

# Informe final publicable de proyecto ?Hacia el desarrollo de un bioinoculante para variedades comerciales de sorgo dulce (Sorghum bicolor) basado en bacterias endófitas-diazótrofas nativas?

Código de proyecto ANII: FMV\_1\_2017\_1\_135629

02/09/2021

**BATTISTONI URRUTIA, Federico José** (Responsable Técnico - Científico)

**LANZA, Matilde** (Investigador)

**TAULÉ GREGORIO, Cecilia Beatriz** (Investigador)

**VAZ JAURI, Patricia** (Investigador)

**HEIJO DAVINO, Gabriela** (Investigador)

**MAREQUE, Cintia** (Investigador)

**PLATERO LABRUCHERIE, Raúl Alberto** (Investigador)

---

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"  
(Institución Proponente) \\ ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE COMBUSTIBLES, ALCOHOL Y PÓRTLAND \\  
FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE \\ LAGE Y CIA S.A.

## Resumen del proyecto

La microbiota o conjunto de microorganismos asociada a las plantas, aloja una gran diversidad bacteriana que provee funciones y características específicas, influenciando su fenotipo. Dicho fenotipo es afectado por el genotipo de la planta, factores bióticos y abióticos, así como las prácticas agrícolas de manejo. Uno de los componentes de la microbiota son los endófitos bacterianos, los cuales invaden los tejidos internos de la planta sin causar daño aparente y ampliamente reportados como promotores del crecimiento vegetal (PCV) de diversas plantas, mediante mecanismos como la bioestimulación o biodisponibilización de nutrientes esenciales. El sorgo dulce es un cultivo multipropósito utilizado en Uruguay como materia prima, el cual depende para su óptimo crecimiento, de grandes cantidades de fertilizante químico nitrogenado, provocando graves problemas de sustentabilidad económica y ambiental. Con la idea de aportar a la sustentabilidad productiva de este cultivo mediante el empleo de bacterias endófitas PCV; el objetivo del presente proyecto fue determinar si los probables endófitos bacterianos asociados a plantas de sorgo dulce, tienen un papel significativo en la PCV, así como en la disminución de la fertilización química nitrogenada. Los resultados mostraron que existe una gran diversidad de endófitos-bacterianos asociados a las plantas de sorgo dulce cultivadas en Uruguay, las cuales poseen diferentes características PCV siendo muchas de ellas diazótrofes (biodisponibilizadoras de N). Diferentes aislamientos fueron PCV específicas, de las variedades evaluadas en ensayos de inoculación solas o en combinación con fertilización química a bajos niveles, lo que mostraría que se podría bajar la dosis de fertilización química aplicada. Se demostró que la inoculación bacteriana tiene efectos específicos sobre la microbiota asociada a la planta y que el inóculo se mantiene a mes de aplicarse. En su conjunto los resultados obtenidos son insumos fundamentales para el desarrollo final de un inoculante basado en bacterias endófitas PCV.

**Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Microbiología, Interacción planta-bacteria**

**Palabras clave: sorgo dulce / endófitos promotores del crecimiento / bioinoculante /**

## Introducción

I-El sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) como materia prima

El interés en la producción y uso de energías alternativas a los combustibles fósiles, ha ido mundialmente en aumento impulsando fuertemente la producción de biocombustibles (biogás, bioetanol y biodiesel), los cuales se obtienen de forma renovable a partir de materias primas de origen vegetal. Particularmente el bioetanol, se produce mediante la fermentación de los azúcares que se encuentran en los cultivos energéticos como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), el maíz (*Zea mays*), el trigo (*Triticum spp.*) y la cebada (*Hordeum vulgare*), cultivados ampliamente en zonas tropicales, subtropicales y templadas(1–4).

Nuestro país está llevando a cabo una política estratégica fuertemente dirigida a la diversificación de la matriz energética, la cual incluye la promoción de la producción de biocombustibles. En ese sentido se implementaron una serie de proyectos incluyendo el “sucroalcoholero” impulsado por la empresa ANCAP a través de la empresa ALUR S.A., quien desarrolló un complejo agroindustrial en la zona norte del país. El principal cultivo empleado como materia prima en este complejo es el de la caña de azúcar, sin embargo el mismo presenta limitaciones agroclimáticas para su óptimo crecimiento en esta región(5). Es en este contexto en el cual surge el cultivo de sorgo dulce como una excelente alternativa complementaria al suministro de materias prima para la producción de bioetanol en el Uruguay. El mismo es utilizado actualmente en muchos países para tal fin, en forma aislada o complementaria a otros cultivos. Asimismo, su procesamiento es muy similar al de la caña, haciendo posible integrarlo a la industria cañera para la producción de bioetanol(6,7).

