



7<sup>mo</sup>  
Congreso de  
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM  
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

## AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDÓFITAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN PLANTAS DE ARROZ CULTIVADAS EN DIFERENTES SUELOS

Isolation of nitrogen-fixing endophytic bacteria in rice plants grown in different soils

Gastón Rariz Mollo<sup>a\*</sup>, Lucía Ferrando<sup>b</sup>, Ana Fernandez Scavino<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Iguá 4225 Esq. Mataojo, Montevideo, Uruguay. [gastonrariz@gmail.com](mailto:gastonrariz@gmail.com).

<sup>b</sup>Laboratorio de Ecología Microbiana, Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Av. Gral Flores 2124, Montevideo, Uruguay. [luciaf@fq.edu.uy](mailto:luciaf@fq.edu.uy), [afernand@fq.edu.uy](mailto:afernand@fq.edu.uy).

\*Gastón Rariz Mollo: +598 29244209. [gastonrariz@gmail.com](mailto:gastonrariz@gmail.com).

*Palabras claves: BPCV, diazótrofo, Oryza sativa, rendimientos, ARA*

*Keywords: PGPB, diazotrophic, Oryza sativa, yields, ARA*

*Titulo abreviado: Bacterias endófitas de plantas de arroz*

### ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is a major agricultural product exported by Uruguay. It is imperative to find new tools to increase the yield and to improve the crop nutrient utilization keeping sustainable and healthy conditions of production.

Endophytic bacteria grow in internal vegetal tissues without causing symptoms of damage to the plant. They can have a major impact on the cereal productivity by

stimulating plant growth by mechanisms such as hormone production, antagonism of pathogens or atmospheric nitrogen fixation (diazotrophic bacteria). The use of biological inoculants instead of chemical nitrogen fertilizers is a strategy that reduces the environmental impact of agrochemicals.

The objective of this work is to isolate endophytic diazotrophic bacteria in rice planted in different soils from Uruguay. The assay was performed in controlled conditions sowing sterilized seeds in soils of different origin and characteristics. Plants yield was evaluated after 20 days of incubation. Diazotrophic bacteria were isolated from roots and aerial tissues of the plants. Different culture media and incubation conditions were used to recover aerobic, anaerobic sporulated and anoxygenic phototrophic bacteria.

More than 50 isolates were obtained and tested for the diazotrophic activity and for the amplification of *nifH* gene. The diversity of the isolates was analyzed by ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). The identification was performed by 16S rRNA gene sequencing. The main species detected were *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter cloacae* and *Paenibacillus graminis*. These strains could be good tools to develop inoculants to promote the growth in rice plants.

## RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los principales rubros de exportación agrícola de Uruguay. Es imprescindible encontrar nuevas herramientas que potencien el desempeño del cultivo y mejoren la utilización de nutrientes con un adecuado margen de seguridad alimentaria y ambiental.

Las bacterias endófitas son aquellas que se desarrollan en tejidos internos de la planta sin causar síntomas de daño en ella. Pueden tener un impacto importante en la productividad de cereales estimulando el crecimiento de la planta por mecanismos como la producción de hormonas, el antagonismo de patógenos o la fijación de nitrógeno atmosférico (diazótrofas). El uso de inoculantes biológicos en lugar de fertilizantes químicos nitrogenados es una estrategia que disminuye el impacto ambiental causado por los agroquímicos.

El objetivo de este trabajo es aislar bacterias endófitas diazótropas en plantas de arroz sembradas en distintos suelos con y sin historia de cultivo. El ensayo se realizó en fitotrón sembrando semillas esterilizadas superficialmente en suelos de diferente origen

y características. Se evaluó el rendimiento vegetal a los 20 días incubación. Se aislaron bacterias diazótroficas de raíz y de parte aérea cultivadas en diferentes medios variando las condiciones de incubación para recuperar diazótroficos aerobios, anaerobios esporulados y fotótroficos.

Se obtuvieron más de 50 aislamientos, cuya actividad diazotrófica se verificó mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) y la amplificación de los genes *nifH*. La diversidad de los aislamientos se analizó por ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) y la identificación por secuenciación del gen 16S rRNA. Se aislaron e identificaron cepas diazótroficas de las especies *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus graminis* que podrían usarse en un futuro como inoculantes para la promoción del crecimiento en plantas de arroz.

