

Estudio de la respuesta de las variedades de *Sorgo bicolor* (L) Monech cultivadas en Uruguay a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal

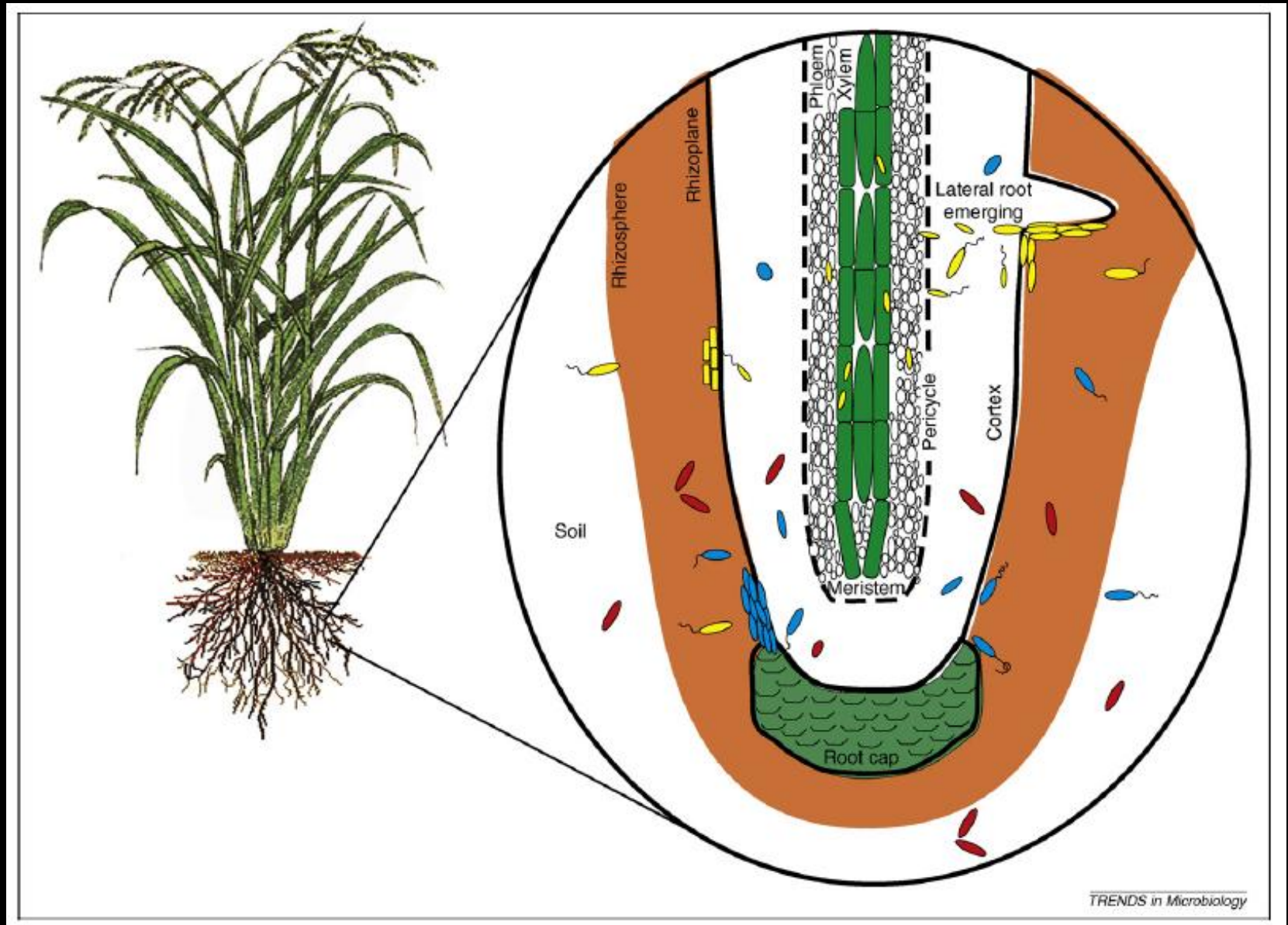
Dr Federico Battistoni, fbattistoni@iibce.edu.uy



