria (1 aumentado, 1 disminuido) y un solo género a Épsilonproteobacteria que se encuentra en menor abundancia en las muestras Hahb-4. También se encontraron 6 géneros que pertenecen al Phylum Actinobacteria todos ellos aumentados en Hahb-4 y 5 géneros del Phylum Bacteroidetes de los cuales 1 estuvo aumentado y 4 disminuidos.

En el suelo de Inés Indart, entre los géneros que mostraron mayor cantidad de lecturas en el suelo asociado a las plantas GM (Fig. 2.12) se encuentran 4 pertenecientes a Actinobacterias: *Oryzihumus*, *Rugosimonospora*, *Friedmanniella* y *Kitasatospora*. Entre los Bacteroidetes, el género *Hymenobacter* y entre los Firmicutes representantes del género *Bacillus* y *Saccharofermentans*. Dentro del Phylum *Fusobacteria*, el género *Fusobacterium* y el género *Isosphaera* dentro del Phylum *Planctomycetes*. También se encontraron más representados dentro de la Clase Alphaproteobacteria los géneros *Asticcacaulis*, *Brevundimonas*, *Filomicrobium*, *Leahibacter*, *Holospira* y *Lyticum*; 3 géneros de Betaproteobacteria: *Ralstonia*, *Methylobacillus* y *Nitrosovibrio*. Entre las Deltaproteobacteria: *Desulfofustis*, *Desulfonatronum*, *Bilophila* y *Smithella* y entre las Gammaproteobacteria: *Ectothiorhodospinus*, *Aquicella* y *Rickettsiella*. Del Phylum Tenericutes el género *Candidatus phytoplasma* y de los Verrucomicrobia, *Methylacidiphilum*.

Los efectos de las plantas transgénicas, que aquí analizamos, sobre las comunidades bacterianas no parecen ser dramáticos y podrían deberse a cambios estocásticos en algunos casos. Esta afirmación se apoya en lo observado en el estudio realizado analizando el efecto de las plantas de maíz Hahb4 sobre las comunidades de hongos micorrízico-arbusculares. En dicho estudio, se observaron diferencias en el porcentaje de intensidad de colonización fúngica comparando las líneas salvaje (B104) y GM (3H) en las dos condiciones de irrigación. B104 tuvo menor porcentaje de puntos de ingreso de HMA, y menor porcentaje de arbusculos de hongos micorrízico-arbusculares cuando fue sometida a 30% de CC. Esto no se observó para la línea 3H (Colombo et al. 2017), lo que sugiere que hay una diferencia en la percepción del estrés entre las líneas de maíz, dado que la colonización de HMA, el porcentaje de puntos de ingreso y arbusculos decrece en raíces sometidas a estrés (Cabello 1997). En conjunto ambos estudios mostraron que la sobreexpresión del gen Hahb-4 en plantas de maíz, en las condiciones experimentales del estudio, no afectó la infectividad fúngica de HMA (Colombo et al., 2017), ni las comunidades de bacterias del suelo rizosférico analizadas en el presente trabajo.

En la mayoría de los reportes el efecto de plantas GM sobre diferentes organismos que habitan el suelo suelen ser menores y no parecerían ser de ninguna manera irreversibles. Los cambios producidos por las plantas GM son en algunos casos menores que los producidos por la rotación de cultivos, el cambio producido por el manejo del suelo (independientemente de si los cultivos que se utilizan son GM) o la estacionalidad (Rasche et al. 2006). No obstante esto, el estudio de la microbiota asociada a un determinado evento de transgénesis resulta interesante desde el punto de vista de la profundización del conocimiento de las interacciones planta-bacteria y planta-hongos.

## CONCLUSIONES GENERALES

### Capítulo 1: Análisis de características relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal

#### 1. *Pseudomonas extremaustralis*

. Presentó una buena capacidad de solubilización y mineralización de fósforo, tanto a 28°C como en frío. El perfil de ácidos orgánicos responsables de la solubilización de fosfato inorgánico fue diferente al de *P. protegens* Pf-5. Estas diferencias se correlacionaron con la ausencia del gen *gad* responsable de la producción de 2- ceto-gluconato, en *P. extremaustralis*.