## INTRODUCCIÓN

El arroz es un cereal que pertenece a la familia de las gramíneas de origen milenario que proviene de las regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. Existen 19 especies, siendo *Oryza sativa* la más usada para el consumo. El aumento de la población mundial y la demanda creciente por alimentos impulsa el uso intensivo del suelo y la obtención de mayores rendimientos. Para lograrlo es imprescindible encontrar nuevas tecnologías que potencien el desempeño de los cultivos y mejoren la utilización de los nutrientes con un adecuado margen de seguridad alimentaria y ambiental. Esta tarea demanda grandes esfuerzos de investigación y desarrollo y los microorganismos con capacidad de promover el crecimiento vegetal son una alternativa viable para obtener cultivos sustentables reduciendo el uso de agroquímicos (ACA, 2010).

Los microorganismos endófitos desarrollan parte de su ciclo de vida en el interior de la planta sin causar síntomas de daño en ella, colonizando los alrededores de las células de la epidermis y la exodermis, y las células del córtex (Reinhold- Hurek & Hurek, 1998). Se ha postulado que las bacterias endófitas pueden tener un impacto importante en la productividad de los cultivos de interés agronómico porque estimulan el crecimiento de la planta por mecanismos como la producción de hormonas (Hallmann *et al.*, 1997; Sharma & Novak, 1998), el antagonismo de patógenos (Sturz *et al.*, 1999; Wilhelm *et al.*, 1997; Krechel *et al.*, 2002) o la fijación de nitrógeno atmosférico.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) han sido un grupo bacteriano muy estudiado dentro de las disciplinas microbiológicas asociadas a la agricultura y ecología. Esto es debido a su capacidad de convertir el nitrógeno de la atmósfera en una forma asimilable por la planta como es el amonio. El amonio se incorpora al tejido vegetal uniéndose a esqueletos carbonados para dar aminoácidos. La asociación planta-bacteria aumenta la velocidad de crecimiento y el rendimiento de la planta en peso fresco, contenido de materia seca y peso de grano.

Aunque la asociación de las leguminosas con bacterias diazótrofas es la mejor conocida, se ha encontrado que diversas bacterias fijadoras de nitrógeno están asociadas a raíces de muchas gramíneas (James & Olivares, 1998). La caña de azúcar ha sido uno de los cultivos más estudiados en este aspecto, para el cual se ha demostrado que la fijación biológica de nitrógeno realiza grandes aportes a los requerimientos de N de la planta minimizando las cantidades de fertilizantes adicionadas (Lima *et al.*, 1987). En el caso del cultivo de arroz, también hay estudios realizados sobre la flora bacteriana que habita en su interior. Las bacterias fijadoras de nitrógeno no son el único grupo que puede

colonizar el tejido interno de la planta, sin embargo ha sido el principal grupo fisiológico estudiado dentro de la flora endófito (Rodríguez *et al.*, 2008). La presencia de bacterias diazótrofes endófitas ha sido detectada en raíz, tallo y hoja de arroz mediante ensayos basados en el gen reportero GUS (Prakamhang *et al.*, 2009).

En el caso de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, el gen *nifH* que codifica para la dinitrogenasa reductasa que es parte del complejo de la nitrogenasa responsable de todo el proceso, ha sido ampliamente utilizado como marcador funcional para el estudio de estas comunidades, a pesar de que la sola presencia de este gen no es concluyente respecto a su actividad.

Está demostrado que la composición química del suelo y el tipo de planta influyen en la estructura de la comunidad de bacterias del suelo. El cultivo de arroz en Uruguay se realiza en dos regiones distintas del país (norte y este) que comprenden suelos con diferentes características fisicoquímicas como pH, textura, contenido de N, C orgánico, P y K. En este trabajo se plantea utilizar suelos de características diferentes, con y sin historia de cultivo de arroz, como inoculante natural de semillas de arroz previamente esterilizadas. De este modo se podrán “capturar” bacterias colonizadoras endófitas que puedan competir efectivamente con las endófitas del grano en las primeras etapas del desarrollo del cultivo.

## **METODOLOGÍA**

### **Muestreo del suelo**

Se utilizaron suelos de 4 departamentos donde actualmente se planta arroz en Uruguay: Artigas (suelo rico), Tacuarembó (suelo pobre), Treinta y Tres (suelo pobre) y Rocha

(suelo rico). De cada región se obtuvo una muestra de suelo con historia y otra sin historia de cultivo de arroz. Cada muestra de suelo fue considerada como un tratamiento diferente, obteniendo así un total de 8. Se consideraron suelos ricos aquellos con un contenido de materia orgánica mayor o igual al 3%.

