

Informe final publicable de proyecto

Búsqueda de los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de plantas de caña de azúcar por la cepa *Kosakonia radicincitans* UYS010

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162195

Fecha de cierre de proyecto: 01/08/2024

TAULÉ GREGORIO, Cecilia Beatriz (Responsable Técnico - Científico)

ARMAND UGÓN, Virginia (Investigador)

BATTISTONI URRUTIA, Federico José (Investigador)

CALZADA RODRÍGUEZ, Enzo Nicolás (Investigador)

DE LOS SANTOS NÚÑEZ, María Cecilia (Investigador)

PLATERO LABRUCHERIE, Raúl Alberto (Investigador)

STOLL, Alexandra (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"

(Institución Proponente) \\ CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS EN ZONAS ÁRIDAS (CEAZA) \\

FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PCV) son una estrategia viable ambiental y económica para mejorar la sustentabilidad de la explotación de cultivos de importancia agronómica. Los endófitos bacterianos son aquellos que habitan los tejidos internos de las plantas, para los cuales está ampliamente demostrada su capacidad PCV. Sin embargo, poco se conoce de sus mecanismos de acción y las bases moleculares imperantes en la interacción endófito-planta. La cepa *Kosakonia radicincitans* UYS010 es un endófito diazótrofo de caña de azúcar, productora de ácido indol acético, y PCV de la variedad comercial LCP85384. El presente proyecto propone la búsqueda e identificación de posibles mecanismos PCV en la cepa UYS010 y determinar su posible rol en la interacción con plantas de caña de azúcar. Para esto se realizaron dos aproximaciones complementarias: i- la identificación de genes bacterianos expresados diferencialmente en distintas etapas de la interacción planta-bacteria mediante una aproximación transcriptómica, y ii- se profundizó en el rol de la síntesis de ácido indol acético y del volátil 2,3-butanodiol, dos mecanismos PCV identificados mediante transcriptómica en la interacción planta-bacteria. El conjunto de resultados obtenidos constituye un insumo relevante para el entendimiento de los mecanismos básicos imperantes en la interacción gramínea-bacteria PCV.

Ciencias Agrícolas / Agricultura, Silvicultura y Pesca / Agricultura / Microbiología de la interacción planta-bacteria

Palabras clave: endófito / *Kosakonia radicincitans* / mecanismo promotor del crecimiento vegetal /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Plantas y microorganismos han co-evolucionado formando distintos tipos de interacciones, incluyendo sinérgicas, antagónicas o neutras (Lagunas et al. 2015). Desde el punto de vista de las plantas una interacción sinérgica puede mejorar su crecimiento, mientras que una relación deletérea significa una disminución en el crecimiento de la planta y el posible desarrollo de una enfermedad. Entre las interacciones sinérgicas más estudiadas y mejores entendidas se encuentran la simbiosis rizobio-leguminosa y la que incluye los hongos micorrícicos (Oldroyd 2013). Las bacterias que interactúan con las plantas se clasifican según su ubicación, en bacterias en vida libre, epifíticas (habitan el rizoplano o filoplano), o endófitas que habitan en el interior de la planta. El término endófito se refiere a microorganismos que durante parte o todo su ciclo de vida invaden los tejidos internos de plantas vivas causando una infección que no provoca síntomas de enfermedad (Wilson 1995). A diferencia de los rizobios, no viven dentro de las células vivas y no inducen la formación de una estructura vegetal diferenciada (Malfanova et al. 2013). El hábitat endofítico constituye un ambiente protegido en comparación con el suelo o la rizósfera (Carvalho et al. 2014). En ese sentido, las bacterias encuentran en él una fuente de nutrientes, baja competencia y protección frente al estrés ambiental, asegurándose su dispersión por transferencia pasiva (Mercado-Blanco 2015). La vida dentro de los tejidos les permite a estas bacterias transferir de manera más directa los efectos beneficiosos, que en las interacciones rizosféricas (Carvalho et al. 2014).