. Esta bacteria también fue capaz de producir ácido indol acético (AIA). Se detectaron genes relacionados con distintas vías para la producción de este compuesto.

. Posee la ruta metabólica completa para la síntesis de ploverdinas y mostró producción del compuesto a distintas temperaturas y condiciones de aireación. Se propone un efecto del regulador global anaeróbico Anr sobre la producción de estos compuestos.

. También se pudo comprobar que es capaz de interactuar con diferentes plantas en cultivos axenicos. Ensayos de quimiotaxis mostraron que es atraída por exudados radiculares de plantas de trigo. Se comprobó que es capaz de colonizar raíces de trigo, maíz y *Arabidopsis thaliana* y mostró un efecto positivo sobre la biomasa de trigo.

#### 2. Cepas bacterianas aisladas de suelos de la provincia de Buenos Aires con distinto régimen de lluvias

. Se obtuvieron 19 cepas bacterianas capaces de solubilizar fósforo in vitro.

. Se encontraron 22 aislamientos positivos para la producción de AIA in vitro.

. Se observó un efecto positivo sobre el crecimiento de plantas de maíz en un sistema axénico autotrófico de 2 de las cepas, IIM-Man4 e IIA-Man30, indicando que pueden ser buenas candidatas como PGPB.

## Capítulo 2: Análisis de la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas de maíz genéticamente modificadas resistentes a la sequía

. El análisis de las comunidades bacterianas asociadas a plantas GM resistentes a la sequía en suelos de dos localidades Rio Cuarto e Inés Indart sometidos a dos tratamientos hídricos permitió determinar que:

. La  $\alpha$  diversidad no mostró diferencias a nivel tratamiento pero si entre los suelos analizados.  
 . No se hallaron diferencias en el suelo de Inés Indart en  $\beta$  diversidad. En el suelo de Río Cuarto se encontraron diferencias al comparar el tipo de planta utilizando índices cuantitativos (Bray Curtis y Weighted UniFrac).

. La composición de los Phyla mayoritarios fue similar en los suelos analizados, siendo las Proteobacterias (30%) el más representado en ambos suelos, seguido por Acidobacterias (17%) y Planctomycetes (10%) y Verrucomicrobia (10%).

. El género predominante fue *Acidobacterium* con 14 a 19% de los registros (lecturas). La mayoría de los géneros presentó una abundancia relativa de 0,01-0,1 %.

. Se detectaron 10 géneros en Inés Indart y 16 géneros en Rio Cuarto que estuvieron significativamente más representados en la condición de sequía con respecto a buena irrigación. Muchos de estos géneros han sido descriptos como habitantes de zonas áridas. También se observaron 29 géneros que mostraron diferencias significativas en relación al tipo de planta en Inés Indart y 61 géneros en el suelo de Rio Cuarto. Las diferencias encontradas en este análisis deben ser verificadas por PCR cuantitativa.

. Los tratamientos tuvieron menos efecto en Inés Indart en comparación con Rio Cuarto. En Inés Indart no se observaron diferencias significativas ni con el régimen de irrigación ni con el tipo de planta y hubo un menor número de géneros afectados. En Rio Cuarto se observó un efecto significativo del tipo de planta, pero no de la irrigación.

. Como conclusión general puede decirse que la sobreexpresión del gen Hahb-4 en plantas de maíz, generó algunos efectos derivados del tipo de planta y del régimen de irrigación que afectaron en alguna medida las comunidades del suelo. En muchos casos esos efectos fueron no significativos, pero permitieron detectar diferencias entre los suelos analizados. Analizados en forma global puede decirse que en las condiciones experimentales del estudio, las comunidades de bacterias de la rizosfera no se vieron afectadas.