Se realizaron dos controles con suelos esterilizados para diferenciar el aporte de los nutrientes del suelo del aporte de los microorganismos endófitos en el rendimiento del cultivo.

Los suelos fueron tamizados y luego fertilizados con  $32 \times 10^{-3}$  g N .kg<sup>-1</sup> de suelo,  $96 \times 10^{-3}$  g P .kg<sup>-1</sup> y  $16 \times 10^{-3}$  g K .kg de suelo<sup>-1</sup>, para que todos los tratamientos tuvieran la misma fertilización basal.

### **Desinfección superficial de las semillas y germinación**

Se retiró la cáscara y las semillas de arroz se hidrataron en agua destilada estéril durante una hora. Luego se desinfectaron con NaClO 2 % con agitación durante 5 minutos. A continuación se realizaron 4 lavados sucesivos de 3 minutos de duración con 200 mL de agua destilada estéril. Para verificar la efectividad de la desinfección superficial realizada sobre la semilla, se puso en contacto dicha superficie con placas con medio de cultivo R2A Difco.

Se hicieron germinar las semillas humedecidas en condiciones asépticas durante 3 días a 30°C y en oscuridad.

### **Ensayo de crecimiento de las plántulas en condiciones controladas**

Las semillas germinadas se transplantaron a macetas conteniendo los diferentes suelos. Se incubaron las macetas durante 20 días en el fitotrón a una temperatura de 25 °C, 80 % de humedad y alternando ciclos de luz y oscuridad, 16 y 8 horas respectivamente.

El experimento se realizó con dos repeticiones en un diseño completamente al azar (DCA). Los duplicados se distribuyeron aleatoriamente en el fitotrón. Cada unidad experimental fue definida como un set de 10 macetas conteniendo 50 g de suelo tamizado fertilizado y 2 plantines cada una.

### **Selección de tratamientos a analizar y procesamiento de plantas**

A los 20 días de crecimiento se comparó el rendimiento de las plantas crecidas en los diferentes suelos con el fin de seleccionar dos tratamientos de los cuales aislar bacterias endófitas diazótrofes. El rendimiento se evaluó mediante medida de longitud de la parte aérea.

Para comparar los rendimientos obtenidos para cada tratamiento se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante el test de Tukey mediante el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009).

### **Enriquecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de parte aérea y raíces de arroz**

Se separó la parte aérea de la raíz y se desinfectó cada parte de manera similar a las semillas. Se utilizó para cada duplicado 400 mL de solución NaClO 2 % con agitación durante 5 minutos, luego se hicieron 4 lavados sucesivos con 400 mL de agua destilada estéril agitando 3 minutos cada lavado.

Las muestras se maceraron en morteros estériles y se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0.85 % hasta la dilución 1:10<sup>4</sup>. Se sembró en medio base RMR modificado carente de nitrógeno (Elbeltagy *et al.*, 2001) variando las fuentes de carbono y las condiciones de incubación (anaerobiosis, aerobiosis, presencia o ausencia de luz) con el fin de recuperar mayor diversidad de diazótrofos. Para anaerobios se utilizó glucosa y ácido málico como fuentes de carbono con el fin de recuperar bacterias esporuladas y bacterias fotótrofas anoxigénicas, respectivamente. Previo a la inoculación del medio para anaerobios esporulados, las diluciones fueron sometidas a un shock térmico de 80°C durante 15 minutos con el fin de eliminar las células vegetativas. Mientras que para aerobios se utilizaron dos variantes: a) el medio original más el agregado de macerado alcohólico de planta de arroz, y b) el medio base con citrato como fuente de carbono.

Se inocularon viales (anaerobios) y tubos de vidrio (aerobios) con 5.55 mL de medio líquido y 11.1 mL de medio semisólido respectivamente, y se incubaron durante 5 días a 30 °C.