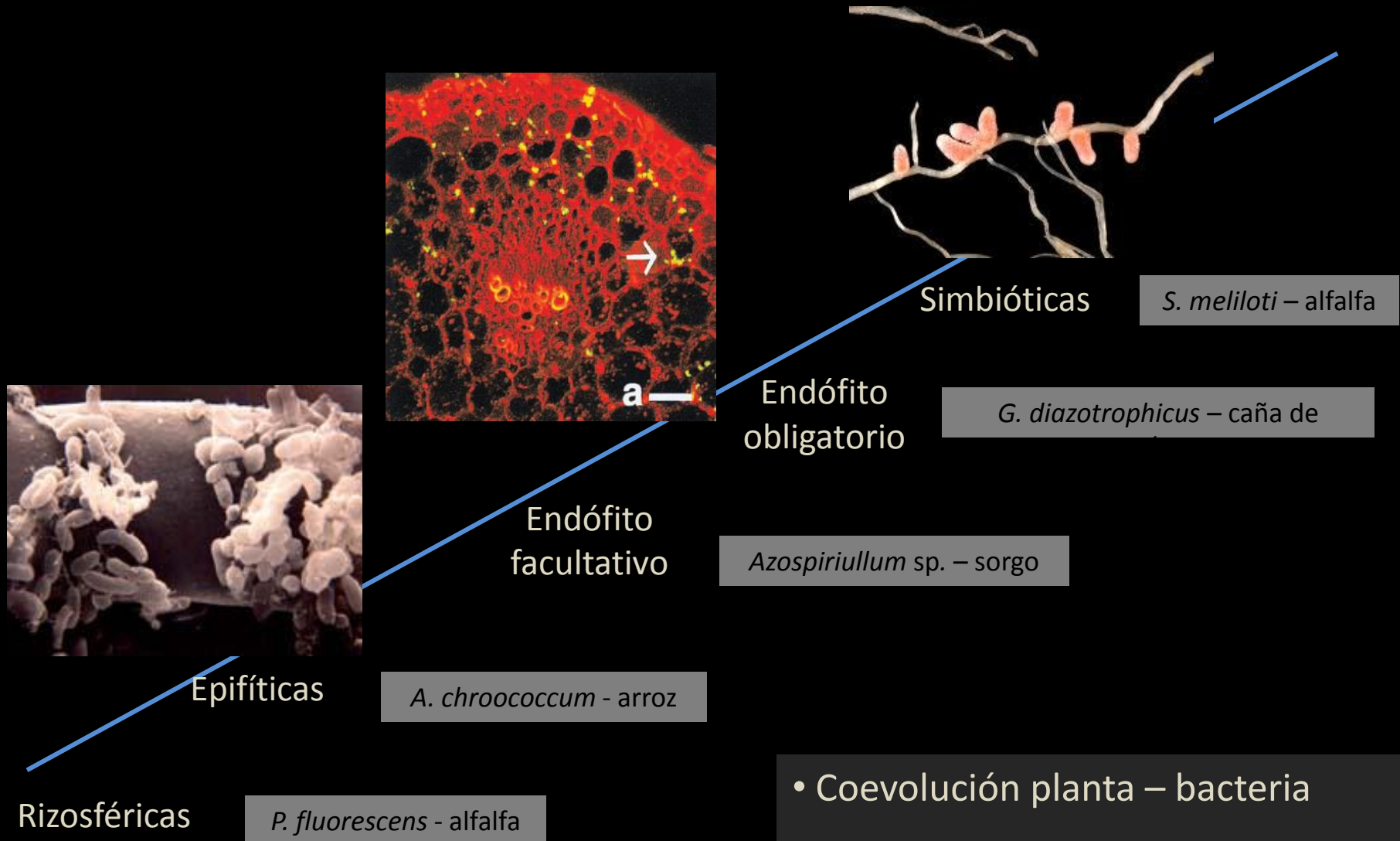
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
División de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable



Interacción planta-bacteria



Interacción planta-bacteria

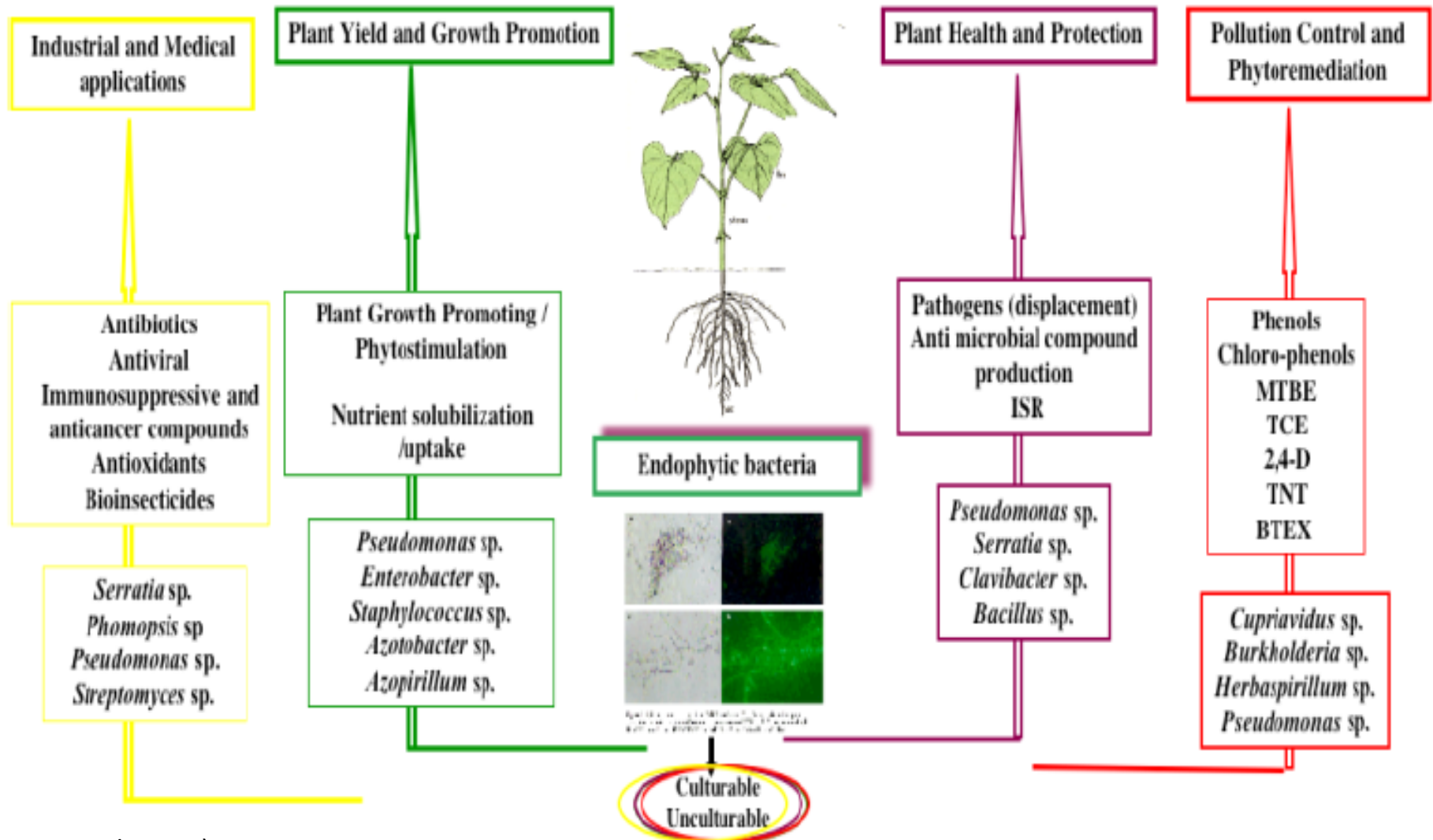


- Coevolución planta – bacteria
- Grado de interacción

Endófitos bacterianos

- Bacterias que colonizan activamente los tejidos internos de las plantas y establecen asociaciones (endosimbiosis), beneficiando a las mismas (PCV)
- Endófito verdadero: cuando se demuestra mediante técnicas microscópicas su localización e identidad dentro de los tejidos vegetales
- Cumplir con el postulado de Koch: ser capaz de infectar nuevos hospederos

Endófitos y sus aplicaciones



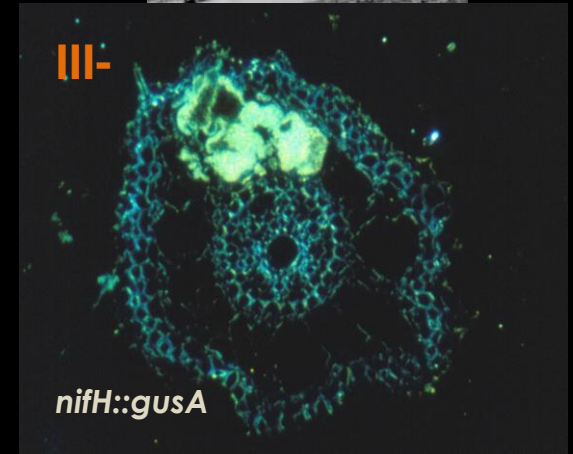
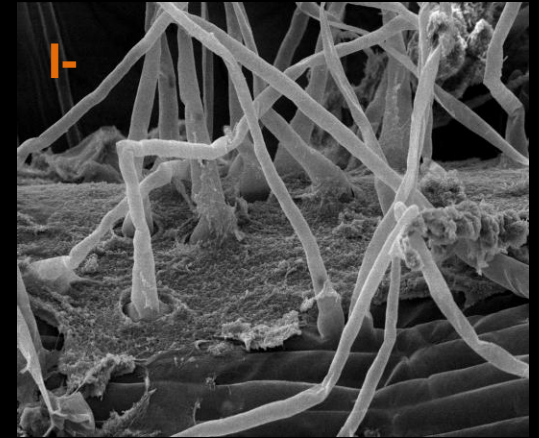
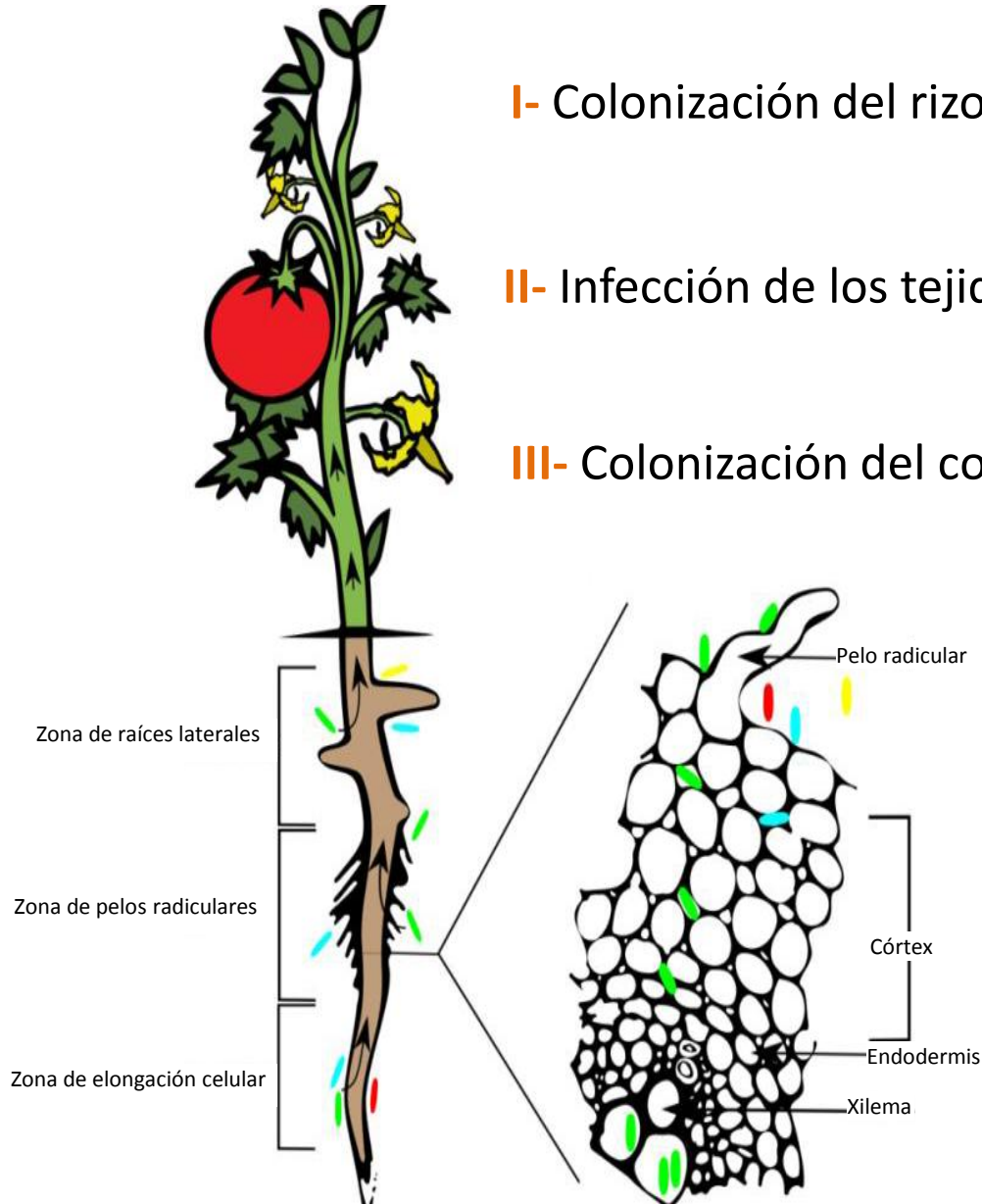
(Ryan et. al., 2008)