## Bibliografía.

- Abiri, R., Valdiani, A., Maziah, M., Shaharuddin, N. A., Sahebi, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N. y Talei, D. 2015. A critical review of the concept of transgenic plants: insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. *Curr. Issues Mol. Biol*, 18, 21-42.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A. y Kloepper, J. W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology*, 58(4), 921-929.
- Ahemad, M. y Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), pp.1–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ambrosi, C., Leoni, L. y Visca, P., 2002. Different responses of pyoverdine genes to autoinduction in *Pseudomonas aeruginosa* and the group *Pseudomonas fluorescens*-*Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), pp.4122–4126.
- Aneja, P., Zachertowska, A. y Charles, T.C., 2005. Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. *Canadian journal of microbiology*, 51(7), pp.599–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175209>.
- Aouiche, A. et al., 2015. *Actinokineospora mzabensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(1), pp.291–296.
- Arrebola, E. et al., 2003. Mangotoxin: A novel antimetabolite toxin produced by *Pseudomonas syringae* inhibiting ornithine/arginine biosynthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(3), pp.117–127.
- Ayub, N.D. et al., 2004. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Current microbiology*, 49(3), pp.170–174.
- Ayub, N.D. et al., 2007. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*, 58(3), pp.240–248.
- Ayub, N.D., Tribelli, P.M. y López, N.I., 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*, 13(1), pp.59–66.
- Badri, D. V. et al., 2009. An ABC Transporter Mutation Alters Root Exudation of Phytochemicals That Provoke an Overhaul of Natural Soil Microbiota. *Plant Physiology*, 151(4), pp.2006–2017. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.147462>.
- Bais, H.P. et al., 2006. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), pp.233–266. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
- Bashan, Y. et al., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), pp.1–33.

- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. y Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), pp.478–486.
- Bhardwaj, D. et al., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1), p.66. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84900523852ypartnerID=tZOtx3y1>.
- Blaha, D. et al., 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(3), pp.455–470.
- Bouffaud, M.L. et al., 2014. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. *Environmental Microbiology*, 16(9), pp.2804–2814.
- Bressan, M., Achouak, W. y Berge, O., 2013. Exogenous Glucosinolate Produced by Transgenic *Arabidopsis thaliana* has an Impact on Microbes in the Rhizosphere and Plant Roots. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 2, pp.1173–1179.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M. y Vanderleyden, J., 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 144(9), pp.2599–2606.
- Bruuinsma, J., 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochemistry and photobiology*, 2(18), pp.241–249. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1963.tb08220.x/abstract>.
- Cabello, M.N., 1997. Hydrocarbon pollution: Its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*, 22(3), pp.233–236.
- Cabrera, A.L., 1994. Regiones fitogeográficas argentinas (Argentinian phytogeographical regions). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, p.2: 1-85.
- Carbonetto, B. et al., 2014. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. *PLoS ONE*, 9(6).
- Carvalhais, L.C. et al., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), pp.3–11.
- Cassán, F., Vanderleyden, J. y Spaepen, S., 2014. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), pp.440–459.
- Catone, M. V. et al., 2014. High polyhydroxybutyrate production in *Pseudomonas extremaustralis* is associated with differential expression of horizontally acquired and core genome polyhydroxyalkanoate synthase genes. *PLoS ONE*, 9(6).
- Chao, A., 1984. Nonparametric Estimation of the Scandinavian Journal of Statistics. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), pp.265–270. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4615964>.

- Chen, Y. et al., 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15(3), pp.848–864.
- Colombo, R.P. Ibarra, J.G. et al., 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Association in Genetically Modified Drought-Tolerant Corn. *Journal of Environment Quality*, 46(1), p.227. Available at: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/46/1/227>.
- Danhorn, T. y Fuqua, C., 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review Of Microbiology*, 61, pp.401–422. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>.
- De Martonne, E., 1926. L' indice d' aridité , *Bulletin de l'Association de géographes français* pp.3–5.
- Devare, M.H., Jones, C.M. y Thies, J.E., 2004. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity, and diversity. *Journal Of Environmental Quality*, 33(3), pp.837–843.
- Dezar, C.A. et al., 2005. Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Research*, 14(4), pp.429–440.
- Díaz-Zorita, M., Duarte, G. A., y Grove, J. H. 2002. A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. *Soil and Tillage Research*, 65(1), 1-18.
- Dodd, I.C. et al., 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, 157(3), pp.361–379.
- Donate-Correa, J., León-Barrios, M. y Pérez-Galdona, R., 2005. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil*, 266(1–2), pp.261–272.
- Dutta, S., Rani, T.S. y Podile, A.R., 2013. Root Exudate-Induced Alterations in *Bacillus cereus* Cell Wall Contribute to Root Colonization and Plant Growth Promotion. *PLoS ONE*, 8(10), pp.1–12.
- Fallik, E., Sarig, S. y Okon, Y., 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In *Azospirillum/Plant Associations*. pp. 77–85.
- Fan, B. et al., 2011. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), pp.303–311. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.022>.
- FAO, 2002. *World agriculture : towards 2015 / 2030*, Available at: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LVV.xisy&method=posty&formato=2y&cantidad=1y&expresion=mfn=002038>.
- Favet, J. et al., 2013. Microbial hitchhikers on intercontinental dust: catching a lift in Chad. *Isme Journal*, 7(4), pp.850–867.

- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 43, pp.337–59. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>.
- Fred, E., Baldwin, I. y McCoy, E., 1933. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. *Soil Science*, 35(2), 167.
- GAIN Report, 2012. Argentina Biotechnology Annual Report. Available at: [http://gain.fas.usda.gov/Recent GAIN Publications/Agricultural Biotechnology Annual\\_Buenos Aires\\_Argentina\\_7-18-2012.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual%20Buenos%20Aires%20Argentina_7-18-2012.pdf).
- Gasser, I., Müller, H. y Berg, G., 2009. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms on and in plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1), pp.142–150.
- Giovannetti, M., 2003. The ecological risks of transgenic plants. *Rivista di Biologia-Biology Forum*, 96(2), pp.207–223. Available at: [isi:000186191700003](http://www.isinet.it/000186191700003).
- Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), pp.1–7.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, pp.109–117.
- Glickmann, E. y Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), pp.793–796.
- Gotelli, N.J. y Colwell, R.K., 2001. Quantifying Biodiversity: Procedures and Pitfalls in the Measurement and Comparison of Species Richness. *Ecology Letters*, 4(4), pp.379–391.
- Grilli, D. J., Fliegerová, K., Kopečný, J., Lama, S. P., Egea, V., Sohaefer, N. y Mrázek, J. 2016. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe*, 42, 17-26.
- Gunasekera, T.S., Csonka, L.N. y Paliy, O., 2008. Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *Journal of Bacteriology*, 190(10), pp.3712–3720.
- Gutierrez-Manero, F.J. et al., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), pp.206–211. Available at: [c:%5CMis](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016864460100055C)
- Haas, D. y Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews. Microbiology*, 3(4), pp.307–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15759041><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1129>[http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nrmicro/journal/v3/n4/full/nrmicro1129.html](http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nrmicro/journal/v3/n4/full/nrmicro1129.html).
- Haichar, F.E.Z. et al., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME journal*, 2(12), pp.1221–1230.
- Hallauer, A.R., Lamkey, K.R. y White, A.P.R., 1997. Registration of Five Inbred Lines of Maize : Registration of Tift 93 Pearl Millet Parental Line. , pp.1405–1406.