### **Capacidad fijadora de nitrógeno de cultivos mediante ensayo ARA y aislamiento**



Se evaluó la capacidad de fijar nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) en el medio RMR sembrado con las diluciones del macerado de parte aérea y raíz. Luego de la incubación se inyectó la cantidad necesaria de acetileno (AGA, 99.95 % de pureza) para obtener una concentración final de 10 % v/v en el headspace. Se incubó nuevamente a 30 °C y se evaluó la producción de etileno a las 72 horas mediante cromatografía gaseosa, en cromatógrafo SRI 8610 equipado con detector de ionización de llama y una columna Porapak R (80/100 mesh, 6 feet x 1/8 inch), utilizando N<sub>2</sub> como gas carrier y 45 °C de temperatura de horno. Los cromatogramas se analizaron con el software Peaksimple2. Como control positivo se usó la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense*. Se tomaron como positivas las áreas de etileno 100 veces mayores que el nivel basal de controles con acetileno, no inoculados.

De los tubos o viales con actividad fijadora de nitrógeno, se realizaron aislamientos de bacterias aerobias y anaerobias facultativas en medio para oligótrofos, R2A agar, incubado a 30 °C durante 48 horas.

### **Obtención del ADN y amplificación del gen *nifH***

Se amplificó el gen *nifH* de todas las cepas aisladas en R2A, como se describe a continuación. Se realizó lisis alcalina a partir de cultivos puros y frescos. Se tomó una colonia, se agregó 100 µL de NaOH 0.05 M y se incubó durante 15 minutos a 90 °C. Se centrifugó 2 minutos a 18600 g, se descartó el pellet y se utilizó el sobrenadante para la amplificación (Rademaker *et al.*, 1998). Para aquellas cepas en las que no se pudo amplificar a partir de este sobrenadante, se realizó extracción de ADN utilizando el kit

Wizard Genomic DNA Purification. Se centrifugó 1 mL de cultivo fresco 15 minutos a 15000 g y se extrajo ADN; el producto se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua miliQ.

Para la amplificación del gen *nifH* mediante PCR se preparó una mezcla conteniendo: buffer para la Taq polimerasa 1x,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM; BSA 0.2 mg/ml, dNTPs 0.2 mM cada uno, primers PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (Poly *et al.*, 2001) 0.1  $\mu\text{M}$  cada uno, Taq DNA polimerasa 0.05  $\text{u.}\mu\text{L}^{-1}$  y agua miliQ para completar 25  $\mu\text{L}^{-1}$ . Se amplificó 1  $\mu\text{L}^{-1}$  de sobrenadante de lisis alcalina o de solución de ADN.

Para realizar la PCR se utilizó el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización (94 °C durante 1 minuto), hibridación (57 °C durante 1 minuto) y extensión (72 °C durante 1 minuto); una etapa de extensión final de 72 °C durante 10 minutos y una etapa final de 4 °C durante 15 min.

### **Confirmación de la capacidad fijadora de nitrógeno de cepas *nifH*<sup>+</sup> aisladas mediante ensayo ARA**

En las cepas aisladas en las que se detectó el gen *nifH* se confirmó la fijación de nitrógeno mediante el ensayo ARA. Cada cepa se inoculó en la misma variante del medio sin nitrógeno RMR del cual fue aislada originalmente. Las cepas se sembraron en medio RMR sin nitrógeno aerobio y se incubaron por 3 días. Las demás condiciones son las descritas anteriormente.

### **Amplificación por PCR del gen 16S de cepas *nifH*<sup>+</sup>**

Para la amplificación del gen 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se preparó una mix conteniendo: buffer para la Taq polimerasa 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM; BSA 0.5 mg.mL<sup>-1</sup>, dNTPs 0,2 mM cada uno, primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 0.48 μM cada uno, Taq DNA polimerasa 0.04 u.μL<sup>-1</sup> y agua miliQ para completar 25 μL<sup>-1</sup>. Se amplificó 1 μL<sup>-1</sup> de sobrenadante de lisis alcalina o de solución de ADN.

Para realizar la PCR utilizó el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que comprenden: desnaturalización (94 °C durante 1 minuto), hibridación (55 °C durante 1 minuto) y extensión (72 °C durante 3 minutos); y una etapa de extensión final de 72 °C durante 7 minutos.