Este cultivo presenta características muy positivas para su uso como materia prima incluyendo: (i) su eficiencia de convertir la energía solar en biomasa vegetal, (ii) su resistencia a la sequía y heladas y (iii) sus altas concentraciones de azúcar directamente fermentables presentes en el tallo. Se lo define como un cultivo multipropósito dado que todos los componentes de la planta tienen valor económico. El grano se puede utilizar como alimento o ración, las hojas para forraje, el tallo (junto con el grano) para la producción de combustible y la fibra (celulosa) como abono, alimento para animales o como para la producción de biocombustibles de segunda generación(8). Asimismo, las condiciones agroclimáticas de nuestro país son óptimas para ser cultivado(9), en ese sentido entre los años 2012-2013, se sembraron 49.000 hectáreas a partir de las cuales se procesaron 209.000 toneladas (Anuario2014,MGAP).

Todas las características mencionadas resaltan al cultivo de sorgo dulce como una excelente fuente de materia prima para la producción de biocombustibles.

## II-Fertilización química y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

El uso de fertilizantes químicos para la mejora de la productividad de los cultivos, tiene efectos negativos asociados que afectan el complejo sistema de los ciclos biogeoquímicos(10, 11). Aproximadamente el 50% del fertilizante químico aplicado se pierde del sistema suelo-planta mediante emisiones gaseosas, lixiviación, erosión y escurrimiento, lo que lleva a una degradación de los ecosistemas, contribuyendo al efecto invernadero y contaminando con nitrato y fósforo el agua superficial y la napa freática(12).

Por otra parte y desde el punto de vista económico, la fertilización química es uno de los principales gastos de producción en la agricultura de países como el nuestro, los cuales importan gran porcentaje del mismo.

En su conjunto las problemáticas anteriormente expuestas reflejan la necesidad del desarrollo de alternativas de producción mas sustentables desde el punto de vista económico y ambiental, que reduzcan la dependencia de la fertilización química. En ese sentido, una excelente alternativa biotecnológica es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) en los sistemas productivos agrícolas.

Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés en el estudio de BPCV asociadas a diferentes cultivos agrónomicamente importantes como el arroz, el maíz, el trigo, la caña de azúcar y el sorgo, con especial interés en las bacterias capaces de fijar biológicamente el N<sub>2</sub>-atmosférico (diazótrofos)(13–16). En este sentido diferentes BPCV han sido aisladas de la rizósfera y de los tejidos internos de las plantas pertenecientes a la familia Poaceae con un alto potencial biotecnológico(17, 18).

La promoción del crecimiento vegetal por las bacterias puede lograrse directamente mediante: 1-la producción de fitohormonas (auxinas, giberlinas, citoquininas) o proteínas que regulan sus niveles en la planta como las desaminasas (ACC); 2-la fijación biológica del nitrógeno (FBN); 3-el incremento en la solubilización de minerales (ej. P,K,Fe); 4- la producción de sustancias fenólicas estimulantes de la germinación de semillas, la emergencia y el establecimiento de la plántula. Por otra parte, la promoción indirecta del crecimiento incluye: 1-el control biológico de fitopatógenos mediante la inducción de los mecanismos de defensa de la planta, la producción de sustancias antagónicas, la competencia por el nicho ecológico o sus nutrientes; 2- el favorecer la tolerancia a estreses abióticos(19, 20).

Es importante destacar que la promoción del crecimiento por las bacterias depende de la especificidad de la interacción planta-bacteria, en donde influye el genotipo de la planta, el tipo de suelo así como de las condiciones agroclimáticas(54,55,57). Esto resalta el hecho de lo importante de realizar los estudios para cada caso bacteria-planta particular.

## II-Bacteria endófitas promotoras del crecimiento vegetal (BEPCV)

Las bacterias endófitas colonizan activamente los tejidos internos de las plantas y establecen asociaciones sin causarle daño aparente a las mismas(13,19). La mismas habitan distintos compartimentos del apoplasto (espacios intercelulares, células del córtex, vasos del xilema); y órganos reproductivos (flores, frutas y semillas)(18, 21, 22).

En contraste con los sistemas endosimbióticos o patogénicos bien estudiados, poco se sabe de las bases moleculares de la interacción endófito-planta hospedera. Sin embargo, existe una amplia evidencia del efecto PCV que éstas confieren a plantas de interés agrónomico, siendo un campo de estudio en constante desarrollo(17,18,23).

Entre los cultivos de interés mundial en los que se han desarrollados estos estudios se encuentran el maíz, el trigo, la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y el sorgo dulce(17, 18). Como resultado de los mismos, han sido desarrolladas diversas aplicaciones biotecnológicas en estos modelos, destacándose en Brasil la formulación de un inoculante para la caña de azúcar, basado en un consorcio de 5 bacterias endófitas-diazótrofos(24).