- Hammond, J.H. et al., 2015. Links between Anr and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 197(17), pp.2810–2820.
- Hansen, M.C.C. et al., 2013. High-Resolution Global Maps of. *Science*, 342(November), pp.850–854. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24233722>.
- Hayat, R. et al., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), pp.579–598.
- Herrmann, L. y Lesueur, D., 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), pp.8859–8873.
- Hu, R.M. et al., 2012. An Inducible Fusaric Acid Tripartite Efflux Pump Contributes to the Fusaric Acid Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS ONE*, 7(12), pp.1–8.
- Hurtado, R. et al., 2006. Índices fitoclimáticos de lang y de martonne para argentina en el período 1971-2000. XI Congreso Argentino de Agrometeorología. La Plata. Buenos Aires. Septiembre 2006
- Intra, B. et al., 2013. *Actinokineospora bangkokensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART7), pp.2655–2660.
- Irzik, K. et al., 2011. The KdpC subunit of the *Escherichia coli* K<sup>+</sup>-transporting KdpB P-type ATPase acts as a catalytic chaperone. *FEBS Journal*, 278(17), pp.3041–3053.
- Jervis, A.J. y Green, J., 2007. In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O<sub>2</sub> availability. *Journal of Bacteriology*, 189(7), pp.2930–2932.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E. y Okon, Y., 2003. Involvement of the Reserve Material Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization Involvement of the Reserve Material Poly- $\gamma$ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), pp.3244–3250.
- Kitson, R.E. y Mellon, M.G., 1944. Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. *Industrial y Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), pp.379–383. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i560130a017>.
- Kloepper, J., Lifshitz, R. y Zablotowicz, R., 1989. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *TibTec*, 7(February), pp.39–45.
- Laranjo, M., Alexandre, A. y Oliveira, S., 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*, 169(1), pp.2–17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>.
- Laville, J. et al., 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 180(12), pp.3187–3196.
- Lazazzera, B.A. et al., 1996. DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), pp.2762–2768.
- Lee, S.D., 2013. *Labedaea rhizosphaerae* gen. nov., sp. nov., isolated from rhizosphere soil.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 6), pp.1951–1954. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.043117-0>.
- Leoni, L. et al., 2000. Functional Analysis of PvdS , an Iron Starvation Sigma Factor of *Pseudomonas aeruginosa* Functional Analysis of PvdS , an Iron Starvation Sigma Factor of *Pseudomonas aeruginosa* Downloaded from <http://jb.asm.org/> on September 17 , 2013 by CALIFORNIA INSTITU. , 182(6), pp.1481–1491.
- Ley, R.E. et al., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31), pp.11070–11075. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033867>.
- Li, X. et al., 2015. From lithotroph- to organotroph-dominant: directional shift of microbial community in sulphidic tailings during phytostabilization. *Scientific reports*, 5(April), p.12978. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4534789ytool=pmcentrezrender type=abstract>.
- Lidbury, I.D.E.A. et al., 2016. Comparative genomic , proteomic and exoproteomic analyses of three *Pseudomonas* strains reveals novel insights into the phosphorus scavenging capabilities of soil bacteria, *Environmental microbiology*, 18(10), 3535-3549.
- Liu, W., 2010. Do genetically modified plants impact arbuscular mycorrhizal fungi? *Ecotoxicology*, 19(2), pp.229–238.
- López, N.I. et al., 1995. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(2), pp.95–101.
- López, N.I. et al., 2015. Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. *Advances in Applied Microbiology*, 93, 73-106.
- López, N.I. et al., 2009. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Current Microbiology*, 59(5), pp.514–519.
- Lozupone, C. et al., 2011. UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, 5(2), pp.169–172. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.
- Lozupone, C.A. et al., 2007. Quantitative and qualitative ?? diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), pp.1576–1585.
- Lozupone, C. y Knight, R., 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp.8228–8235.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), pp.541–556. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.
- Lundberg, D.S. et al., 2013. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), pp.86–90. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11237%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/nature11237>.
- Ma, W., Zalec, K. y Glick, B.R., 2001. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-

- labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(2), pp.137–144.
- Manavella, P.A. et al., 2006. Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Plant Journal*, 48(1), pp.125–137.
- Manavella, P.A., Dezar, C.A., Bonaventure, G., et al., 2008. HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses. *Plant Journal*, 56(3), pp.376–388.
- Manavella, P.A., Dezar, C.A., Ariel, F.D., et al., 2008. The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up-regulated in darkness, reducing the transcription of photosynthesis-related genes. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), pp.3143–3155.
- Mansfield, J. et al., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), pp.614–629.
- Marulanda, A., Barea, J.M. y Azcón, R., 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM Fungi and bacteria) from dry environments: Mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2), pp.115–124.
- Matsushita, K. et al., 1979. Membrane-bound D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and structure of cytochrome-binding form. *J Biochem (Tokyo)*, 85(5), pp.1173–1181. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citationlist\\_uids=109426](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citationlist_uids=109426).
- Meyer, J.B. et al., 2011. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene pqqC, a novel molecular marker for studying the phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), pp.7345–7354.
- Miller, S.H. et al., 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), pp.403–411.
- Miransari, M., 2011. Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), pp.875–885.
- Miyazaki, H. et al., 1995. A positive regulatory gene, pvdS, for expression of pyoverdine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *MGG Molecular y General Genetics*, 248(1), pp.17–24.
- Mohammadipanah, F. y Wink, J., 2016. Actinobacteria from arid and desert habitats: Diversity and biological activity. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Moon, C.D. et al., 2008. Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC microbiology*, 8(1), p.7. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/7>.
- Mori, Y. et al., 2016. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), pp.890–902.