Las bacterias endófitas son de gran interés por su potencial aplicación biotecnológica en los sistemas agrícolas (Mercado-Blanco 2015). Dentro de los beneficios potencialmente explotables, se encuentra el biocontrol de fitopatógenos o la promoción del crecimiento vegetal (PCV) (Mercado-Blanco 2015), resultando una excelente alternativa al empleo de fertilización química, la cual constituye uno de los principales gastos de producción. Además aproximadamente el 50% del fertilizante aplicado se pierde del sistema mediante emisiones gaseosas, lixiviación y escurrimiento, contaminando el agua superficial y la napa freática

(Garabet et al. 1998). Por lo tanto, son una opción de producción sustentable económica y ambientalmente. La capacidad PCV de un gran número de bacterias endófitas está ampliamente demostrada, sin embargo sus mecanismos de acción pueden ser muy diversos y en la mayoría de los casos desconocidos (Mercado-Blanco 2015). Los mecanismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) reportados pueden clasificarse en directos o indirectos. Entre los directos se encuentran: 1-la producción de fitohormonas (ej.auxinas como el ácido indol acético, giberelinas y citoquininas), o enzimas que regulan sus niveles en la planta (ej.ACC desaminasa); 2-la fijación biológica del nitrógeno (FBN); 3-el incremento en la biodisponibilidad de minerales (ej.P,K,Fe); 4-la producción de sustancias fenólicas estimulantes de la germinación, emergencia y establecimiento de la plántula. Entre los mecanismos indirectos se incluye: 1-el control biológico de fitopatógenos mediante i-la inducción de los mecanismos de defensa de la planta (ej.mediante la producción de compuestos volátiles como acetoina/butanodiol), ii-la producción de sustancias antagónicas, iii-la competencia por el hábitat o sus nutrientes; 2-el favorecer la tolerancia a estreses abióticos (Compant et al. 2019). Es importante destacar que la PCV por bacterias depende de la especificidad de la interacción planta-bacteria, en donde influye el genotipo de la planta, el tipo de suelo, así como las condiciones agroclimáticas (de los Santos et al. 2015; Taule? et al. 2018; Compant et al. 2019; Hartmann et al. 2019; Taulé et al. 2019). Esto resalta el hecho importante de realizar los estudios para cada interacción bacteria-planta-ambiente.

La interacción de las bacterias con las plantas constituye un proceso dinámico que depende de un ambiente adecuado y de factores genéticos. Las bacterias endófitas son bacterias del suelo, del filoplano, o que están presentes en las semillas o material de propagación vegetativa, las cuales colonizan el interior de los tejidos de las plantas (Compant et al. 2019). Los mecanismos de acercamiento espacial pueden ser pasivos (bacterias presentes en la semilla o en la yema vegetativa), o activos a través del movimiento por atracción quimiotáctica hacia la superficie radicular (Kandel et al. 2017).

Para las plantas, los exudados radiculares representan un componente importante en la comunicación con los microorganismos de la rizósfera. En los mismos se encuentran sustancias ricas en carbono y energía y moléculas señales (Haichar et al. 2014). Asimismo, las plantas pueden modificar sus exudados dependiendo de su estado fisiológico y de la microbiota asociada (Lareen et al. 2016). De esta forma reconocen y responden específicamente a microorganismos benéficos o patógenos presentes, iniciando la comunicación mediante la producción de señales que pueden modular su colonización (Haichar et al. 2014; Lareen et al. 2016). A continuación, comienza la interacción entre la bacteria y la pared celular vegetal. En esta etapa se involucran estructuras bacterianas para la adhesión a la superficie como fimbrias, pilis, lipopolisacáridos, exopolisacáridos y proteínas de membrana externa como porinas (Pinski et al. 2019). El ingreso a los tejidos de la planta normalmente es pasivo y se realiza a través de las aperturas naturales como el área de emergencia de las raíces laterales y la cofia (Kandel et al. 2017). También se han descrito procesos activos con la participación de enzimas endoglucanasas y pectinolíticas (Kandel et al. 2017; Pinski et al. 2019). Una vez dentro de la planta, las bacterias endófitas pueden permanecer en un tejido específico colonizando los espacios intercelulares o colonizar la planta sistémicamente, transportándose por los tejidos vasculares (Kandel et al. 2017). Si bien se conocen las distintas etapas en la colonización e interacción planta-endófito, aún no se conocen las bases moleculares. El tener un mejor entendimiento de estas permitirá predecir y manipular el éxito de determinada interacción planta-endófito. La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de características puntuales de la interacción, permitiendo conocer varios factores bacterianos involucrados en las distintas etapas (Pinski et al. 2019). Sin embargo, estas aproximaciones no permiten comprender la naturaleza compleja y multifactorial de la interacción. Estudios recientes analizan desde un punto de vista más amplio la naturaleza de dicha interacción (Pinski et al. 2019). En su mayoría buscan comprender como las plantas censan las señales de los endófitos y cuando los reconocen como benéficos, permitiendo el establecimiento de la interacción (Carvalho et al. 2016).