Interacción planta-endófito

I- Colonización del rizoplasma

II- Infección de los tejidos

III- Colonización del cortex



Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

- Directos: actúan sobre la planta

1. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)
2. Producción de sustancias estimulantes del crecimiento
3. Incremento en la capacidad de absorción de minerales (Fe,P)

- Indirectos: actúan sobre otros componentes del ecosistema provocando un efecto benéfico en la planta

1. Control Biológico

- a. Competencia por los nutrientes del nicho
- b. Producción de metabolitos secundarios tóxicos
- c. Parasitismo
- d. Inducción de la resistencia sistémica

Objetivo de la línea de investigación

Aportar a la sustentabilidad de cultivos de interés agronómico mediante el empleo de bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal, en sustitución a la fertilización química

Modelos exitosos

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5- caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Herbaspirillum seropedicae SmR1 – arroz (*Oryza sativa*)

Klebsiella pneumoniae 342-trigo (*Triticum* spp.)

Modelos de estudio en el laboratorio

- Festuca SFRO var. Don Tomás



- Canola (*Brassica napus*)



- Sorgo dulce var. M81E (*Sorghum bicolor*)



- Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)



Sorghum bicolor (L) Monech

- *Sorghum bicolor* (sorgo dulce) pertenecen a la familia de las Poaceae
- Es el quinto cultivo en importancia en el mundo
- A este cultivo se lo define como multipropósito (biocombustible, alimento, energía)
- Variedad utilizada en ALUR M81E, introducida de la Universidad de Kentucky USA



General

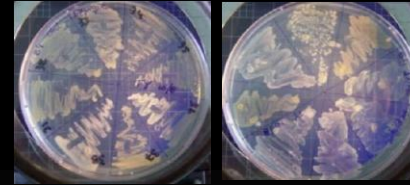
Determinar mediante estudios de interacción planta-bacteria si los probables endófitos bacterianos asociados al sorgo dulce tienen un papel significativo en promover el crecimiento vegetal de la variedad M81E

Específicos

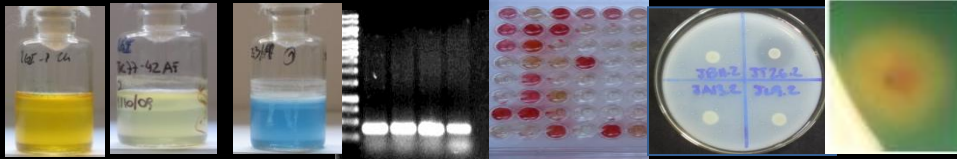
1. Construir una amplia colección de probables endófitos bacterianos nativos asociados a plantas adultas de la variedad M81E de interés para ALUR S.A.
2. Caracterizar bioquímica y molecularmente la colección construida e identificar aislamientos de interés.
3. Estudiar la respuesta en ensayos de invernáculo y de campo de plantas de sorgo dulce inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
4. Determinar si los aislamientos promotores del crecimiento vegetal son endófitos verdaderos.
5. Determinar el efecto de la fertilización química sobre el microbioma



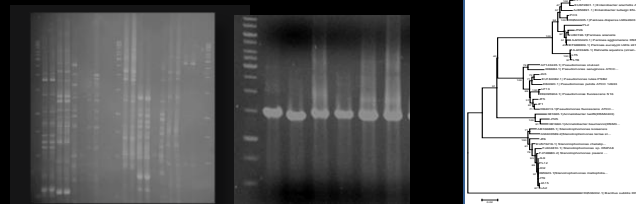
Semillas, raíces y tallos



Construcción de una colección



Caracterización (PCV y PMI)