- Murashige, T. y Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp.473–497. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract%5Cnpapers3://publication/uuid/F5343096-DCD8-4CCA-90F5-CE965844768C>.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), pp.265–270.
- Notz, R. et al., 2001. Biotic Factors Affecting Expression of the 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis Gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strain CHA0 in the Rhizosphere. *Phytopathology*, 91(9), pp.873–881. Available at: O'Sullivan, D.J. y O'Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56(4), pp.662–676.
- Oberhänsli, T., Dfago, G. y Haas, D., 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of general microbiology*, 137(10), pp.2273–2279.
- Pal, K.K. et al., 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 156(3), pp.209–223.
- Patten, C.L. y Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), pp.3795–801. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/8/3795%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124051ytool=pmcentrezrendertype=abstract>.
- Peiffer, J.A. et al., 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), pp.6548–53. Available at: <http://www.pnas.org/content/110/16/6548.short>.
- Philippot, L. et al., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), pp.789–799. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3109>.
- Prakamhang, J. et al., 2014. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. *Applied Soil Ecology*, 85(August), pp.38–49.
- Prashar, P., Kapoor, N. y Sachdeva, S., 2014. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1), pp.63–77.
- Prestrelski, S.J., Arakawa, T. y Carpenter, J.F., 1993. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), pp.465–473. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986183713093>.
- Quintana, R.D., 2001. Nest-site characteristics of a Gentoo Penguin *Pygoscelis papua* colony at Cierva point, Antarctic Peninsula. *Marine Ornithology*, 29(2), pp.109–112.

- Quintana, R.D., Cirelli, V. y Orgeira, J.L., 2000. Abundance and spatial distribution of bird populations at Cierva point, Antarctic Peninsula. *Marine Ornithology*, 28(1), pp.21–27.
- Raiger lustman, L.J. et al., 2015. Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles*, 19(1), pp.207–220.
- Rasche, F. et al., 2006. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *Journal of Applied Ecology*, 43(3), pp.555–566.
- Ratcliff, W.C., Kadam, S. V. y Denison, R.F., 2008. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(3), pp.391–399.
- Redondo-Nieto, M. et al., 2013. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC genomics*, 14, p.54. Available at:
- Rodríguez, H. y Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4–5), pp.319–339.
- Rubí Bianchi, A. et al., 2010. Atlas climático digital de la República Argentina. *Salta: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, p.56.
- Ruiz, J.A., Bernar, E.M. y Jung, K., 2015. Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *PLoS ONE*, 10(1), pp.1–16.
- Ruiz, J. a, 2001. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. , 67(1), pp.225–230.
- Sadzawka, A.R. et al., 2004. Métodos de análisis de tejidos vegetales. Comisión de normalización y acreditación sociedad chilena de la ciencia del suelo
- Saghir, K., Zaidi, A. y Ahmad, E., 2014. *Phosphate Solubilizing Microorganisms*, Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-08216-5>.
- Sashidhar, B. y Podile, A.R., 2010. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), pp.1–12.
- Scervino, J.M. et al., 2011. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), pp.1215–1223.
- Schalk, I.J. y Guillon, L., 2013. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15(6), pp.1661–1673.