Hasta la fecha, los géneros aislados como endófitos a partir de plantas de sorgo dulce e identificados, pertenecieron a los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes(17,25–27). Asimismo, se ha demostrado el efecto PCV sobre plantas de sorgo por bacterias diazótrofas endófitas tales como *Azospirillum liposferum*, *A. amazoniense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* en condiciones de invernáculo y de campo(19,28–32); destacándose los resultados de las cepas del género *Azospirillum* spp. que han llevado a su aplicación agrónomico como bioinoculante en varios países(33, 34).

En su conjunto los resultados demuestran claramente que la explotación de dicha interacción puede jugar un rol significativo en la sustentabilidad de los sistemas de producción agrícolas siendo muy promisorio el desarrollo de una biotecnología basada en BPCV. Asimismo cabe resaltar que particularmente en Uruguay, se dan las condiciones para que este tipo de tecnología sea desarrollada y transferida teniendo en cuenta la existencia de empresas nacionales dedicadas a la producción de bioinoculantes basados en BPCV.

En el presente proyecto se planteó como estrategia la evaluación de la capacidad PCV de un conjunto de aislamientos disponibles en el laboratorio en plantas de diferentes cultivares de sorgo dulce cultivadas en Uruguay, así como evaluar el efecto conjunto de la inoculación y de la fertilización química en dichas plantas. Para esto se caracterizaron genética y fisiológicamente aislamientos de la colección, los cuales fueron evaluados como inoculantes en diferentes condiciones. Por último, se estudió el efecto de su inoculación sobre el microbioma-bacteriano asociados a plantas de sorgo dulce. Como resultados se esperaba la identificación a nivel de género de aislamientos bacterianos seleccionados de acuerdo a sus características PCV detectadas *in silico*, así como la determinación de su efecto PCV en plantas de sorgo en diferentes sistemas. Asimismo se esperaba el poder determinar si la inoculación con una bacteria PCV, tenía el mismo efecto que aplicar menos fertilizante en conjunto con dicha inoculación sobre las plantas de sorgo dulce. Por último, se esperaba determinar la permanencia del inóculo en las plantas de sorgo dulce inoculada, y su efecto en el microbioma endofítico bacteriano.

### **Metodología/diseño del estudio**

La presente propuesta propuso determinar si un conjunto de probables endófitos-bacterianos aislados a partir de plantas de sorgo dulce, tienen un papel significativo en la PCV, así como en la disminución de la fertilización química nitrogenada aplicada al cultivo.

Esta se enmarca en una línea de investigación que tiene como objetivo el desarrollo de un inoculante basado en BPCV para el cultivo de sorgo dulce. La estrategia de investigación está focalizada en la selección a partir de ensayos de invernáculo, de la mejor combinación BPCV-dosis de fertilizante químico-plantas de sorgo, ya que de los mismos depende la PCV. Asimismo se esperaba obtener información, mediante técnicas de biología molecular, microbiológicas y bioquímicas, de si el mecanismo involucrado en la PCV observada es la FBN. Por otra parte, se esperaba determinar por técnicas de biología molecular, el efecto del inóculo sobre el microbioma endofítico bacteriano asociado a plantas de sorgo dulce y su permanencia en los tejidos internos. Esto permitirá estudiar la estabilidad de los inoculantes aplicados así como el efecto de los mismos en la comunidad endofítica total y diazotrofa. Se espera que el conjunto de los resultados indiquen si es posible utilizar bacterias PCV para potenciar el crecimiento de la variedad comercial de sorgo dulce M81E, disminuyendo la dosis de fertilizante químico empleado y por lo tanto los costos de producción de los cultivos.

### **Resultados, análisis y discusión**

Los cultivos han tenido un rol fundamental en el transcurso de la historia de la humanidad, posibilitando el desarrollo de la civilización tal como la conocemos en el presente. Sin duda, en ese sentido, las gramíneas (Poaceae) asumieron un papel protagónico que conservan hasta hoy en día, siendo la familia de plantas de mayor importancia económica mundial. En las últimas décadas, a partir del aumento exponencial de la población mundial, se incrementó la producción de muchos cultivos

pertenecientes a esta familia, como el maíz, trigo, arroz, cebada, caña de azúcar y sorgo dulce. Consecuentemente, aumentó también el uso de paquetes tecnológicos basados en la aplicación de fertilizantes químicos, para la optimización de la producción de dichos cultivos. Desafortunadamente, la aplicación excesiva de fertilizantes químicos ocasiona grandes efectos negativos sobre los ecosistemas, como son el empobrecimiento de los suelos, la eutrofización de los cuerpos de agua, la pérdida de diversidad y el aumento en la emisión de gases de efecto invernadero(102). Este panorama hace necesaria la búsqueda de alternativas al modelo agrícola actual que logren mitigar el impacto de las actividades antropogénicas sobre el medio ambiente. En este contexto, el uso de BEPCV, es considerado una excelente alternativa para el suministro nutricional de cultivos pertenecientes a la familia Poaceae(9,114).