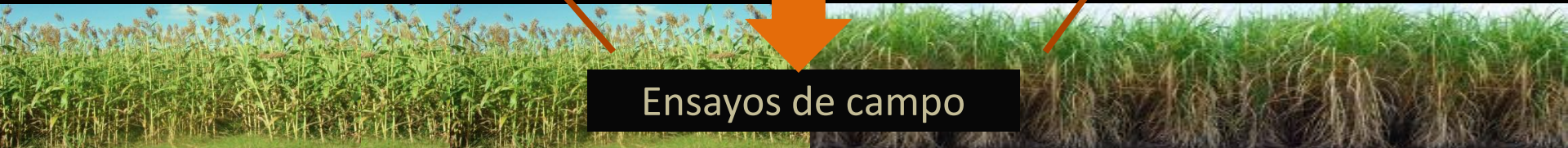
Identificación y filogenia



Ensayos de PCV

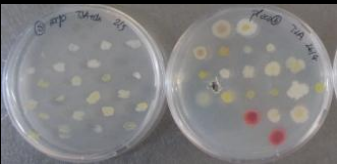


Ensayos de campo

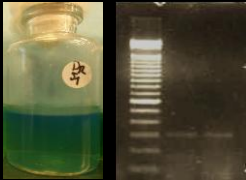


Caracterización de la colección

Colección: 369 aislamientos

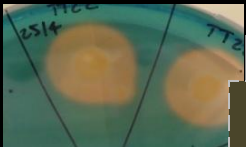


PCV



Diazótrofos (N) (*nifH*⁺/película de crecimiento)

146



Productores sideróforos (Fe)

22



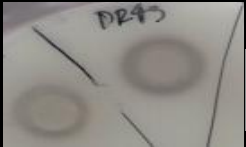
Alto potencial biotecnológico

66



25

PMI



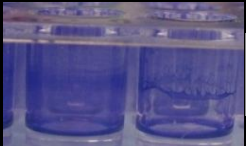
Productores de proteasas

29



Productores de celulasas y hemicelulasas

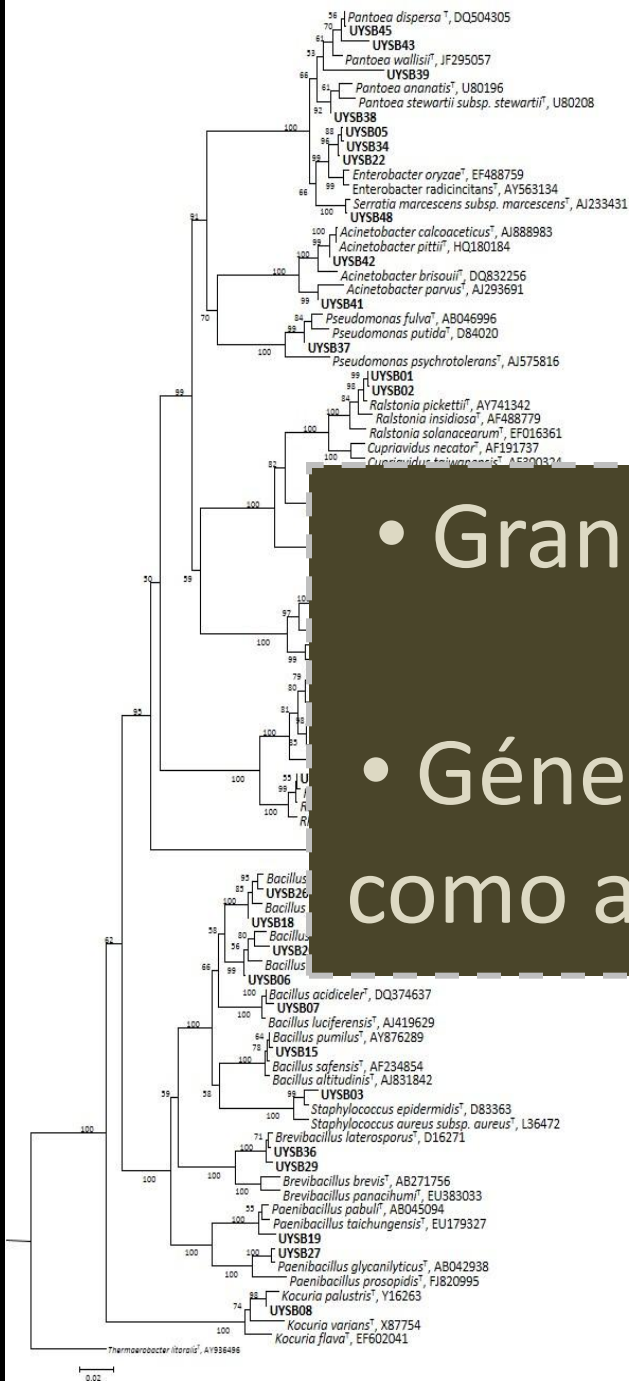
5/3



Formadores de biopelículas

41

Identificación y filogenia



- Gran diversidad bacteriana
- Géneros nuevos reportados como asociados a sorgo dulce

Árbol filogenético basado en las secuencias de gen 16S ARNr de los aislamientos asociados a sorgo dulce

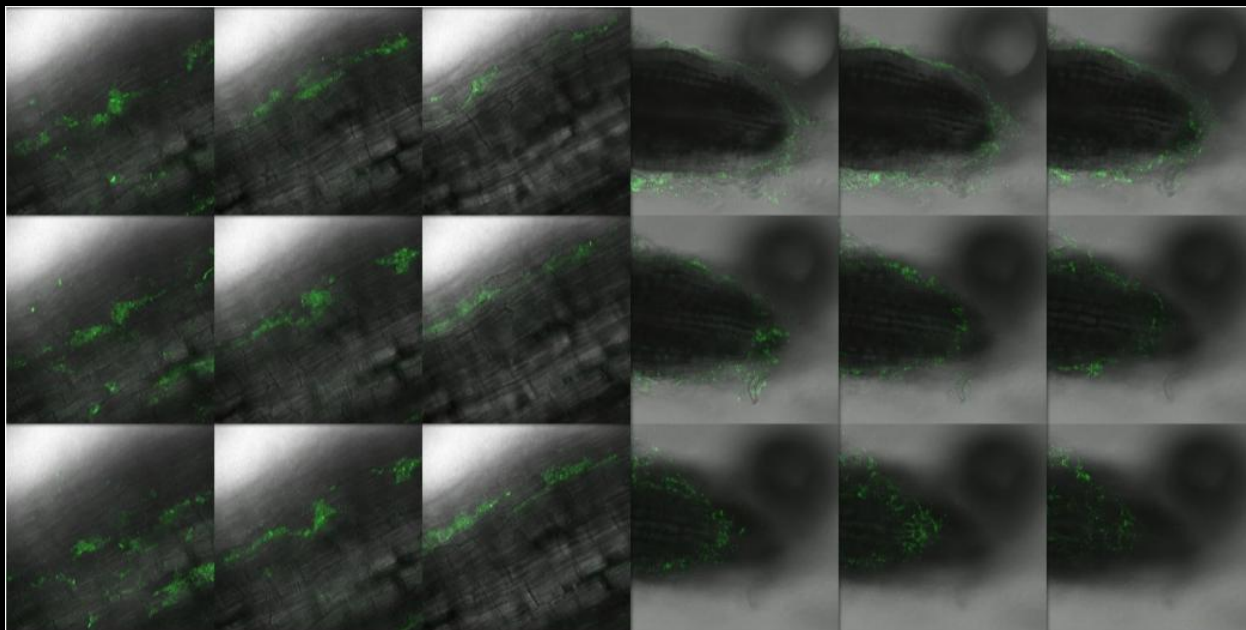
Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en invernáculo

Aislamiento	Altura Tallo (cm)	Diámetro Tallo (mm)	Peso seco (g planta ⁻¹)	
			Raíz	Aéreo
Control Negativo ^a	13,50 a	4,84 a	0,74 a	0,86 a
<i>Rhizobium</i> sp. UYSB12	14,44 ab	4,90 a	1,05 c	0,95 abc
<i>Rhizobium</i> sp. UYSB13	16,00 b	4,44 a	1,09 c	1,07 cd
<i>Enterobacter</i> sp. UYSB34	14,95 ab	4,73 a	0,93 abc	1,02 bcd
<i>Pantoea</i> sp. UYSB45	16,25 b	4,79 a	1,01 bc	1,15 d
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	14,30 ab	4,90 a	0,77 ab	0,94 ab

Variedad de sorgo
dulce M81E



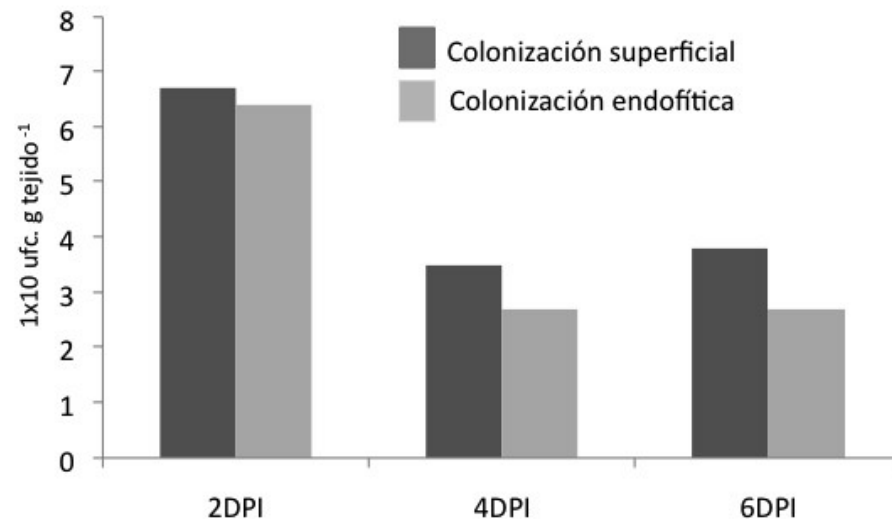
Rhizobium sp. UYSB13 y *Pantoea* sp. UYSB45 son endófitos verdaderos



Pantoea sp. UYSB45::*gfp*

A: raíces (630X) y
B: cofa de la raíz principal.

Rhizobium sp. UYSB13



Efecto de la fertilización química nitrogenada sobre la comunidad endofítica y diazotrófica