- Schimel, J., Balsler, T.C. y Wallenstein, M., 2014. Microbial Stress-Response Physiology and Its Implications for Ecosystem Function Published by : Ecological Society of America content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to increase productivity and facilitate new forms. *Ecology*, 88(6), pp.1386–1394.
- Schippers, B. et al., 1995. Biocoating of seeds with plant growth-promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook on Agriculture*, 24(3), pp.179–185.
- Scott, C. et al., 2003. DNA target sequence and FNR-dependent gene expression. *FEBS Letters*, 541(1–3), pp.97–101.
- Sessitsch, A. et al., 2002. Critical Reviews in Plant Sciences Advances in Rhizobium Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, (August 2013), pp.37–41.
- Sevilla, M. et al., 2001. Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and  $^{15}\text{N}_2$  Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif – Mutant Strains. *MPMI*, 14(3), pp.358–366.
- Silby, M.W. et al., 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome biology*, 10(5), p.R51.
- Singh, A.K. et al., 2013. Bacterial Community Structure in the Rhizosphere of a Cry1Ac Bt-Brinjal Crop and Comparison to Its Non-transgenic Counterpart in the Tropical Soil. *Microbial Ecology*, 66(4), pp.927–939.
- Singh, B. y Satyanarayana, T., 2010. Plant growth promotion by an extracellular HAP-phytase of a thermophilic mold *Sporotrichum thermophile*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(5), pp.1267–1276.
- Sonnleitner, E. et al., 2011. The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Molecular Microbiology*, 80(4), pp.868–885.
- Spaepen, S. et al., 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312(1–2), pp.15–23.
- Tribelli, P.M., Nikel, P.I., et al., 2013. Anr, the anaerobic global regulator, modulates the redox state and oxidative stress resistance in *Pseudomonas extremaustralis*. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(2), pp.259–268.
- Tribelli, P.M. et al., 2012. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant antarctic bacterium. *Journal of Bacteriology*, 194(9), pp.2381–2382.
- Tribelli, P.M. et al., 2015. Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS ONE*, 10(12).
- Tribelli, P.M., Hay, A.G. y López, N.I., 2013. The Global Anaerobic Regulator Anr, Is Involved in Cell Attachment and Aggregation Influencing the First Stages of Biofilm Development in *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS ONE*, 8(10), pp.1–8.

- Tribelli, P.M. y López, N.I., 2011. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*, 15(5), pp.541–547.
- Tribelli, P.M., Méndez, B.S. y López, N.I., 2011. Oxygen-sensitive global regulator, *anr*, is involved in the biosynthesis of poly(3-Hydroxybutyrate) in *pseudomonas extremaustralis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(4), pp.180–188.
- Tribelli, P.M., Méndez, B.S. y López, N.I., 2010. Oxygen-sensitive global regulator, *anr*, is involved in the biosynthesis of poly(3-Hydroxybutyrate) in *pseudomonas extremaustralis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(4), pp.180–188.
- Trunk, K. et al., 2010. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: Definition of the *Anr* and *Dnr* regulons. *Environmental Microbiology*, 12(6), pp.1719–1733.
- Turrini, A. et al., 2004. The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 163(2), pp.393–403.
- Turrini, A., Sbrana, C. y Giovannetti, M., 2015. Belowground environmental effects of transgenic crops : a soil microbial perspective. *Research in Microbiology*, 166(3), pp.121–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.006>.
- Ugidos, A. et al., 2008. The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental Microbiology*, 10(7), pp.1690–1702.
- Vacheron, J. et al., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, 4, p. 356. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3775148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vance, C.P. et al., 2003. Phosphorus acquisition and use : critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New phytologist*, 157(3), 423-447.
- Vargas Gil, S., Meriles, J., Conforto, C., Basanta, M., Radl, V., Hagn, A. y March, G. J. 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 55-60.
- Venturi, V., Weisbeek, P. y Koster, M., 1995. MicroReview Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the *Fur* repressor. *Molecular Microbiology*, 17(4), pp.603–610.
- Verbon, E.H. y Liberman, L.M., 2016. Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, 21(3), pp.218–229. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, pp.571–586.
- Voulhoux, R., Filloux, A. y Schalk, I.J., 2006. Pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: The *Tat* system is required for *PvdN* but not for *FpvA* transport. *Journal of Bacteriology*, 188(9), pp.3317–3323.

- Weert, S. De et al., 2002. Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 15(11), pp.1173–1180.
- De Werra, P. et al., 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), pp.4162–4174.
- Wolfenbarger, I L. y Phifer, P.R., 2014. The Ecological Risks and Benefits of. *Science*, 2088(2000), pp.2088–2093.
- Yang, H. et al., 2016. Salinity altered root distribution and increased diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of Jerusalem artichoke. *Sci Rep*, 6, p.20687. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852800>.
- Zamioudis, C. et al., 2013. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiology*, 162(1), pp.304–318. Available at: Zhou, D. et al., 2016. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant and Soil*, 401(1–2), pp.259–272.
- Zappelini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B. y Greer, C. 2015. Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 101-110.