Entender el proceso de señalización entre planta y bacteria, y la regulación de la colonización, tendrá

implicancias en el diseño de nuevas estrategias para promover las interacciones benéficas (Carvalho et al. 2016). En ese sentido, es importante conocer que mecanismos PCV activa la bacteria y en que etapas, su rol en la interacción, así como su variación en distintas condiciones bióticas y abióticas.

Antecedentes específicos

Previamente se demostró que variedades de caña de azúcar cultivadas en Uruguay son capaces de obtener cantidades significativas de N mediante la FBN (Taulé et al. 2012). A partir de dichas variedades, se construyó y caracterizó una colección de BPCV asociadas (Taulé et al. 2012). Mediante ensayos in vitro y de invernáculo se demostró que la cepa *Kosakonia radicincitans* UYSO10 es PCV de plantas micropropagadas y de esquejes de caña de azúcar (de los Santos et al. 2015; Taulé et al. 2016) y que esta capacidad es afectada por el agregado de fertilizantes químicos nitrogenados (Taulé et al. 2019). Empleando una aproximación microscópica y de biología molecular, se demostró que la cepa UYSO10 es un endófito verdadero, describiéndose el proceso de infección y colonización de plantas de caña de azúcar (Taulé et al. 2016). Estos resultados determinaron la elección de la cepa UYSO10 como modelo de estudio, secuenciándose su genoma e identificándose a nivel de especie (Beracochea et al. 2019). A partir de éstos análisis se identificó la presencia de dos clusters codificantes para enzimas nitrogenasas: la clásica MoFe-nitrogenasa y la “alternativa” FeFe-nitrogenasa (Taulé et al. 2019). Mutantes puntuales en uno de los genes estructurales para cada una (*nifH* y *anfH* respectivamente), fueron construidas y caracterizadas. Los resultados mostraron que ambas nitrogenasas son funcionales y necesarias para la PCV del cultivar LCP de caña de azúcar (Taulé et al. 2019).

Por otro lado, con la finalidad de conocer las bases moleculares implicadas en distintas etapas de la interacción, se analizó el proteoma de la cepa UYSO10 en presencia de exudados radiculares y en co-cultivo con plantas de caña (Taulé et al en preparación). Los resultados mostraron que en ambas condiciones la cepa UYSO10 adapta su proteoma con la finalidad de transportar y metabolizar diferentes nutrientes y de interactuar con la planta hospedera. Particularmente se identificaron proteínas relacionadas al censo de diferentes estímulos ambientales, la interacción y la PCV (ej. nitrogenasas y vía de producción de acetoina y 2,3-butanodiol (Taulé et al en preparación).

El presente proyecto tuvo como objetivo general identificar mecanismos promotores del crecimiento vegetal en la cepa *Kosakonia radicincitans* UYSO10 y determinar su posible rol en la interacción con plantas de caña de azúcar. Para ello, se plantearon los objetivos específicos: i- identificar genes bacterianos expresados diferencialmente en diferentes etapas de la interacción entre la cepa *Kosakonia radicincitans* UYSO10 y plantas de caña de azúcar, y ii-determinar el rol de potenciales MPCV de la cepa *Kosakonia radicincitans* UYSO10, en la interacción con plantas, focalizándose en la PCV.

Metodología/Diseño del estudio

En el presente proyecto se profundizó en la caracterización de la interacción entre la cepa UYSO10-plantas de caña. Para ello se buscaron e identificaron genes bacterianos involucrados en la interacción, evaluando posteriormente su rol en la interacción planta-bacteria. En ese sentido la estrategia incluyó 2 aproximaciones: I- mediante un abordaje transcriptómico se identificaron genes expresados diferencialmente en diferentes etapas de la interacción con plantas de caña de azúcar, y II- se profundizó en el entendimiento del rol de MPCV identificados mediante la aproximación transcriptómica, mediante la construcción y caracterización de cepas mutantes en genes candidatos.

Análisis de la respuesta transcripcional de la cepa UYSO10 en diferentes etapas de la interacción con

plantas de caña de azúcar.