+N



200 kgN/ha

-N



0 kgN/ha

Campo



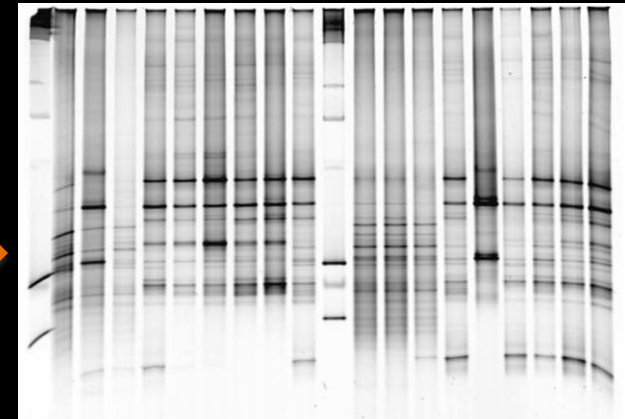
Extracción
de ADN
endofítico

+N#200#KgN/há)#

-N#0#KgN/há)##

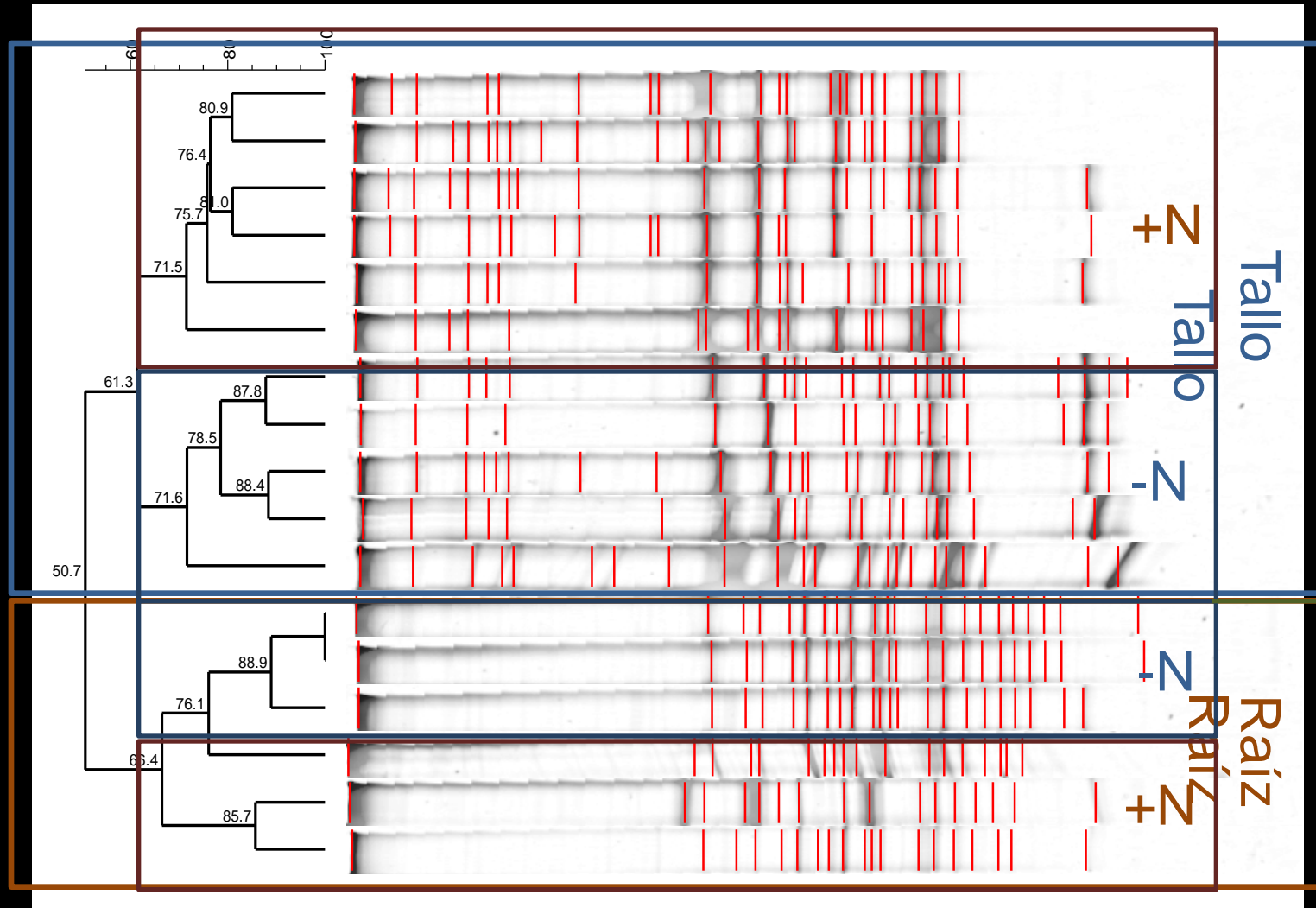
Raíz% Tallo% Tallo%
inferior% superior%

Raíz% Tallo% Tallo%
inferior% superior%



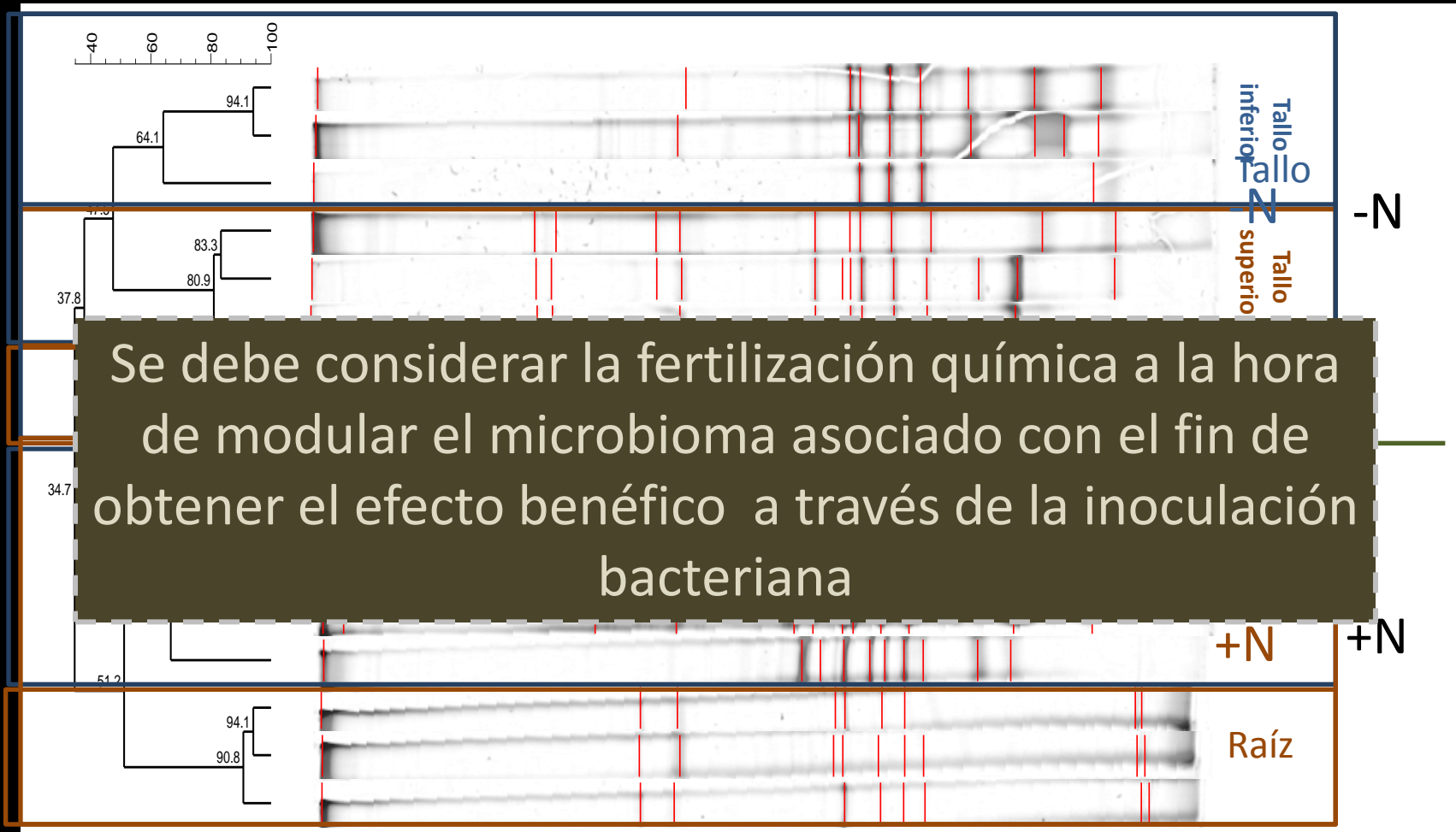
Análisis por DGGE de la estructura y diversidad de la comunidad endofítica y diazotrófica

Estructura de la comunidad endofítica (16S ADNr)



- Dentro de cada órgano: las comunidades se agrupan según el tratamiento +/-N

Estructura de la comunidad endofítica-diazotrófica (*nifH*)



- Las comunidades se agrupan según el tratamiento +/-N

- Profundizar en los ensayos de promoción del crecimiento vegetal:

- en diferentes sistemas (invernáculo, campo)
- evaluar un amplio número de bacterias (diazótrofas)
- estudiar la estabilidad del inóculo a lo largo del tiempo
- determinar cual es el mecanismo PCV

- Evaluar el efecto de la fertilización química nitrogenada:

- en la promoción del crecimiento vegetal
- en microbioma asociado a sorgo dulce
- en la expresión de genes específicos (funcionalidad)



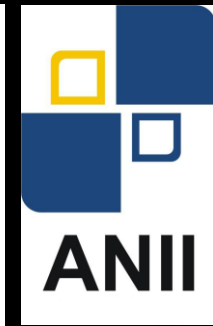
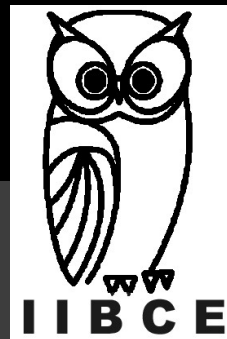
Formación de recursos humanos

- 2011-2014: Cintia Mareque. **Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA.** Apoyo ANII.
“Producción sustentable en el cultivo de sorgo dulce: búsqueda de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a *Sorghum bicolor* (L) Monech para su futura aplicación biotecnológica”.
- 2013-2014: Gabriela Heijo. **Tesina de Grado. Facultad de Ciencias-UdelaR.** Apoyo ANII.
“Construcción y caracterización de una colección de probables endófitos diazótrofos nativos asociada a la variedad M81E de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*)”

Producción científica

- Mareque, C., C. Taulé, M. Beracochea and F. Battistoni. 2014. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). Annals of Microbiology. DOI 10.1007/s13213-014-0951-7.
- Mareque, C., Freitas, T., Estebanez Vollú, R., Seldin, L., Beracochea, M. and F. Battistoni. 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 evaluación.
- Congresos nacionales (7)
- Congresos internacionales (3)

Cecilia Taulé: Estudiante de Doctorado
 Cintia Mareque: Estudiante de Doctorado
 Martín Beracochea: Estudiante de Maestría
 Gabriela Heijo: Estudiante de Maestria
 María Cecilia de los Santos: Estudiante de Grado
 Enzo Ferrari: Estudiante de Grado



Margarita Sicardi (Facultad de Ciencias)
 Fernando Hackembruch (ALUR)
 Darío Rodríguez (ALUR)
 Alicia Castillo (INIA)
 Claudia Barlocco (INIA)



Verónica Reis (EMBRAPA-Agrobiología, BR)
 Fabio Olivares (UENF-LBCT, BR)
 Euan James (The James Hutton Institute. UK)
 Lucy Seldin (Instituto de Microbiología, UFRJ, BR)