### **Screening de diversidad usando el gen 16S de cepas *nifH*<sup>+</sup>**

Se realizaron perfiles de restricción del gen 16S rRNA, ARDRA, modificado de Massol-Deyá *et al.* (1995). Para la reacción de restricción se preparó una mix conteniendo: las enzimas *MspI* y *RsaI* (Fermentas) en una concentración de 0.3 U μL<sup>-1</sup> y el buffer recomendado por el fabricante con BSA 1x. Para cada reacción se alicuotó 2.4 μL de la mix y luego se le agregó 12.6 μL del producto PCR del gen 16S rRNA. La digestión se realizó por 12hs a 37 °C. Los productos de restricción se separaron en gel de agarosa Methaphor 3.5 % en buffer TBE 0.5x a 100 V durante 1 hora aproximadamente. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador molecular pBR322/HaeIII.

### **Secuenciación parcial de los genes *nifH* y 16S de cepas *nifH*<sup>+</sup>**

Los genes 16S rRNA y *nifH* de cada cepa *nifH*<sup>+</sup> fueron secuenciados parcialmente, utilizando los primers 27F y PolF respectivamente, por el Servicio de secuenciación de Macrogen Inc. usando un secuenciador capilar ABI PRISM 3730XL. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Rendimiento de plántulas crecidas en diferentes suelos**

A los veinte días de crecimiento controlado en fitotrón, antes de que las plantas fueran removidas de su maceta para ser procesadas, se midió el largo de la parte aérea de cada una. Los datos fueron analizados estadísticamente y los resultados mostraron que no se obtuvieron diferencias significativas de rendimiento para el largo de parte aérea entre los diferentes tratamientos. Por lo tanto, para realizar los aislamientos se seleccionaron dos tratamientos que presentaron características contrastantes en cuanto a color y ancho de tallos y hojas.

Los dos tratamientos seleccionados para aislar bacterias endófitas diazótrofes correspondían a suelos procedentes de Rocha (muestras 21 y 22) y de Artigas (muestras

81 y 82). Ambos suelos tienen pH similar y alto contenido en materia orgánica (Artigas pH 6.1 y C org 3.0 %; Rocha pH 5.8, y C org 2.8%) y no habían sido empleados para agricultura. Las plantas del suelo de Rocha se mostraron más vigorosas mientras que las del suelo de Artigas se observaron con menor ancho de hoja y tallo y además con falta de pigmentación.

### **Aislamiento y caracterización de bacterias aerobias endófitas diazótrofes**

Los enriquecimientos aerobios para los cuales el ensayo ARA dio positivo (ARA<sup>+</sup>) fueron subcultivados 3 veces en el mismo medio para verificar que la capacidad fijadora de nitrógeno del cultivo se mantenía.

De los enriquecimientos aerobios ARA<sup>+</sup> se aislaron 80 cepas en las cuales se amplificó el gen *nifH*. Solamente 20 de estas cepas (25%) dieron amplificación positiva. Las cepas *nifH*<sup>+</sup> aisladas fueron sembradas en medio de cultivo RMR semisólido con las mismas características del cual fue aislada originalmente. Se observó que no todas las cepas eran ARA<sup>+</sup>, incluso cepas de la misma especie mostraron resultados contradictorios (Tabla 1).

En el screening de diversidad realizado por ARDRA para estas cepas se observaron 13 perfiles distintos, indicando que habría una gran diversidad a nivel del gen 16S ARNr entre los aislamientos.

**Tabla 1.** Identificación y caracterización de cepas fijadoras de nitrógeno endófitas aisladas.**Table 1.** Identification and characterization of endophytic nitrogen-fixing isolates.