Se realizaron y analizaron 2 ensayos utilizando la metodología de RNAseq. En el primero de ellos, se buscó conocer los primeros cambios ocurridos en dos ambientes que coloniza la bacteria: la rizósfera y la endósfera. Los tratamientos fueron la cepa UYS010 creciendo en medio de cultivo con el agregado de i- exudados radiculares, ii- con apoplasto y iii- un tratamiento control. Los tratamientos se incubaron durante 2 h con agitación. En el segundo ensayo se buscó avanzar en la respuesta bacteriana en la rizósfera, en este caso permitiendo la comunicación entre la planta y bacteria. Los tratamientos fueron la cepa UYS010 creciendo en i- presencia de exudados radiculares y ii- en co-cultivo con plantas de caña de azúcar micropropagadas. Este ensayo difiere del anterior en que los tratamientos se incubaron en quietud (sin agitación) durante 48 h. Se realizaron triplicados biológicos.

Para ambos ensayos se cosecharon las células bacterianas por centrifugación y se extrajo el ARN utilizando el Kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La construcción de librerías y posterior secuenciación de las muestras se realizó a través del servicio de Novogene. La secuenciación se realizó en el secuenciador NovaSeq PE150. En una primera instancia, la calidad de las lecturas de cada transcriptoma fue evaluada con el programa FastQC [v.0.11.9]. Luego, los datos brutos fueron procesados para eliminar artefactos de secuenciación utilizando el software trim_Galore [versión 0.6.10]. Finalmente, el software trimmomatic [versión 0.39] fue utilizado para la remoción de adaptadores. En primera instancia se analizó la composición bacteriana de los reads utilizando el programa metaphan4. Seguidamente las lecturas fueron mapeadas contra el genoma de la cepa UYS010 utilizando el software HISAT2 (V2.2.1). Por último, el ensamblado de los transcritos y el cálculo de sus respectivas abundancias fue realizado usando el software Stringtie (V2.1.2). La identificación de los genes diferenciales se realizó utilizando el software EdgeR con un pvalor de 0,05 y una tasa de cambio de logFC?2 para el Ensayo 1 (exudado y apoplasto) y logFC?1 para el Ensayo 2 (co-cultivo y exudados).

Posteriormente, con el objetivo de validar los resultados obtenidos, se seleccionaron 10 transcritos que mostraron variación entre los tratamientos, los cuales fueron cuantificados mediante qRT-PCR (Fang and Cui 2011). Para ello, se realizó la transcripción inversa del ARN aislado anteriormente con el kit comercial SensiFAST™ cDNA Synthesis (Meridian, Bioscience). Para cada gen seleccionado se diseñaron cebadores específicos, se evaluó su eficiencia y se analizó su expresión utilizando genes de referencia. Los niveles relativos de los ARN mensajeros serán calculados utilizando el método comparativo del Ct.

Estudio del rol de MPCV identificados por transcriptómica

A partir de los ensayos transcriptómicos se seleccionaron genes expresados diferencialmente que están involucrados en los MPCV de síntesis del ácido indol acético y de la síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol. A continuación, se buscó construir las cepas mutantes por eliminación completa del marco de lectura de las siguientes genes que codifican para enzimas clave: de la vía de síntesis de acetoina el gen UYS010_5109 (AldC) y de 2,3-butanodiol los genes UYOS10_5107 (BDH) y UYS010_3614 (BDH), así como de la síntesis de AIA el gen UYS010_4406 (ipdC). Para ello se construyeron mutantes por eliminación completa del marco de lectura abierto en los genes seleccionados empleando la metodología aplicada con éxito previamente en la cepa UYS010 (Taulé et al. 2019). La metodología utiliza el mecanismo de recombinación y reparación del ADN para eliminar el fragmento de ADN deseado de manera limpia. El procedimiento constó de los siguientes pasos: i- clonación de la región de interés (colindante del gen) en el plásmido suicida (pEMG), ii- co- integración en el genoma de la cepa UYS010 del plásmido construido, y iii- transformación de la construcción anterior con el plásmido pSW-2 e inducción de la nucleasa I-SceI presente en el pSW-2. Utilizando esta metodología existe un 50 % de probabilidad de obtener la cepa recombinante (mutante) y un 50 % de regreso al estado salvaje. La correcta construcción de cada paso se verificó mediante la adquisición o pérdida de resistencia a los antibióticos de selección y mediante PCR (Martínez-García and de Lorenzo 2012).

A continuación, se caracterizaron las cepas mutantes obtenidas in vitro mediante evaluación de: 1- la capacidad de crecer en medio de cultivo rico LB mediante la realización de curvas de crecimiento en microplacas de 96 pocillos utilizando un espectrofotómetro de placa Varioskan Flash (ThermoScientific), y 2- la determinación de la producción del metabolito final o algún intermediario en la vía de síntesis del MPCV identificado y seleccionado, dependiendo del tipo de mecanismo.

Luego se evaluó la respuesta de plantas a la inoculación con las cepas mutantes obtenidas. Como el ensayo de respuesta de caña de azúcar a la inoculación dura entre 4 y 5 meses, se eligió *Arabidopsis thaliana* para realizar los estudios de respuesta a la inoculación in vivo en un menor tiempo. Los tratamientos evaluados fueron: i- plántulas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con la cepa UYS010, ii- plántulas inoculadas con cada una de las cepas mutantes y iii- plántulas sin inocular. Para esto, se germinaron semillas de *Arabidopsis* en almácigueras conteniendo una mezcla de turba:arena estériles 1:1. Una vez germinadas las semillas, se dejó una plántula por pocillo y se realizó la inoculación con 1×10^7 células por planta, según el tratamiento. Al mes posterior a la inoculación, se evaluaron las variables biométricas: número de hojas, diámetro de la roseta y peso fresco y seco de la parte aérea. El diseño experimental fue completamente al azar, con 10 réplicas por tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Infostat v2017. Se realizó un análisis de varianzas y en los casos en que se identificaron diferencias significativas con un p valor ≤ 0.05 , se aplicó el test de Tukey para comparación de las medias.

Resultados, análisis y discusión

Análisis transcripcional de la respuesta de la cepa UYS010 en distintas etapas de la interacción con plantas de caña de azúcar

Para alcanzar este objetivo se realizaron y analizaron 2 ensayos utilizando la metodología de RNAseq. En el primero de ellos (Ensayo 1), se buscó conocer los primeros cambios ocurridos en dos ambientes que coloniza la bacteria: la rizósfera y la endósfera. En este ensayo los tratamientos fueron la cepa creciendo en medio de cultivo con el agregado de i- exudados radiculares, ii- apoplasto y iii- un tratamiento control. Las muestras fueron incubadas durante 2 h con agitación. En el segundo ensayo (Ensayo 2) se buscó avanzar en la respuesta bacteriana en la rizósfera, en este caso permitiendo la comunicación entre la planta y bacteria. En este caso los tratamientos fueron la cepa UYS010 creciendo en i- co-cultivo con plantas de caña de azúcar y ii- en presencia de exudados radiculares. A diferencia del ensayo anterior, las muestras se incubaron durante 48h en quietud.

Análisis del Ensayo 1: respuesta de la cepa UYS010 a exudados radiculares y apoplasto

A partir de la secuenciación se obtuvieron entre 13.3 y 18.9 Mpb sin filtrar, de los cuales más del 99% fueron lecturas de alta calidad que mapearon en más de un 99% con el genoma de la cepa UYS010 (Anexo Figura 1). Utilizando los criterios de $\log_2 FC \geq 2$ y p-valor < 0.05 , se identificaron 212 genes con expresión diferencial entre las condiciones E y C, así como 343 genes con expresión diferencial entre A y C. A su vez, el patrón de genes con expresión diferencial entre las condiciones versus el control fue diferente (Anexo Figura 1).

Para facilitar el análisis de los DEGs se realizó un análisis de clustering basado en mapas autoorganizados (Self-Organizing Maps, SOM). Basado en el perfil de expresión de los DGE, 6 clusters (nodos) fueron identificados (Anexo Figura 2). Para estudiar la composición funcional de los genes agrupados por nodo, dos software fueron utilizados. Las proteínas obtenidas a partir del genoma de referencia fueron anotadas utilizando el software InterProScan [versión 5.66-98.0] posteriormente, por cada nodo, los DGE con códigos Gene Ontology (GO) fueron clasificados respecto a sus funciones biológicas utilizando el software Goatools [versión 1.3.11]. Dicho software, además fue utilizado para evaluar enriquecimiento funcional de cada nodo respecto al genoma de referencia. A partir de las funciones identificadas en cada nodo (códigos GO),

diagramas de Venn fueron realizados. Los resultados revelaron la presencia de categorías funcionales únicas dentro de cada nodo. De modo general, la exposición de la cepa UYS010 a exudados radiculares/apoplasto mostró grandes cambios en la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de nutrientes. En presencia de exudados radiculares, la cepa UYS010 aumentó la expresión de genes asociados a la PCV (síntesis de ácido indol acético), a la membrana celular y redujo la expresión de genes asociados a MAMPs (del inglés *microbe associated molecular patterns*). En presencia de apoplasto la cepa UYS010 aumentó la expresión de genes asociados a la PCV (sideróforos, acetoina y 2,3-butanodiol) y a la adherencia, reduciendo la expresión de genes asociados a la virulencia.

A partir de los resultados y con el fin de validar la técnica de RNAseq, se seleccionaron 10 genes que mostraron expresión diferencial para su análisis por RT-q-PCR. En todos los genes analizados se observó la misma tendencia de expresión, y en su mayoría se verificó mediante estadística (Anexo Figura 3).

Análisis del Ensayo 2: respuesta de la cepa UYS010 a exudados radiculares y al co-cultivo con plantas de caña de azúcar

En este ensayo se obtuvo un significativo número de lecturas que pasaron los controles de calidad, sin embargo, el % que mapeo con el genoma de la cepa UYS010 fue bajo, entre un 45-75 % (Anexo Figura 4). A partir de este resultado se decidió analizar la composición bacteriana de los reads utilizando el programa *metaphan4*. En la Figura 4 (Anexo) se muestran los resultados de abundancia relativa a nivel de género, donde se observa que la mayoría de las secuencias mapean con 3 géneros bacterianos: *Kosakonia*, *Bacillus* y *Acinetobacter*. A partir de estos resultados, podemos concluir que las plantas micropropagadas no se encontraban libres de microorganismos.

A continuación, se realizó un análisis de componentes principales donde se observa una gran dispersión de las muestras (Anexo Figura 5). Sin embargo, al analizar la expresión diferencial de los genes se pudieron identificar 25 genes sobre-expresados y 25 reprimidos en la condición de co-cultivo con plantas micropropagadas (P) en comparación con la condición de exudados radiculares (SP) (Anexo Figura 5). La cepa UYS010 creciendo en co-cultivo con plantas de caña de azúcar sobre-expresó genes asociados al metabolismo de C (uso de sacarosa y lactato) y a la PCV (fijación biológica del N) y reprimió genes asociados a la asimilación de amonio (transportadores) y varios transportadores de membrana.

Estudio de los MPCV: síntesis de ácido indol acético y de la síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol en la cepa UYS010

En la aproximación anterior se observaron genes involucrados en las vías de síntesis de ácido indol acético, y acetoina y 2,3-butanodiol regulados al alza en presencia de exudados radiculares y/o apoplasto. Esta regulación fue verificada mediante cuantificación por RT-q-PCR (Anexo Figura 6 y 7). Por lo tanto, a partir de estos resultados se buscó construir las cepas mutantes en los genes codificantes para las enzimas involucradas en la síntesis de AIA: indol-piruvato descarboxilasa (*ipdC*: UYS010_3614), y en la síntesis de acetoina: (*aldC*: UYS010_5109) y 2,3-butanodiol: (*R-BDH*: UYS010_5107 y *S-BDH*: UYS010_4406). De esta forma se lograron construir las mutantes por delección del gen *ipdC* la cepa UYS010 ?3614, y por delección de los genes *R-BDH* y *S-BDH*, las cepas UYS010 ?5107 y UYS010 ?4406

Caracterización de la cepa mutante UYS010 ?3614

Se obtuvieron cepas mutantes por eliminación del gen UYS010_3614 (*ipdC*), las cuales fueron nombradas UYS010 ?*ipdC*1 y UYS010 ?*ipdC*2. Con el fin de evaluar si las mutaciones realizadas afectaron la capacidad de crecimiento de las cepas mutadas, se evaluó el crecimiento de las mismas así como la de la cepa parental en medio de cultivo rico LB. Los resultados mostraron que no existen diferencias en el crecimiento entre las cepas mutadas y la parental en las condiciones ensayadas (Anexo Figura 8). Posteriormente, se

verificó la capacidad de sintetizar ácido indol acético mediante la reacción de Salkowski que cuantifica índoles totales. Los resultados mostraron que ambas cepas mutantes presentan un aumento en la cantidad de índoles cuantificados. Debido a que este ensayo cuantifica índoles totales y no específicamente ácido indol acético, se decidió utilizar la técnica de HPLC-MS para identificar la presencia de AIA en la cepa UYS010 y en la mutante. Los resultados mostraron y verificaron que ambas cepas producen AIA en valores comparables, resultado que por un lado es novedoso ya que la caracterización de la cepa UYS010 como productora de AIA había sido realizada anteriormente por el ensayo de Salkowski (Taulé-Mareque et al 2012). En la literatura se han reportado varias vías para la síntesis de AIA a partir de triptófano, sin embargo la mayoría de las enzimas involucradas en los diferentes pasos no han sido identificadas o se trata de enzimas que se han postulado con funciones no específicas (Duca et al. 2014). En la cepa UYS010 se identificó a nivel genómico el gen *ipdC*, sugiriendo que la cepa puede sintetizar AIA al menos a partir de la ruta del indol-3-piruvato. Como se mencionó anteriormente en este proyecto, se demostró que el gen *ipdC* se encuentra sobre-expresado en presencia de exudados, sugiriendo un aumento en la síntesis de AIA por la ruta del indol-3-piruvato. Curiosamente a partir de la técnica de HPLC-MS se identificaron potencialmente por su masa los intermediarios de varias vías reportadas en la síntesis de AIA: indol-3-acetamida, triptamina, indol-3-piruvato e indol-3-acetaldehído (Anexo Figura 8). Si bien para verificar su identidad se requiere el uso de estándares para todas esas moléculas, estos resultados sugieren que la cepa UYS010 presenta más de una vía de síntesis de AIA. Y posiblemente los valores similares de AIA obtenidos se deban a que en la cepa mutante sintetiza y complementa los valores de AIA a partir de otra vía. Los resultados que sostienen esa observación son: i- por un lado el aumento en la concentración de la cepa mutante de la triptamina, un intermediario de otra vía de síntesis de AIA, y ii- el aumento en la cuantificación de la molécula indol-3-piruvato en la cepa mutante, la cual es el reactivo de la enzima *ipdC* y la detección del producto de la enzima indol-3-acetaldehído únicamente en la cepa UYS010 (Anexo Figura 8).

A continuación, con el fin de evaluar in vivo si la eliminación del gen *ipdC* tiene un efecto en el fenotipo de las plantas, se evaluó la respuesta de plantas de *Arabidopsis thaliana* a la inoculación con la cepa UYS010 y la cepa UYS010 Δ *ipdC*. Los resultados mostraron que la inoculación con ambas cepas promueve el crecimiento de las plantas, sin embargo no se observaron diferencias entre los tratamientos inoculados (Anexo Figura 9).

Caracterización de las cepas mutantes en los genes UYS010_5107 y UYS010_4406

Se obtuvieron cepas mutantes por eliminación de los genes UYS010_5107 (R-BDH) y UYS010_4406 (S-BDH), las cuales fueron nombradas UYS010 Δ R-BDH y UYS010 Δ S-BDH respectivamente. Primero se confirmó que las mutaciones realizadas no afectaron la capacidad de crecimiento de las cepas mutadas (Anexo Figura 10). Actualmente se está trabajando en la construcción de una cepa doble mutante en ambos genes BDH, de forma de obtener una cepa mutada en su capacidad de producir 2,3-butanodiol, y en una cepa mutante en el gen responsable de la síntesis de acetoína (*aldC*: UYS010_5109). De todas formas, se decidió evaluar in vivo la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la inoculación con las cepas mutantes construidas. Los resultados mostraron que la inoculación con UYS010, así como con UYS010 Δ R-BDH y UYS010 Δ S-BDH promueve el crecimiento de las plantas, sin embargo no se observaron diferencias entre los tratamientos inoculados (Anexo Figura 10).

Conclusiones y recomendaciones

El presente proyecto profundizó en la caracterización de la interacción entre la cepa UYS010-plantas de

caña. Para ello se planteó buscar e identificar genes bacterianos involucrados en la interacción, evaluando posteriormente su rol en la interacción planta-bacteria. Es importante resaltar que en el presente proyecto se trabajó con una cepa perteneciente al género *Kosakonia*, el cual ha sido descrito recientemente y presenta varias cepas reportadas con características PCV demostrada. En particular el modelo de estudio, la cepa *Kosakonia radicincitans* UYS010 fue aislada de tallos de caña de azúcar cultivados en nuestro país. El proyecto permitió consolidar a esta bacteria como un modelo de estudio, con características únicas que la hacen muy interesante de seguir estudiando.

A partir de los estudios de RNAseq, se obtuvieron listas y niveles de expresión del transcriptoma de la cepa UYS010 crecida en distintas etapas de la interacción con la planta (colonización rizosférica y endoférica). Las listas de genes expresados diferencialmente entre las condiciones mencionadas, mostraron vías metabólicas y de señalización activadas o reprimidas en las distintas etapas de la interacción. En particular se identificó la expresión de los MPCV: fijación biológica del N, síntesis de ácido indol acético y síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol y que su expresión ocurre en distintas etapas de la interacción.

Durante el proyecto se construyeron cepas mutantes en los genes *ipdC* (gen UYS010_4406) y *BDH* (gen UYS010_3614 y UYS010_5107). Las mismas fueron caracterizadas *in vitro* e *in vivo*. Durante la caracterización de la cepa UYS010 Δ *ipdC*, se verificó la síntesis de ácido indol acético por la cepa UYS010 y a su vez los resultados sugieren que la cepa posee al menos otra vía de síntesis de AIA. Por otro lado, no se observó un fenotipo diferencial al inocular las cepas mutantes en plantas de *Arabidopsis thaliana*, en comparación con las plantas inoculadas con la cepa UYS010.

Mediante las actividades desarrolladas, fue posible cumplir con todos los objetivos planteados. Es importante destacar que las construcciones realizadas a partir de este proyecto serán herramientas fundamentales para en un futuro poder profundizar en la caracterización de la interacción planta-endófito en diferentes condiciones bióticas y abióticas.

Finalmente hay que destacar que durante el proyecto se estableció una colaboración fluida entre varios grupos de investigación, los cuales se nutrieron recíprocamente, mediante la puesta a punto de técnicas y la interpretación de los resultados. Si bien por motivos de la pandemia, se atrasó la ejecución del proyecto así como la posibilidad de contar con los recursos humanos que se plantearon originalmente en la propuesta, el proyecto se encuentra aún en ejecución no formal. Se está finalizando la escritura de una publicación científica que incluye los sets de datos obtenidos a partir de los ensayos transcriptómicos y su validación.

Referencias bibliográficas

- Beracochea M, Taulé C, Battistoni F (2019) Draft Genome Sequence of *Kosakonia radicincitans* UYS010, an Endophytic Plant Growth-Promoting Bacterium of Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Microbiol Resour Announc* 8:e01000-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01000-19>
- Carvalho TLG, Ballesteros HGF, Thiebaut F, et al (2016) Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. *Plant Mol Biol* 90:561–574. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0435-1>
- Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, et al (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J Exp Bot* 65:5631–5642. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>
- Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res* 19:29–37
- de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, et al (2015) Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Ann Microbiol* 66:329–342. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1113-2>
- Duca D, Lorv J, Patten CL, et al (2014) Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Fang Z, Cui X (2011) Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Brief Bioinform* 12:280–287. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr004>
- Garabet S, Ryan J, Wood M (1998) Nitrogen and water effects on wheat yield in a Mediterranean-type climate. II. Fertilizer-use efficiency with labeled nitrogen. *Crop Res* 58:213–221
- Haichar F el Z, Santaella C, Heulin T, Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Hartmann A, Fischer D, Kinzel L, et al (2019) Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges – A review. *J Adv Res* 19:3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.007>
- Kandel S, Joubert P, Doty S (2017) Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms* 5:77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
- Lagunas B, Schäfer P, Gifford ML (2015) Housing helpful invaders: The evolutionary and molecular architecture underlying plant root–mutualist microbe interactions. *J Exp Bot* 66:2177–2186. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv038>
- Lareen A, Burton F, Schäfer P (2016) Plant root–microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* 90:575–587. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0417-8>
- Malfanova N, Lugtenberg B, Berg G (2013) Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there? In: de Bruijn FJ (ed) *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. John Wiley and Sons, pp 391–403
- Martínez-García E, de Lorenzo V (2012) Transposon-based and plasmid-based genetic tools for editing genomes of Gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol* 813:267–283
- Mercado-Blanco J (2015) Life of microbes inside the plant. In: Lugtenberg B (ed) *Principles of Plant–Microbe Interactions*. Microbes for sustainable agriculture. Springer, pp 25–32
- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11:252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Pinski A, Betekhtin A, Hupert-Kocurek K, et al (2019) Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20081947>
- Taule? C, Beracoche M, Mareque C, et al (2018) Estudio de la interacción entre bacterias endófitas nativas

promotoras del crecimiento vegetal y variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en Uruguay. SERIE FPTA_INIA_85. SERIE FPTA_INIA_85

Taulé C, Castillo A, Villar S, et al (2016) Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by two novel diazotrophs bacteria, *Shinella* sp. UYS024 and *Enterobacter* sp. UYS010. *Plant Soil* 403:403–418. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2813-5>

Taulé C, Luizzi H, Beracochea M, et al (2019) The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYS010 are necessary for growth promotion of sugarcane. *Ann Microbiol* 69:741–750

Taulé C, Mareque C, Barlocco C, et al (2012) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356:35–49

Wilson D (1995) The Evolution of a Term, and Clarification of its Use and Definition. *Oikos* 73:274–276

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)