#### **I- BACTERIAS DIAZÓTROFAS PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL DE VARIEDADES DE SORGO DULCE**

Dado que la eficacia de la bacteria para PCV depende de la especificidad de interacción con el huésped y de las condiciones físico-ambientales, es necesario emplear bacterias que estén adaptadas a las variedades y a las condiciones de plantación del cultivo específicas para cada lugar(14). El estudio *in vitro* de las características PCV de aislamientos bacterianos, combinados con experimentos de inoculación de plantas en diferentes condiciones, permite revelar el potencial uso biotecnológico de dichas bacterias como inoculantes.

En el caso del cultivo de sorgo dulce, diferentes estudios realizados en India, Brasil y Namibia reportaron colecciones de bacterias PCV asociadas al mismo(15,42,52,62). Particularmente en Brasil se ha reportado la capacidad PCV de plantas de sorgo dulce por las cepas *Azospirillum* sp., *H. seropedicae* e inoculantes combinados de *Burkholderia* sp. con *Herbaspirillum* sp., en condiciones de invernáculo y de campo (48,114). Por otra parte, estudios en Namibia reportaron que bacterias asociadas a sorgo dulce, fueron PCV *in vitro* y en invernáculo(67,68). En Uruguay, bacterias aisladas a partir de

plantas de sorgo dulce de la variedad M81E, capaces de PCV in vitro demostraron potencialidad de ser utilizados como inoculantes para este cultivo(98).

Como primera aproximación, se buscó simplificar el sistema lo máximo posible evaluando el efecto PCV de plantas de sorgo dulce, por parte de las cepas, bajo condiciones controladas del laboratorio. Una vez conocidos los efectos de la inoculación en condiciones in vitro, se pasó a un sistema más complejo en condiciones de invernáculo, donde el desempeño de las bacterias inoculadas se ve influenciado por la comunidad de microorganismos que habita el sustrato. Estos estudios sentaron las bases para futuros ensayos en sistemas más complejos, a nivel de campo.

A partir de los resultados de PCV en condiciones in vitro, se seleccionaron tres cepas para ser evaluadas en condiciones de invernáculo: *Kosakonia radicincitans* UYSB89, *Bacillus toyonensis* UYSB119 y *Kosakonia cowanii* UYSB139 en las variedades M81E y ADV2010. Los resultados mostraron que a los 4 meses pi, las cepas UYSB89, UYSB119 y UYSB139 fueron PCV de forma significativa en algunas de las variables biométricas evaluadas. En términos generales, el ensayo realizado en la variedad M81E mostró rendimientos más bajos que el realizado en la variedad ADV2010, inclusive para el control positivo. La diferencia en el efecto que la cepa tiene sobre las variedades puede deberse a que los distintos genotipos de las variedades determinan distintos tipos de interacción con la bacteria, siendo la interacción de la cepa UYSB139 con la variedad ADV2010 más benéfica que la interacción de la variedad M81E(32). Estudios previos han reportado el efecto PCV de cepas de *K. radicincitans* al ser inoculadas en diferentes cultivos de interés agronómico en condiciones de invernáculo y campo incluyendo: repollo, tomate, rabanito, pepino y caña de azúcar(16,17,53,129,149,154,155). Sin embargo, no se han encontrado reportes de cepas de *K. cowanii* que las describan como PCV. Particularmente en plantas sorgo dulce, se reportó el aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Kosakonia* a partir de tejidos internos de este cultivo, y su efecto PCV al ser inoculadas en condiciones de invernáculo (42).

En cuanto a la cepa UYSB119, relacionada al género *Bacillus*, los ensayos de PCV no fueron concluyentes en la variedad M81E. Sin embargo, cuando dicha cepa fue inoculada en la variedad ADV2010, las plantas mostraron un incremento en el peso seco aéreo. Estudios previos demostraron el efecto PCV de la cepa *Bacillus subtilis* al ser inoculada a plantas de sorgo dulce, mejorando la germinación, el índice de vigor y la calidad nutricional de las semillas, así como también el contenido de proteínas y de carbohidratos(119). Asimismo, se ha reportado la capacidad de *Bacillus* sp. de ser PCV en condiciones de invernáculo y de captar Mn y Cd, al ser inoculada a plantas de sorgo dulce, poke indio y tomatillo(96). Con respecto a la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 empleada como referencia en estos experimentos, si bien ha sido reportada previamente como PCV de sorgo dulce en varios trabajos (10,146), en los ensayos realizados exhibió bajos rendimientos. Dicha cepa mostró efectos significativos de PCV solamente en el peso seco aéreo en la variedad M81E y ningún efecto en la variedad ADV2010. Mismos resultados fueron reportados previamente(98). La diferencias en el efecto que tiene la cepa Sp7, al ser inoculada en diferentes variedades y condiciones, puede deberse a una incompatibilidad entre los genotipos planta-bacteria o debido a que la cepa es mala compitiendo con la microbiota nativa del suelo, no logrando colonizar efectivamente las raíces(90). De esta forma, queda en evidencia la relevancia de desarrollar inoculantes que estén adaptados a las variedades y condiciones de cultivo en el país, para lograr tener rendimientos óptimos. Considerando lo mencionado anteriormente, se puede concluir que los tres aislamientos nativos ensayados presentan potencialidad para ser utilizados como inoculantes de sorgo dulce en las variedades utilizadas en Uruguay.

## II-LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITROGENADA AFECTA LA PCV DE LAS BACTERIAS DIAZÓTROFAS

En condiciones de campo el efecto de la PCV de los inoculantes puede verse afectado por las condiciones ambientales, la composición fisicoquímica del suelo o la competencia con otros microorganismos, entre otros factores(50). En este sentido, cuando se trabaja particularmente con bacterias diazótrofes es preciso evaluar la óptima relación fertilizante nitrogenado-bacterias diazótrofes, ya que la actividad de la enzima nitrogenasa es inhibida cuando hay excesiva disponibilidad de nitrógeno mineral en el medio (55,91,166). Sin embargo, si bien un alto nivel de suministro de nitrógeno mineral podría inhibir la FBN en algunas especies diazotróficas, esto no sucede en todas las especies ni en todas las condiciones(91,126,129). Por lo tanto, la PCV de microorganismos diazótrofes en condiciones de disponibilidad de nitrógeno, debe ser estudiada para cada caso en particular(55).

En este sentido, se realizaron estudios de respuesta a la inoculación con las cepas *Kosakonia radicincitans* UYSB89 y *Kosakonia cowanii* UYSB139, conjuntamente con la aplicación de diferentes dosis de fertilizante químico nitrogenado(0N,75N y 150N), en las dos variedades de semillas, ADV2010 y M81E. El objetivo fue, por una parte, conocer si el efecto PCV de las cepas se ve afectado por la fertilización química nitrogenada. Por otra parte, evaluar si al aplicar una concentración más baja de fertilizante químico en conjunto con la inoculación bacteriana se logra un efecto PCV similar al que se consigue con la aplicación de la dosis de fertilizante recomendada(150N). En estos experimentos el sistema fue diseñado buscando que se asemeje a las condiciones del suelo y de cultivo en el campo, por lo cual los resultados obtenidos son un insumo fundamental a la hora de considerar estas cepas como inoculantes bacterianos de sorgo dulce.

Se constató que las plantas de la variedad M81E respondieron positivamente al fertilizante químico nitrogenado, cuando fue aplicado en la dosis 75N, es decir, la mitad de la dosis recomendada por el proveedor de semillas. Sin embargo, al aplicar 150N de fertilizante se observó que el efecto sobre el desarrollo de la planta fue similar a cuando se aplicó 75N, es decir que duplicar la dosis no significó obtener mejores resultados en los parámetros evaluados.

Por otra parte, se demostró que la inoculación bacteriana con las cepas UYSB89 y UYSB139 repercutió positivamente sobre el desarrollo de la planta, en ausencia de fertilizante químico. Sin embargo, los efectos de la cepa UYSB89 se vieron inhibidos cuando el inóculo fue aplicado en simultáneo con el fertilizante químico nitrogenado, con cualquiera de las dos dosis ensayadas. Este fenómeno puede deberse a que el principal mecanismo PCV de la cepa sea la FBN, la cual se pudo ver inhibida al haber disponibilidad de nitrógeno mineral en el medio. En cuanto a la cepa UYSB139, sus efectos también se vieron inhibidos cuando se inoculó junto a 75N, sin embargo se observó PCV cuando fue inoculada junto con el fertilizante químico a dosis 150N. Debido a que es lógico esperar que si el efecto PCV no se inhibe frente a la dosis más alta de fertilizante, tampoco lo haga frente a la dosis más baja, sería necesario repetir el ensayo para constatar si el fenómeno se repite.

Las plantas de la variedad ADV2010 respondieron positivamente a la fertilización química nitrogenada. Sin embargo, su respuesta fue moderada y no homogénea, ya que no todos los parámetros biométricos evaluados respondieron. Además, se constató que duplicar la concentración de fertilizante no repercutió sobre el desarrollo de la planta bajo las condiciones ensayadas. En cuanto a las cepas UYSB89 y UYSB139, se comprobó que la inoculación con las mismas estimuló el desarrollo vegetal, tanto en ausencia como en presencia de fertilizante químico nitrogenado. Por otra parte, se demostró que inoculando con las cepas en conjunto con la aplicación de fertilizante a dosis 75N, se obtuvieron mejores resultados que cuando se aplica fertilizante a dosis 150N. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el uso de las cepas UYSB89 y UYSB139 como inoculantes microbianos para de la variedad ADV2010, podría ser una práctica agrícola que permitiría reducir en un 50% la concentración de fertilizante químico aplicado actualmente, logrando incluso optimizar los rendimientos del cultivo.

En términos generales, es de destacar que la respuesta de las plantas, tanto a la fertilización química nitrogenada como a la inoculación bacteriana, fue diferencial según el genotipo del cultivar evaluado, observándose que en la variedad ADV2010 la posibilidad de emplear las cepas como inoculantes es más viable que en la variedad M81E. Posiblemente, el motivo de este comportamiento diferencial, sea debido a que la interacción planta-bacteria se encuentra fuertemente determinada por lo genotipos de ambos participantes de la interacción(32). Además, se demostró que la eficacia de inoculación por las cepas está sujeta a la disponibilidad de nitrógeno en el medio, por lo tanto fue acertado evaluar su contribución a la planta en combinación con distintos niveles de fertilización nitrogenada. En este sentido, previamente se demostró que la fertilización química nitrogenada en campo, afecta la composición de la comunidad bacteriana asociada a sorgo dulce de la variedad M81E siendo el nitrógeno el factor principal que afectó la estructura de la comunidad bacteriana diazotrófica-endofítica (98). Teniendo lo dicho previamente en cuenta, es probable que el estado fisiológico de la planta, determinado por la disponibilidad de nutrientes en el medio, module la composición de la microbiota bacteriana asociada, reclutando bacterias específicas que atiendan sus deficiencias (71,30).

### III-LA INOCULACIÓN BACTERIANA AFECTA LA MICROBIOTA-ENDOFÍTICA ASOCIADA A PLANTAS DE SORGO DULCE.

Al inocularse la cepa PCV endófito *Rhizobium* sp. UYSB13 a plantas de sorgo dulce var. ACA727, se observó que el inóculo se pudo detectar al mes de inocularse en los tratamientos en los cuales se aplicó. Asimismo se observó que las microbiotas de tratamientos inoculados son diferentes en su composición a los no inoculados demostrando el efecto modulador del mismo sobre la microbiota. lo que tendría como resultado un fenotipo del holobionte en el cual se incrementa el crecimiento.

### Conclusiones y recomendaciones

Mediante las actividades desarrolladas, fue posible cumplir con todos los objetivos planteados, lográndose insumos valiosos para el futuro desarrollo de inoculantes bacterianos de sorgo dulce.

Concretamente, se logró poner a punto la técnica de reducción de acetileno y mediante la misma definir como diazótrofos a siete aislamientos pertenecientes a la colección. Luego, mediante ensayos de promoción del crecimiento vegetal en condiciones gnotobióticas y de invernáculo, se determinó que las cepas diazótrofes *Kosakonia radicincitans* UYSB89, *Bacillus toyonensis* UYSB119 y *Kosakonia cowanii* UYSB139 promueven el crecimiento de plantas de sorgo dulce var. M81E y ADV2010. Por otra parte, se demostró que plantas de la var. ADV2010 fertilizadas con 75N e inoculadas con las cepas

Kosakonia cowanii UYSB139 o Kosakonia radicincitans UYSB89, tuvieron un mayor desarrollo que las plantas fertilizadas con una dosis mayor de fertilizante químico (150N), demostrando ser una alternativa que podría lograr reducir el uso de fertilizantes nitrogenados sin comprometer la productividad del cultivo. Sin embargo, los resultados del mismo ensayo en la var. M81E no fueron tan concluyentes, viéndose inhibido el efecto PCV de la cepas a causa de la fertilización química nitrogenada. Finalmente, los estudios de microscopia permitieron comprobar que dichas cepas establecen una interacción endofítica con plantas de sorgo dulce var. M81E.

En este sentido, se puede concluir que las tres cepas endófitas-diazótrofas PCV ensayados en la presente tesis presentan potencialidad para ser utilizados como inoculantes de sorgo dulce en las variedades empleadas en Uruguay. Particularmente, la cepa Kosakonia cowanii sp. UYSB139 demostró potencialidad de ser empelada como suplemento a la fertilización química nitrogenada, lo cual permitiría reducir la cantidad de fertilizante aplicado.

## Referencias bibliográficas

- 1.Masjuki HH, et al.,2013. Biofuel: Policy, Standardization and Recommendation for Sustainable Future Energy Supply. *Energy Procedia* 42:577–586.
- 2.Reis V, Lee S, Kennedy C.2007. Biological nitrogen fixation in sugarcane, p.213–232. In Elmerich, C, Newton, WE (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria*. Springer.
- 3.Gnansounou E, Dauriat A, Wyman C.2005. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresour.Technol.* 96:985–1002.
- 4.Chiaromonti D.2007. Bioethanol: role and production technologies, p.209–251. In *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*. Springer Netherlands.
- 5.Fogliata F.1995. Agronomía de la caña de azúcar, p.1–10. In Tomo I: Tecnología, costos y producción. El graduado (Ed.), Tucumán, Argentina.
- 6.Woods J.2000. Integrating Sweet Sorghum and Sugarcane for Bioenergy: Modelling the Potential for Electricity and Ethanol Production in SE Zimbabwe. PhD Thesis: King's College London.
- 7.Viator H, et al.,2009. Sweet sorghum for biofuel production in Louisiana. *Louisiana Agric. Mag.*53:16–17.
- 8.Almodares A, Hadi MR.2009. Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *African J.Agric.Res.*4:772–780.
- 9.Siri-Prieto G, Ernst O, Martínez-haedo M, Albano S.2008. Productividad del sorgo dulce para la producción de etanol según variedad, época de siembra y población en el noroeste Uruguayo. Informe final del proyecto. Facultad de Agronomía-ALUR.
- 10.Perrott K, Sarathchandra S, Dow B.1992. Seasonal and fertilizer effects on the organic cycle and microbial biomass in a hill country soil under pasture. *Austr.J.Soil Res.*30:383–394.
- 11.Steinshamn H, et al.,2004. Utilization of nitrogen (N) and phosphorus (P) in an organic dairy farming system in Norway. *Agric.Ecosys.Env.*104:509–522.
- 12.Rejesus R, Hornbaker R.1999. Economic and Environmental Evaluation of Alternative Pollution-Reducing Nitrogen Management Practices in Central Illinois. *Agric.Ecosyst.Environ.*75:41–53.
- 13.Döbereiner J.1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biol.Biochem.*29:771–774.
- 14.James EK.2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *F.Crop.Res.* 65:197–209.
- 15.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.
- 16.Elmerich C, Newton W.2010. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, 1sted. Springer Netherlands.
- 17.Rosenblueth M, Martínez-Romero E.2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. plant-microbe Interact.*19:827–837.
- 18.Hardoim PR, et al.,2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*79:293–320.
- 19.Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J.2005. Bacterial biofertilizers, p.143–172. In Siddiqui, ZA(ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- 20.Lugtenberg B. et al.,2013. Plant Growth Promotion by Microbes. p.561. In Bruijn, FJde(ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Vol 2, First Edit. John Wiley and Sons, Inc.
- 22.Malfanova N V. 2013. Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. Leiden University.
- 23.Meier C, Flinn BS. 2010. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Pat.Biotechnol.*4:81–95.
- 24.Oliveira ALM, et al.,2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil* 284:23–32.
- 25.Hallmann J, Berg G, Schulz B.2006. Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms, p. . In Schulz, B, Boyle, C, Sieber, TN (eds.), *Microbial Root Endophytes*, 9thed. Spinger, Berlin.
26. Grönemeyer et al.,2011. Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. *Plant Soil*356:67–82.
- 27.Zinniel DK, et al.,2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Appl.Environmental Microbiol.*68:2198–2208.
- 28.Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R.2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol.Rev.*31:425–48.



29. Bertalan M, et al., 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 10:450.
32. Kent AD, Triplett EW. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:211–36.
33. Bashan Y, Luz E. 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth: A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 1st ed. Elsevier Inc.
34. Okon Y, Labandera-Gonzalez CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591–1601.
35. Fabiano E, Arias A. 1990. Identification of inoculant strains and naturalized populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* using complementary methodologies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6:121–126.
36. Monza J, Fabiano E, Arias A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24:241–247.
37. Amarelle V, et al., 2010. A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 156:1873–82.
38. Amarelle V, O'Brian MR, Fabiano E. 2008. ShmR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6473–5.
- 39.
40. Fabiano E, et al., 1994. Extent of high-affinity iron transport systems in field isolates of rhizobia. *Plant Soil* 164:177–185.
41. Noya F, Arias A, Fabiano E. 1997. Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *J. Bacteriol.* 179:3076–8.
42. O'Brian M, Fabiano E. 2010. Mechanisms and regulation of Iron Homeostasis in the Rhizobia, p. 285. In Cornelis, P, Andrews, S (eds.): *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. Caister Academic Press.
43. Platero R, et al., 2004. Fur Is Involved in Manganese-Dependent Regulation of *mntA* (*sitA*) Expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4349–4355.
44. Platero R, et al., 2007. *Sinorhizobium meliloti* fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the *mntA* promoter in a manganese-responsive manner. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4832–8.
45. Platero R, et al., 2003. Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:65–70.
46. Battistoni F, et al., 2002. Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* strains as inocula of alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 34:593–597.
47. Rosconi F, et al., 2006. Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258:214–219.
48. Taulé C. 2011. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. Tesis de Maestría. PEDECIBA BIOLOGÍA. Montevideo, Uruguay.
49. Platero R, et al., 2016. Novel *Cupriavidus* Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan *Mimosa* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* (DOI:10.1128/AEM.04142-15).
50. Battistoni F, Oetjen J, Reinhold-Hurek B. 2011. Identification of proteins accompanying diazotome-related N<sub>2</sub>-fixation by the grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *FEMS Microbiol. Lett.* En preparación.
51. Battistoni F, et al., 2005. Physical map of the *Azoarcus* sp. strain BH72 genome based on a bacterial artificial chromosome library as a platform for genome sequencing and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 249:233–40.
52. Krause A, et al., 2011. Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of *Azoarcus* Sp. strain BH72. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24:1325–32.
53. Krause A, et al., 2006. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* 24:1385–1391.
54. Miché L, et al., 2006. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19:502–511.
55. Battistoni FJ, et al., 2012. INFORME FINAL DEL PROYECTO FPTA-275: Producción sustentable en caña de azúcar: bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales.
56. Taulé 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.
57. De los Santos MC, 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.* DOI 10.1007/s13213-015-1113-2.

58. Mareque C, et al., 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Ann. Microbiol.* 65:1057–1067.
59. Taule & #769; C, et al., 2017. Inoculation effects of endophytic diazotrophs in combination with different levels of chemical N-fertilizer on commercial sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. En revisión.
60. Ferrari E. 2015. Construcción y caracterización de una colección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo de Canola (*Brassica napus*). Inf. beca iniciación ANII-INI\_X\_2013\_1\_100924.
61. Taule & #769; C., A. Castillo, S. Villar, F. Olivares and F. Battistoni. 2016 Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant and Soil* 403:403-418.
62. Heijo G. 2015. Construcción y caracterización de una colección bacteriana de probables endófitos diazotóforos nativos asociados a plantas adultas de la variedad M81E de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* Moench). Tesina de Grado. UdelAR, Montevideo.
63. Battistoni F. 2015. INFORME FINAL DEL PROYECTO FSE 5911: Estudio de la respuesta de las variedades de *Sorghum bicolor* (L) Monech cultivadas en Uruguay a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. 64. Mareque C, et al., 2017. The chemical N-fertilization affects the structure and the composition of the endophytic-bacterial community associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor*), under field conditions. En revisión. 65. Battistoni, F., Platero, R., Duran, R., Cerveñansky, C., Battistoni, J., Arias, A. and E. Fabiano. 2002. Identification of an iron-regulated outer membrane protein (ShmR) able to bind hemin in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5877-5881.
66. Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C. Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Battistoni, F., and Elena Fabiano. 2012. Discovery of new Beta rhizobia strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Applied Environmental Microbiology.* 78: 1692-1700.
67. Baldani JI, et al., 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*:384:413-431.
68. Hulton CJ, Higgins CF, Sharp PM. 1991. Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5:825–834.
69. Lane DJJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. p.115–175. In Stackebrandt, E, Goodfellow, M (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York.
70. Hardy RW, et al., 1968. The acetylene-ethylene assay for N(2)-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185–1207.
71. Burris RH. 1972. Nitrogen fixation assay methods and techniques. *Methods Enzymol.* 24B:415–431.
72. Bremner JM, Keeney DR. 1965. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 31:34–39.
73. Martínez-garcía E, Lorenzo V De. 2012. *Synthetic Gene Networks* 813:267–283.
74. Monteilh C, et al., 1990. Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce 1, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron. *Nucleic Acids Res.* 18:1407–1413.
75. Pósfai G, et al., 1999. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 27:4409–4415.
76. Larkin MA et al., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
77. Ludwig W, et al., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363–1371.
78. Bulgari D, et al., 2014. Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process. *BMC Microbiol.* 14:198.
79. 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.

## Licenciamiento

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