Cepa	Identificación*			Origen**			ARA (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .h <sup>-1</sup> )
	Especie más cercana (Nº acceso 16S, <i>nifH</i> )	% Id 16S	% Id <i>nifH</i>	M	S	L	
5	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	99	99	MC	A	R	<0.11
7	<i>Azospirillum lipoferum</i> (-, <a href="#">DQ787334.1</a> )	nd	99	C	R	R	<0.11
10	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	99	99	MC	R	A	2.90
11	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	99	99	MC	R	A	2.30
22	<i>Azospirillum lipoferum</i> (-, <a href="#">DQ787334.1</a> )	nd	98	MC	A	A	<0.11
23	<i>Azospirillum lipoferum</i> (-, <a href="#">DQ787334.1</a> )	nd	97	MC	A	A	<0.11
24	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	95	97	MC	A	A	2.26
45	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	99	99	C	R	R	2.44
61	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	97	97	MC	A	A	2.41
64	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ438997.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	99	97	C	A	R	<0.11
20	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">DQ787329.1</a> , <a href="#">DQ787334.1</a> )	99	99	C	A	R	1.67
21	<i>Azospirillum lipoferum</i> ( <a href="#">FQ311873.1</a> ,-)	99	nd	MC	A	R	1.31
16	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ( <a href="#">HQ219943.1</a> , <a href="#">CP002039.1</a> )	99	99	C	R	A	2.28
75	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ( <a href="#">HQ219943.1</a> , <a href="#">CP002039.1</a> )	99	99	C	R	A	1.73
34	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ( <a href="#">HQ219943.1</a> ,-)	99	nd	MC	R	R	2.00
26	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (-, <a href="#">CP002039.1</a> )	nd	98	MC	R	A	<0.11
9	<i>Enterobacter cloacae</i> ( <a href="#">HM585374.1</a> , <a href="#">AF303353.1</a> )	99	91	C	A	R	<0.11
52	<i>Enterobacter cloacae</i> ( <a href="#">HM585374.1</a> , <a href="#">AF303353.1</a> )	99	91	MC	A	R	1.20
69	<i>Enterobacter cloacae</i> ( <a href="#">HM585374.1</a> , <a href="#">AF303353.1</a> )	99	91	MC	A	R	1.34
	<i>Enterobacter cloacae</i> ( <a href="#">HM585374.1</a> , <a href="#">AF303353.1</a> )	99	91	C	A	R	<0.11
H	<i>Paenibacillus graminis</i> ( <a href="#">AB682293.1</a> , <a href="#">AB485747.1</a> )	99	98	G	82	R	<0.11
G	<i>Paenibacillus graminis</i> ( <a href="#">AB682293.1</a> , <a href="#">AB485747.1</a> )	99	98	G	82	A	0.19

\* % de similitud entre la secuencia del gen 16 S RNAr o *nifH* de la cepa y la secuencia de la especie más cercana

\*\*M= medio de cultivo RMR suplementado con: MC= macerado de planta, C= citrato, G= glucosa. S= suelo: A= Artigas, R= Rocha. L= localización: R=raíz, A=parte aérea.

## **Aislamiento y caracterización de bacterias anaerobias facultativas endófitas diazótrofes**

Con respecto a los enriquecimientos anaerobios, en el medio dirigido a la recuperación de fotótrofos fijadoras de nitrógeno no se logró recuperar ninguna cepa que presentara tales características. Por otro lado, tampoco se obtuvieron enriquecimientos anaerobios de microorganismos esporulados que mostraran reducción de acetileno.

Sin embargo, en algunas diluciones de estos enriquecimientos se logró amplificar el gen *nifH*. A partir de estos enriquecimientos positivos para el gen de la nitrogenasa se realizó el aislamiento en medio R2A incubando en condiciones aerobias y se verificó la presencia del gen *nifH* en las cepas purificadas.

Se obtuvieron 4 cepas anaerobias facultativas que poseen el gen *nifH*.

### **Identificación y caracterización de las bacterias endófitas diazótrofes**

La secuenciación de los genes 16S RNAr y *nifH* reveló que las especies presentes eran *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus graminis* (Tabla 1).

Estos resultados sugieren que las cepas obtenidas de *Azospirillum lipoferum* son endófitas diazótrofes que se encuentran en suelo rico sin historia de cultivo tanto en Artigas como Rocha. Esta especie coloniza raíz y parte aérea de la planta. Por el contrario, las otras especies se hallaron en plantas cultivadas en uno de ambos suelos. *Herbaspirillum seropedicae* se obtuvo solamente de plantas sembradas en suelo

proveniente de Rocha, de raíz y de parte aérea, mientras que *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus graminis* se aislaron de plantas sembradas en suelo de Artigas, en raíz y en raíz y parte aérea, respectivamente.

Las especies que mostraron mayor capacidad fijadora de nitrógeno mediante ARA son *A. lipoferum* y *H. seropedicae*, para los cuales se obtuvieron máximos de 2.90 y 2.28 nmoles de etileno consumidos por hora al cabo de 72 horas de incubación.

Se ha observado por métodos de hibridación *in situ* (Monteiro *et al.*, 2008) y por el gen reportero *gusA* asociado al *nifH* (Roncato-Maccari *et al.*, 2003a) que *H. seropedicae* coloniza tejidos internos tanto en la raíz como en parte verde de gramíneas. Se ha demostrado que la inoculación con *H. seropedicae* produce un aumento en la biomasa total del cultivo de arroz y caña de azúcar (Boddey *et al.*, 1995; Baldani *et al.*, 2000; James *et al.*, 2002; Gyaneshwar *et al.*, 2002). Los mecanismos por los cuales se propone que *H. seropedicae* promueve el crecimiento de estas gramíneas son mediante la fijación biológica de nitrógeno, producción de fitohormonas, de ACC (1-aminocyclopropane 1-carboxylate) deaminasa y de sideróforos (Pedrosa *et al.*, 2011; Roncato-Maccari *et al.*, 2003b; Bastián *et al.*, 1998).

Al igual que en el presente trabajo, otros autores han establecido que *A. lipoferum* es endófito de arroz que coloniza raíces y partes aéreas. Se sabe que tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante la producción de la fitohormona Acido Indol Acético (AIA) y además mediante fijación biológica de nitrógeno (Kuss *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 1997).



## CONCLUSIÓN

En este trabajo se constata que las especies *H. seropedicae* y *A. lipoferum*, que han sido reportadas como promotoras del crecimiento en gramíneas, son endófitas de arroz que ha sido cultivado en suelos uruguayos que no han sido utilizados para la producción de arroz. Dichas cepas, junto con las otras recuperadas, se detectan en etapas tempranas del cultivo y podrían desplazar a las bacterias endófitas nativas presentes en semilla. La diferencia en la composición de las bacterias endófitas diazótroficas no se refleja en el desarrollo de la parte aérea de la planta. Estos resultados indican que el Uruguay posee suelos con un potencial biológico que no ha sido explotado aún.

## BIBLIOGRAFÍA

- ACA (Asociación de Cultivadores de Arroz). 2010. Cuatro años de inoculación de arroz. ACA, *Revista de la Asociación de Cultivadores de Arroz*, Uruguay, 63: 38-42
- Baldani VLD, Baldani JI & Dobereiner J. 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* sp. *Biol. Fertil. Soils*, 30: 485–491
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R & Bottini R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul*, 24: 7–11

- Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD & Döbereiner J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*, 174: 195–209
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M & Robledo CW. 2009. *InfoStat versión 2009*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H & Minamisawa K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol*, 67: 5285-5293
- Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM & Ladha JK. 2002. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytol*, 154: 131–145
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF & Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*, 43: 895-914
- James EK & Olivares FL. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci*, 17: 77-119
- James EK, Gyaneshwar P & Mathan N. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact*, 15: 894–906
- Krechel A, Faupel A, Hallmann J, Ulrich A & Berg G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can J Microbiol*, 48: 772-786
- Kuss AV, Kuss VV, Lovato T & Flôres LM. 2007. Nitrogen fixation and *in vitro* production of indol acetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. *Pesq Agropec Bras*, 42: 1459-1465

- Lima E, Boddey RM & Doebereiner J. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a super (15) N added nitrogen balance. *Soil Biol Biochem*, 19: 165-170
- Malik KA, Bilal R, Mehnaz S, Rasul G, Mirza MS & Ali S. 1997. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil*, 194: 37–44
- Massol-Deya AA, Odelson DA, Hickey RF & Tiedje JM. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *Mol Microb Ecol Manual* 3.3.2: 1-18
- Monteiro RA, Schmidt MA, Baura VA, Balsanelli E, Wassem R, et al. 2008. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genet Mol Biol*, 31: 932–937
- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, et al. 2011. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet.*, 7(5): e1002064. doi:10.1371/journal.pgen.1002064
- Poly F, Monrozier LJ & Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol*, 152: 95–103
- Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, Boonkerd N & Teaumroong N. 2009. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology*, 42:141–149
- Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic J & Bruijn FJ de. 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.4.3: 1-27

- Reinhold-Hurek B & Hurek T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*, 6 (4): 139-144
- Rodrigues PE, Rodrigues LS, de Oliveira MAL, Baldani VLD, dos Santos Teixeira KR, Urquiaga S & Reis VM. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, 302: 249-261
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR & Souza EM. 2003a. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedlings. *Symbiosis*, 35: 01–10
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR & Souza EM. 2003b. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol Ecol*, 45: 39–47
- Sharma VK & Novak J. 1998. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can J Microbiol*, 44: 528-536
- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ & Buchanan NA. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol*, 48: 360-369
- Wilhelm E, Arthofer W & Schafleitner R. 1997. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). En: Cassells AC (ed), *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands