

TRABAJOS ORIGINALES

Caracterización de bacterias endofíticas de caña de azúcar productoras de *N*-acil homoserina lactonas

Characterization of endophytic bacteria from sugarcane producing N-acyl homoserine lactones

Bertini Elisa V.¹, Leguina Ana Carolina del V.¹, Castellanos de Figueroa Lucía I.^{1,2}, Nieto Peñalver Carlos G.^{1,3*}

¹ Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI, CONICET). Av. Belgrano y Pje. Caseros (4000), San Miguel de Tucumán.

² Cátedra de Microbiología Superior, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT.

³ Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT.

*E-mail: cgneto@proimi.org.ar

RESUMEN

Por su implicancia en la fabricación de azúcar, bioetanol y papel, la caña de azúcar es un cultivo de importancia económica para nuestro país. Los tejidos internos de la planta se encuentran colonizados por una gran diversidad de microorganismos endofíticos. En este trabajo se caracterizó la microbiota endofítica cultivable y productora de moléculas de *quorum sensing* de la familia de las *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) obtenida de plantas de caña de azúcar. Sobre un total de 206 aislamientos analizados, se detectaron siete productores de AHLs, los cuales fueron identificados por secuenciación del gen 16S ADN_r como pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia* y *Pantoea*. Bioensayos con cepas biosensoras permitieron suponer que estos aislamientos producen más de una molécula de señalización. La caracterización de estos aislamientos mostró que, de manera variable, producen sideróforos, poliaminas y amonio, expresan actividad catalasa, fitasa y

endoglucanasa. Solo uno mostró actividad proteasa y solubilizó sales insolubles de fosfato. Por otro lado, bajo las condiciones empleadas ninguno produjo HCN ni mostró actividad quitinasa. Las propiedades evaluadas en los aislamientos obtenidos sugieren que los mismos pueden ser empleados para caracterizar las interacciones mediadas por *quorum sensing* entre microorganismos endofíticos y las interacciones entre estos con la planta hospedera de caña de azúcar.

PALABRAS CLAVE: interacciones, señalización, microorganismos, quorum sensing

SUMMARY

For its implication in the production of sugar, bioethanol and paper, sugarcane is a crop of economical relevance for our country. Internal tissues of this plant are colonized by high diversity of endophytic microorganisms. In this work, the culturable endophytic microbiota producing *N*-acyl homoserine lactone (AHL) family

quorum sensing molecules was characterized. From a total of 206 isolates, 7 were detected as AHL producers, which were identified through 16S rDNA sequencing as belonging to the genera *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia* and *Pantoea*. Bioassays with biosensor strains suggest that these isolates produce more than one signaling molecule. The characterization of the isolates showed the variable production of siderophores, polyamines and ammonium, and catalase phytase and endoglucanase activities. Only one isolate presented protease activity and could solubilize phosphate salts. On the other side, under the assayed conditions none of them produced HCN nor chitinase activity. The evaluated properties suggest that these isolates could be utilized in the characterization of the quorum sensing-mediated interactions among endophytic micro organisms and with host sugarcane plant.

KEY WORDS: Interactions, signaling, microorganisms, *quorum sensing*

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una planta perteneciente a la familia Poaceae de gran importancia agronómica para nuestro país en general y para la región NOA en particular. Su interés económico radica no solo en la producción de sacarosa sino también en la obtención de bioetanol y en el aprovechamiento del bagazo para la fabricación de papel. La Argentina se encuentra en el puesto 21 del ranking mundial en producción de azúcar crudo y blanco, en donde Tucumán aporta el 64,3% del total nacional. A su vez, en nuestro país de las

catorce refinerías de bioetanol, nueve lo producen a partir de caña (ver Informes de Cadenas de Valor 2016 para Azúcar disponibles en el sitio del Ministerio de Hacienda de la Nación <https://www.economia.gob.ar/>). Similar a otras plantas, la caña de azúcar se encuentra colonizada por una gran variedad de microorganismos. En general, se denominan epifíticos a los que colonizan la superficie de sus partes aéreas; endofíticos a los que se encuentran en el interior de sus tejidos; y rizosféricos a los que están en la rizósfera, la zona de suelo en estrecha relación con la superficie de las raíces (Bhardwaj, 2014). La reciente caracterización del microbioma bacteriano y fúngico de la caña de azúcar puso de manifiesto que la planta se encuentra colonizada por una gran diversidad de microorganismos provenientes principalmente del suelo a su alrededor (De Souza, 2016). Si bien el núcleo de la comunidad bacteriana y fúngica sólo constituyen el 20% de su riqueza microbiana, éste representa el 90% de la abundancia relativa total de microorganismos. Dentro de este microbioma bacteriano núcleo se encuentran microorganismos de los géneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Rhizobium*, etc. En algunos de estos géneros microbianos se han descrito mecanismos regulatorios de *quorum sensing*. La señalización química entre microorganismos mediante los mecanismos de "percepción del quórum" o *quorum sensing* (QS), permite la regulación colectiva de la fisiología microbiana de manera dependiente de la densidad celular (Fuqua y Greenberg, 2002). Para los microorganismos la posibilidad de

coordinar la fisiología microbiana tiene importancia ecológica: la producción de factores de virulencia o colonización, o la bioluminiscencia, por ejemplo, resultan metabólicamente muy costosas para una célula individual pero no para una población en su conjunto. En las bacterias Gram negativas se han descrito diversos tipos de señales químicas o moléculas señal que intervienen en los mecanismos de QS, como el éster metílico del ácido 3-hidroxihexadecanoico, las quinolonas o los diamino ácidos cíclicos. Sin embargo, las moléculas de la familia de las *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) producidas por muchas especies de α -, β - y γ -proteobacterias son las moléculas señal más estudiadas. Las AHLs están constituidas por un anillo lactónico unido mediante un enlace amida a una cadena acílica con un largo variable entre 4 y 18 carbonos. A su vez, el tercer carbono de la cadena puede estar completamente reducido, o parcial o completamente oxidado. Si bien algunas AHLs poseen también insaturaciones, esta característica solo ha sido descrita en moléculas con cadenas aciladas de 12 o más carbonos (Fuqua y Greenberg, 2002). Dentro de los microorganismos fitopatógenos de la caña de azúcar, se ha demostrado que el sistema de QS de *Xanthomonas albilineans* es de importancia para controlar la adhesión y la sobrevivencia en las hojas de la planta (Mensi, 2016). Hasta el momento no se ha demostrado la importancia *in planta* de los mecanismos de QS de las bacterias benéficas de caña de azúcar. Sí se demostró *in vitro* que este mecanismo regulara factores que serían de importancia para las interacciones con la planta hospedera en

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5, una bacteria endofítica de caña que posee demostrados efectos positivos (Bertini, 2014). Las interacciones que los microorganismos que colonizan la caña de azúcar pueden llevar a cabo entre sí y con el hospedero son poco conocidas. El objetivo de este trabajo es caracterizar las propiedades promotoras del crecimiento vegetal en bacterias endofíticas de caña de azúcar que posean un sistema de QS dependiente de la producción de AHLs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias endofíticas

Plantas de caña de azúcar (cultivar LCP 85-384) en diferentes estadios de crecimiento fueron obtenidas de dos plantaciones de Tucumán, Argentina (26°47'17.09"S - 65°11'53.08"O; y 26°47'18.64"S - 65°12'8.81"O) en julio de 2013. Raíces, hojas, nodos e internodos se desinfectaron en etanol 70% por 5 minutos seguidos de 10 minutos en hipoclorito de sodio 6,25% y 5 lavados con agua destilada estéril (Lalande, 1989). La desinfección se controló colocando muestras sobre los mismos medios utilizados para los aislamientos e incubándolas en las mismas condiciones (ver más abajo). Las muestras desinfectadas de raíces, tallos y hojas se maceraron en buffer fosfato de sodio 10 mM pH7, y diluciones seriadas se sembraron en los medios DYGS (Bertini, 2014), MM (suplementado con metanol 120 mM como única fuente de carbono) (Sy, 2005), NFb (Baldani, 2014), NA (peptona 5 g L⁻¹) y King B (King, 1954) suplementados con cicloheximida para inhibir el crecimiento de microorganismos eucariotas. Los internodos se centrifugaron por 15 min a 5000 x g para obtenerse el fluido

apoplástico, el que se sembró como se describió previamente. Las placas se incubaron a 30 °C por 48-72 h y las colonias aisladas se estriaron en los mismos medios hasta la obtención de cultivos puros. A partir de cultivos puros obtenidos luego de una incubación por 18hs se realizaron coloraciones de Gram (Britania, Argentina) según indicaciones del fabricante.

Identificación molecular de los aislamientos bacterianos

Los aislamientos seleccionados se sembraron en medio LB (Miller) agar (tripteína 10 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹) y se incubaron a 30 °C por 24 h. Luego, en condiciones asépticas se transfirieron a microtubos de ensayo conteniendo LB caldo para resuspenderse las células con agitación. La extracción del ADN genómico se realizó lisando las células con buffer CTAB (cetil trimetil amonio bromuro 0,05M; NaCl 1,4M; EDTA 20mM; TRIS-HCl 0,1M pH8) y se centrifugaron por 15 min. A partir de los sobrenadantes el ADN se extrajo con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (50:1) y se precipitó con etanol, para finalmente resolubilizarse en agua destilada estéril. El gen 16S ADN_r se amplificó con los cebadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTG GCTCAG 3') y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') y los amplicones se secuenciaron en el servicio de secuenciación de Magrogen (Corea). Las secuencias se compararon con las presentes en la base de datos Genbank utilizando el programa BLAST.

Extracción de AHLs

Las bacterias Gram negativas se cultivaron en condiciones aeróbicas a 30 °C en los mismos medios utilizados para

los aislamientos, sin el agregado de agar. A partir de estos cultivos se extrajeron las AHLs mediante una extracción con solvente utilizándose acetato de etilo acidificado (Bertini, 2014). Brevemente, a un volumen de cultivo se agregó un volumen de acetato de etilo acidificado con ácido acético 0,1% y se agitó vigorosamente. Luego de dejarse decantar, la fase orgánica se separó y se repitió la extracción sobre la fase acuosa. Los dos extractos orgánicos se mezclaron y el solvente se dejó evaporar hasta sequedad completa. Los extractos se solubilizaron en un volumen de acetonitrilo equivalente a 1:1000 respecto del cultivo a partir del cual se hizo la extracción. Los extractos se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Detección de AHLs

La detección de las moléculas de la familia de las AHLs se realizó mediante bioensayos con las cepas biosensoras *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClean, 1997), *C. violaceum* Vir07 (Morohoshi, 2008), *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4) (Cha, 1998) y *Pseudomonas putida* F117 (pKR-C12) (Riedel, 2001). Estas cepas no sintetizan AHLs pero al detectarlas producen el pigmento violaceína, expresan actividad β-galactosidasa y producen proteína fluorescente verde (GFP), respectivamente. *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* Vir07 y *P. putida* F117 (pKR-C12) se cultivaron aeróbicamente de manera individual por 18 h en medio LB caldo. *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) se cultivó aeróbicamente por 18 h en medio AT (Tempé, 1978). Se prepararon placas de medio agarizado sobre las que se sembraron los aislamientos a analizar realizándose un trazo sobre el medio de cultivo. Las cepas biosensoras se

sembraron de forma perpendicular al trazo del aislamiento analizado y las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. La producción de violaceína se observó a simple vista, mientras que la de GFP se determinó bajo iluminación UV. Para el análisis de los extractos orgánicos mediante los bioensayos con *C. violaceum* CV026 y *P. putida* F117 (pKR-C12), se prepararon placas con 10 mL de LB agar sobre el que se colocó una segunda capa de 10 mL de LB solidificado con 0,75% de agar e inoculado de manera individual con cada una de las cepas biosensoras. Una vez solidificadas las placas, se colocaron 5 µL de los extractos orgánicos de los aislamientos, preparados según se describió previamente. Para los bioensayos con *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) se utilizaron dos capas de AT agar y AT agar 0,75%, suplementándose la segunda capa con 20 µg mL⁻¹ de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D galactopiranosido). Sobre la segunda capa de AT se colocaron 2 µL de los extractos orgánicos. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h y se analizó la presencia de halos violetas (ensayos con *C. violaceum* CV026 y Vir07), halos celestes indicativos de hidrólisis de X-Gal [ensayos con *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4)] o halos fluorescentes bajo iluminación con luz UV [ensayos con *P. putida* F117 (pKR-C12)]. Los precultivos utilizados para los bioensayos se suplementaron con kanamicina (50 µg mL⁻¹) o gentamicina (20 µg mL⁻¹ para *P. putida*, o 40 µg mL⁻¹ para *A. tumefaciens*).

Caracterización de los aislamientos

La producción de sideróforos se detectó inoculando los aislamientos endofíticos de caña de azúcar en placas indicadoras de cromo azulol S (CAS) (Schwyn y

Neilands, 1987). Luego de una incubación por 24-48 h a 30 °C, la producción de sideróforos se evidenció por la aparición de un halo alrededor de las colonias. La determinación cualitativa de ácido cianhídrico (HCN) se determinó cultivando los aislamientos en los medios NA y King B agar por 24 h. Un papel de filtro Whatman N° 1 fue embebido en ácido pícrico al 0,5 % y Na₂CO₃ al 2% y colocado en la tapa de la placa de Petri conteniendo el crecimiento bacteriano. Las placas se sellaron con parafilm y se continuó la incubación a 30 °C durante 4 días. La producción de HCN se evidenció por un cambio de color, de amarillo a marrón, en el papel de filtro (Millar y Higgins, 1970). Para determinar la capacidad de amonificar y producir amonio por los aislamientos, se utilizó el reactivo de Nessler para revelar los sobrenadantes de cultivo (Cappuccino y Sherman, 1992). La producción de poliaminas se determinó en el medio agarizado Long Ashton decarboxilasa (LAD) (Cloete, 2009). La solubilización de fosfato de calcio se determinó en los medios Pikovskaya (PVK) y National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) agarizados (Nautiyal, 1999). La actividad catalasa se evidenció en portaobjetos de vidrio con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% (v/v) para observar desprendimiento de oxígeno (Cappuccino y Sherman, 1992). La actividad endoglucanasa se evaluó en el medio suplementado con carboxi metil celulosa (CMC) agarizado revelado con una solución de rojo congo 1% y diferenciado con NaCl 1M. La actividad quitinasa se determinó en el medio agarizado quitina-peptona conteniendo quitina coloidal al 0,2 %. Se determinó la actividad proteolítica

usando un medio de cultivo con leche descremada al 10% (p/v). La actividad fitasa se estudió incubando los aislamientos en medios agarizados suplementados con fitato de sodio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización de la microbiota endofítica

La diversidad de microorganismos que coloniza un determinado hospedero depende de muchos factores como la variedad de caña de azúcar estudiada y las condiciones climáticas a las que se

encuentran expuestos los cultivos. Bajo las condiciones utilizadas, se obtuvieron 206 aislamientos de bacterias endofíticas en los medios DYGS, MA, Nfb, NA y King B a partir de plantas de caña de azúcar var. LCP 85-384. Como se muestra en la Tabla 1, utilizando los medios MA, Nfb, NA y King B los mayor porcentajes de aislamientos se obtuvieron a partir de muestras de nodos (35,14%, 33,33%, 45,45% y 49,94%, respectivamente). Por el contrario, la utilización del medio DYGS reportó el mayor porcentaje de aislamientos para

Tabla 1

Aislamiento de microorganismos endofíticos de caña de azúcar.

Medio	Muestras*				TOTAL
	Hojas	Raíces	Apoplasto	Nodo	
King B	11	8	7	23	49
	22,45%	16,33%	14,29%	46,94%	100%
AN	9	3	12	20	44
	20,45%	6,82%	27,27%	45,45%	100%
Nfb	8	5	9	11	33
	24,24%	15,15%	27,27%	33,33%	100%
DYGS	12	9	5	6	32
	37,50%	18,13%	15,63%	18,75%	100%
MA	5	11	8	13	37
	13,51%	29,73%	21,62%	35,14%	100%
TOTAL	47	36	43	80	206
	22,82%	17,48%	20,87%	38,33%	100%

a: Cantidad de aislamientos obtenidos de cada muestra y subporcentajes correspondientes.

las muestras de hojas (37,50%). Estas diferencias pueden deberse a las características propias de cada microorganismo y de cada nicho ecológico. Por ejemplo, se ha sugerido que en los nodos de la caña de azúcar, el denso tejido parenquimatoso y con alto contenido de sacarosa proveería de una baja pO_2 y acceso a una rica fuente de energía que podría favorecer la colonización por determinados microorganismos (James, 1994). Por otro lado,

el medio sintético MA posee metanol como única fuente de carbono y energía, por lo que permite el aislamiento de bacterias metilotróficas. Como se indica en la Tabla 1, el 18,97% de aislamientos fueron obtenidos en medio MA, estando principalmente representados en los nodos (35,14%) y en las raíces (29,73%). Sycol. demostraron que la metilotrofia le confiere a *Methylobacterium extorquens*, la bacteria metilotrófica más caracterizada, ventajas para colonizar la

superficie de las partes aéreas de las plantas hospederas (Sy, 2005). Sin embargo hasta el momento no se conoce la importancia de esta característica fisiológica para colonizar los tejidos vegetales internos. Mediante la coloración de Gram el 49% de los aislamientos obtenidos se clasificó como Gram positivos y el 28% como Gram negativos. Los aislamientos que no presentaron una coloración definida fueron clasificados como Gram variables y representaron el 7%. A su vez, el 5% de los microorganismos no respondió a la

coloración de Gram y fueron catalogados como no coloreados. Resultados similares fueron publicados por Bredow y colaboradores al analizar la microbiota endofítica de cultivos de café, maíz, poroto, tomate, uva y caña de azúcar (Bredow, 2015). En ese reporte, el análisis del gen 16S rDNA de las bacterias de la caña de azúcar, dio a conocer la prevalencia de organismos Gram positivos, en particular, pertenecientes al género *Bacillus*. Sin embargo, esto está en contraste con los datos obtenidos del último microbioma publicado de la caña

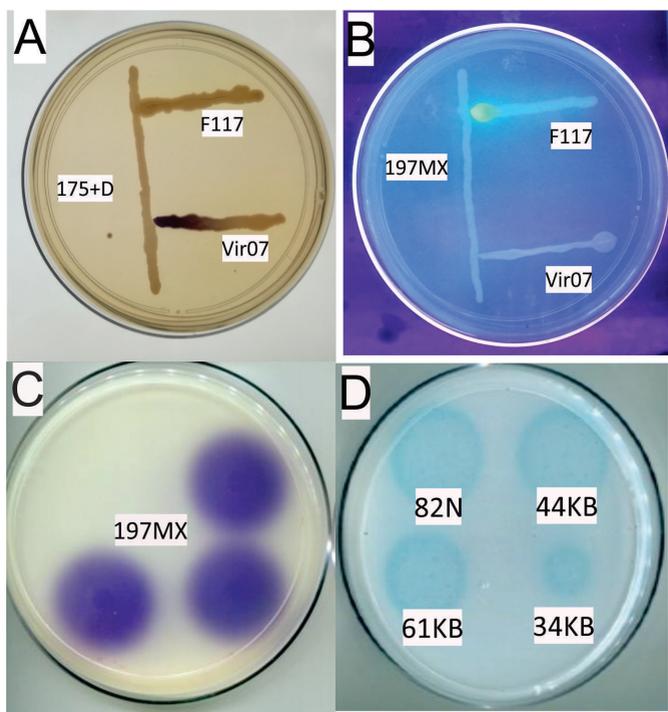


Figura 1 Detección de la producción de AHLs mediante bioensayos. Los aislamientos a analizar se sembraron en perpendicular a las cepas biosensoras. A, la inducción de la producción de violaceína en *C. violaceum* Vir07 por el aislamiento 175D puede observarse a simple vista. Este aislamiento no da resultados positivos con la cepa biosensora *C. violaceum* CV026. B, la inducción de GFP en *P. putida* F117 (pKR-C12) por el aislamiento 197MX se determina bajo iluminación UV. C, La inducción de la producción de violaceína en *C. violaceum* Vir07 por este aislamiento solo es detectable utilizando extractos orgánicos. La imagen muestra 3 extractos obtenidos de manera independiente del aislamiento 197MX. D, inducción de actividad β -galactosidasa en *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) por extractos orgánicos de cuatro aislamientos.

de azúcar, en los que se encontró que la microbiota bacteriana de los tejidos internos de hojas y tallo estaban enriquecidos por microorganismos pertenecientes a los órdenes Enterobacteriales y Pseudomonadales, es decir bacterias Gram negativas (De Souza, 2016). Una característica importante a considerar al momento de analizar la carga microbiana de un cultivo es la edad del mismo. Se conoce, que la etapa del desarrollo del cultivo de la caña de azúcar posee una gran incidencia en la variabilidad de la comunidad microbiana endófito (De Souza, 2016); en las etapas tempranas del crecimiento, ésta es similar a la edáfica, y a medida que la planta se desarrolla, existe una variación en la diversidad de microorganismos en los distintos tejidos. Las plantas de caña de azúcar a partir de las cuales se obtuvieron los aislamientos para el desarrollo del presente trabajo, corresponden a cañas soca 3, es decir que son cultivos con 3 años de edad. Los trabajos anteriormente citados en los que se realizaron estudios en caña de azúcar no especifican la edad de las mismas, sugiriendo que la diferencia o similitud planteada podría estar relacionada con la antigüedad del cultivo.

Producción de AHLs por aislamientos endofíticos de caña de azúcar

La capacidad de sintetizar AHLs por los aislamientos identificados como Gram negativos o Gram variable se determinó en el mismo medio de cultivo en el que fueron aislados mediante bioensayos utilizando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* VirR07, *P. putida* F117 (pKR-C12) y *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4). Los bioensayos permitieron detectar 7 aislamientos

capaces de producir AHLs en las condiciones ensayadas, representando el 3,4% del total de aislamientos, y el 9,7% del total de aislamientos Gram negativos y Gram variables. La detección con *C. violaceum* CV026 de las AHLs producidas por 82N pudo ser detectada al sembrarse directamente el aislamiento de forma perpendicular a la cepa biosensora (resultados no mostrados). De igual manera, la cepa biosensora *C. violaceum* Vir07 permitió detectar las AHLs producidas por 175D (Fig. 1A). El uso de esta estrategia también mostró resultados positivos con la cepa biosensora *P. putida* F117 (pKR-C12) (Fig. 1B). Sin embargo, para el aislamiento 197MX se requirió el uso de extractos orgánicos para poderse evidenciar resultados positivos con *C. violaceum* Vir07 (Fig. 1C). Esta diferencia puede deberse a una menor producción de AHLs, o bien a AHLs diferentes, para las cuales la cepa biosensora podría tener menor sensibilidad. Por ejemplo, en comparación a las AHLs con 6 carbonos en la cadena acilada, *C. violaceum* Vir07 es 10 veces más sensible a AHLs con 10 carbonos (20). El análisis de extractos orgánicos de otros aislamientos, como 34KB, 44KB, 61KB y 82N (Fig. 1D) mostró que los mismos eran capaces de inducir actividad β -galactosidasa en *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4). Esta cepa biosensora sobreexpresa el gen que codifica para el receptor TraR de AHLs (7), por lo que muestra una gran sensibilidad para diferentes AHLs. Esto sugiere que estos aislamientos producen AHLs en concentraciones menores a los de otros, como 175D que no requiere de la preparación de extractos orgánicos concentrados. Como se indica en la Tabla 2, cuatro de los aislamientos se obtuvieron de muestras de nodos, y tres

a partir de muestras de raíces, sin que se hayan aislado microorganismos productores de AHLs a partir de líquidos apoplásticos o de hojas. El bajo porcentaje obtenido en este trabajo es contrastable con lo publicado sobre el microbioma endofítico de la caña de azúcar, que muestra la presencia de muchos géneros de bacterias identificados como productores de AHLs, tales como *Acetobacter*, *Acinetobacter*,

Bradyrhizobium, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Rhizobium*, etc. (De Souza, 2016). Estas diferencias pueden deberse a diversos factores asociados al hospedero en particular.

En nuestro trabajo se analizó la variedad de caña LCP 85-384, mientras que el estudio sobre la microbiota se realizó en la variedad SP80-3280. Esto, sumado a los diferentes estadios en los que se encontraban las plantas analizadas y su

Tabla 2

Identificación de aislamientos endofíticos productores de AHLs.

Aislamiento	Muestra ^a	Bioensayo ^b				Genbank ^c	Identificación presuntiva ^d	N° de acceso ^e
		CV026	NtL4	Vir07	F117			
175D	Raíz	-	++	++	-	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	MG062739
82N	Raíz	++	++	-	-	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia</i> sp.	MG062740
197MX	Nodo	-	++	++	++	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.	MG062741
44KB	Nodo	-	++	-	-	<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Pantoea</i> sp.	MG062742
61KB	Nodo	-	++	-	++	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.	MG062743
185MX	Raíz	-	++	-	-	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.	MG062744
34KB	Nodo	-	++	-	-	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.	MG062745

a: Origen de los aislamientos

b: Bioensayos con las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NtL4 (pZLR1), *C. violaceum* Vir07 y *P. putida* F117 (pKR-C12). ++: resultado positivo; -: resultado negativo.

c: Entrada en la base de datos Genbank con la que la secuencia parcial del gen 16S ADNr mostró mayor identidad.

d: Identificación presuntiva asignada en el presente trabajo para cada aislamiento.

e: Número de acceso para la secuencia parcial del gen 16S ADNr de cada aislamiento.

estado fisiológico, las condiciones de cultivo y las condiciones climáticas, puede explicar al menos parcialmente estas diferencias. Por ejemplo, se ha demostrado que la utilización de fertilizantes nitrogenados altera la presencia de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, una bacteria endofítica modelo de caña de azúcar (Fuentes-Ramírez, 1999). Por otro lado, la presencia de un sistema de *quorum sensing*, sus características y los fenotipos regulados por él dependen de cada microorganismo en particular. Es posible entonces que las condiciones en las que se encontraban las plantas analizadas en este trabajo hayan ejercido una presión de selección determinando la

presencia de un bajo porcentaje de microorganismos con este sistema regulatorio.

Identificación de los aislamientos productores de AHLs

La secuenciación parcial del gen 16S ADNr permitió clasificar a los aislamientos productores de AHLs a nivel de género (Tabla 2). Los aislamientos obtenidos de raíz fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Burkholderia* (175D), *Erwinia* (82ND) y *Agrobacterium* (185MX). En muestras de nodo se identificaron a aislamientos pertenecientes a los géneros *Agrobacterium* (197MX, 61KB y 34KB) y

Pantoea (44KB). *Burkholderia* es un género muy estudiado no solo como patógeno humano sino también por su estrecha relación con diversas plantas. La comparación con las secuencias depositadas en Genbank sugieren que el aislamiento 175D pertenecería al complejo *Burkholderia cepacia* (BCC), el cual se caracteriza por presentar interacciones fitopatogénicas con sus hospederos (Zhang y Birch, 1997). Sin embargo, en el grupo BCC también se han descrito microorganismos benéficos para el crecimiento vegetal, como *B. vietnamiensis* que tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas (Zuárez-Moreno, 2012). *Erwinia* y *Pantoea* son dos géneros filogenéticamente relacionados entre sí y estrechamente asociados a las plantas. El primero ha sido descrito generalmente como fitopatógeno, causante de enfermedades necróticas en árboles frutales y la podredumbre blanda en papaya y zanahoria (Whitehead, 2002). Por el contrario, el género *Pantoea* presenta especies con efectos tanto benéficos como perjudiciales sobre los vegetales (Walterson y Stavrínides, 2015). El aislamiento 44KB mostró gran identidad a nivel de la secuencia del gen 16S ADNr con *P. dispersa*, un microorganismo que ejerce un efecto positivo sobre la caña de azúcar al detoxificar una serie de fitotoxinas y antibióticos conocidos como albicidinas producidas por *Xanthomonas albilineans* (Zhang L., Birch, 1997). *Agrobacterium* es un género asociado a la formación de tumores en diversos cultivos, debido a que poseen un plásmido de virulencia denominado pTi. Sin embargo, existen también muchos aislamientos avirulentos carentes de

este plásmido (Lang y Faure, 2014). Más aun, algunos han demostrado ser benéficos para los vegetales, como *A. radiobacter*. En los aislamientos de microorganismos patógenos de estos géneros, la descripción de sus sistemas de QS mostró que los mismos son de importancia para la colonización y virulencia (Venturi y Fuqua, 2013). Sin embargo, no se han descrito mecanismos de QS en aislamientos benéficos para plantas de estos géneros.

Caracterización *in vitro* de los microorganismos endofíticos productores de AHLs

Los microorganismos que colonizan las plantas presentan fenotipos que le permiten la colonización y sobrevivencia. Estas características pueden resultar benéficas o perjudiciales para el hospedero. La caracterización *in vitro* de los aislamientos endofíticos productores de AHLs mostró que, salvo *Agrobacterium* sp. 185 MX, todos produjeron sideróforos en las condiciones utilizadas (Tabla 3). Los sideróforos son metabolitos secundarios secretados al medio que permiten captar el hierro. En general, su producción se relaciona con un efecto positivo indirecto sobre el crecimiento vegetal ya que, al captarlo, disminuyen su disponibilidad para otros microorganismos fitopatógenos. Ninguno de los aislamientos produjo cianuro de hidrógeno (HCN) ni mostró actividad quitinasa (Tabla 3). La producción de HCN a partir de la glicina como precursor inmediato, es un factor clave en la inhibición de microorganismos fitopatógenos. No existen reportes de producción de HCN por microorganismos de los géneros *Agrobacterium* ni *Erwinia*, pero sí en

Rhizobium, una especie estrechamente relacionada al primero (Blumer y Haas, 2000). En *Burkholderia*, su producción parece depender de las condiciones de cultivo y de la especie analizada (Gilchrist, 2013). Todos los aislamientos fueron capaces de llevar a cabo la amonificación de los aminoácidos del medio de cultivo, lo que podría ser benéfico para el crecimiento vegetal (Tabla 3). Sin embargo, existen reportes que sugieren que una gran capacidad para realizar este proceso sería perjudicial para la planta hospedera (Weise, 2013). De la misma manera, todos mostraron actividad endo-

glucanasa. Esta actividad enzimática podría facilitar la colonización microbiana de la caña de azúcar, como se demostró en otros microorganismos (Saile, 1997). Entre los aislamientos de *Agrobacterium*, no se detectó actividad catalasa en *Agrobacterium spp.* 61KB y 185MX. Este es un género de microorganismos aeróbicos obligados, por lo que es esperable que presenten actividad catalasa. Se ha demostrado que poseen al menos dos enzimas catalasas, siendo una inducible por extractos vegetales (KatA) y la otra dependiente de la fase de crecimiento (CatE) (Prapagdee, 2004). Es posible

Tabla 3

Caracterización de aislamientos endofíticos productores de AHLs.

Aislamiento	Sideróforos	HCN	Cat ^a	NH ₄ ⁺ ^b	EGC ^c	Quit ^d	Prot ^e	Fit ^f	PO ₄ ³⁻ ^g	Poliam ^h
175D	++	-	++	++	++	-	++	++	++	-
82N	++	-	++	++	++	-	-	++	-	-
197MX	++	-	++	++	++	-	-	-	-	++
44KB	++	-	++	++	++	-	-	++	-	-
61KB	++	-	++	++	++	-	-	-	-	++
185MX	-	-	-	++	++	-	-	-	-	++
34KB	++	-	++	++	++	-	-	++	-	-

a: Actividad catalasa. b: Amonificación por producción de NH₄⁺. c: Actividad endoglucanasa. d: Actividad quitinasa. e: Actividad proteasa. f: Actividad fitasa. g: Solubilización de PO₄³⁻. h: Producción de poliaminas.
 ++: resultado positivo; -: resultado negativo.

entonces que bajo las condiciones empleadas en este trabajo no haya sido posible detectar esta actividad que los aislamientos sí son capaces de producir. Se ha propuesto que en los microorganismos fitopatógenos, la actividad catalasa les permitiría hacer frente al efecto oxidante del H₂O₂, uno de los principales componentes del sistema de defensa vegetal: durante el proceso de infección, la planta responde aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno, en particular el H₂O₂. En los microorganismos benéficos, la actividad catalasa ayudaría a aliviar el estrés oxidativo que sufre la planta en ciertas circunstancias. La producción de poliaminas solo se detectó en los

aislamientos de *Agrobacterium spp.* 197MX, 61KB y 185MX. La síntesis de estos metabolitos es considerada como benéfica para el crecimiento vegetal ya que permitiría mitigar el estrés osmótico (Vurukonda, 2016). Es interesante remarcar que salvo *Burkholderia sp.* 175D, los aislamientos no fueron capaces de solubilizar sales insolubles de fosfato, esperables de encontrarse en el suelo, pero sí de hidrolizar fitato de sodio, el cual puede ser una fuente de fósforo de origen vegetal.

Conclusiones

La presencia de sistemas de *quorum sensing* en microorganismos endofíticos de caña de azúcar sugiere que los

mismos podrían ser de importancia para la colonización de la planta hospedera. Esto, sumado a las características que los mismos presentan, indica que estos microorganismos son de importancia para el estudio de las interacciones mediadas por estos sistemas regulatorios que ellos llevan a cabo entre sí y con la planta. La descripción detallada de sus sistemas de *quorum sensing* permitirá en un futuro dilucidar también la influencia de estos mecanismos regulatorios sobre las características necesarias para la colonización y sobrevivencia en los tejidos vegetales.

Agradecimientos

Este trabajo se financió mediante los subsidios PIP 946 (CONICET) y PIUNT D/509 (SCAIT, UNT). Se agradece el apoyo de la Dra. Laura Tórtora por proveer las plantas de caña de azúcar utilizadas en este trabajo.

Referencias

Baldani J.I., Reis V.M. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from nonleguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384:413–431.

Bertini E.V., Nieto Peñalver C.G., Leguina A.C., Irazusta V.P., Castellanos de Figueroa L.I. 2014. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 possesses an active quorum sensing regulatory system. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:497–506.

Bhardwaj D., Ansari M.W., Sahoo R.K., Tuteja N. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb. Cell Fact.* 13:1–10.

Blumer C., Haas D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173:170–177.

Bredow C., Azevedo J., Pamphile J., Mangoli C., Rhoden S. 2015. In silico analysis of the 16S rRNA gene of endophytic bacteria, isolated from the aerial parts and seeds of important agricultural crops. *Genet. Mol. Res.* 14:9703–9721.

Cappuccino J., Sherman. 1992. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York.

Cha C., Gao P., Chen Y.C., Shaw P.D., Farrand S.K. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe*

Interact. 11:1119–29.

Cloete K.J., Valentine A.J., Botha A. 2009. Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous medicinal shrub, *Agathosma betulina* (Berg .) Pillans. *Microb. Ecol.* 57:624–632.

De Souza R.S., Okura V.K., Armanhi J.S., Jorrín B., Lozano N., da Silva M.J., González-Guerrero M., Araújo L.M., Verza N.C., Bagheri H.C., Imperial J. 2016. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci. Rep.* 6:28774.

Fuentes-Ramírez L., Caballero-Mellado J., Sepúlveda J., Martínez-Romero E. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29:117–128.

Fuqua C., Greenberg E.P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:685–95.

Gilchrist F., Sims H., Alcock A., Jones A., Bright-Thomas R., Smith D., Španěl P., Webb K., Lenney W. 2013. Is *hydrogen cyanide* a marker of Burkholderia cepacia complex? *J. Clin. Microbiol.* 51:3849–3851.

James E., Reis V., Olivares F., Baldani J., Döbereiner J. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* 45:757–766.

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin.*

Med. 44:301–307.

Lalande R., Bissonnette N., Coutlée D., Antoun H. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil* 115:7–11.

Lang J., Faure D. 2014. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* 5:14.

McClellan K., Winson M., Fish L., Taylor A., Chhabra S.M.C., Daykin M., Lamb J., Swift S., Bycroft B., Stewart G., Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143:3703–3711.

Mensi I., Daugrois J., Pieretti I., Gargani D., Fleites L., Noell J., Bonnot F., Gabriel D., Rott P. 2016. Surface polysaccharides and quorum sensing are involved in the attachment and survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves. *Mol. Plant Pathol.* 17:236–246.

Millar R., Higgins V. 1970. Association of cyanide with infection of birdsfoot trefoil by *Stemphylium loti*. *Phytopathology* 60:104–110.

Morohoshi T., Kato M., Fukamachi K., Kato N., Ikeda T. 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol. Lett.* 279:124–30.

Nautiyal C. 1999. An efficient microbiological growth medium for

- screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:265–270.
- Prapagdee B., Eiamphungporn W., Saenkham P., Ongkolsuk S., Vattanaviboon P. 2004. Analysis of growth phase regulated KatA and CatE and their physiological roles in determining hydrogen peroxide resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237:219–226.
- Riedel K., Hentzer M., Geisenberger O., Huber B., Steidle A., Wu H., Hoiby N., Givskov M., Molin S., Eberl L. 2001. N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147:3249–3262.
- Saile E., McGarvey J., Schell M., Denny T. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87:1264–1271.
- Schwyn B., Neilands J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47–56.
- Sy A., Timmers A.C., Knief C., Vorholt J.A. 2005. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7245–7252.
- Tempé J., Petit A., Holsters M., van Montagu M., Schell J. 1978. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:2848–2849.
- Venturi V., Fuqua W.C. 2013. Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:17–37.
- Vurukonda S., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 184:13–24.
- Walterson A., Stavrinides J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:968–984.
- Weise T., Kai M., Piechulla B. 2013. Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PLoS One* 8:e63538.
- Whitehead N., Byers J., Commander P., Corbett M., Coulthurst S., Everson L., Harris A., Pemberton C., Simpson N., Slater H., Smith D., Welch M., Williamson N., Salmond G. 2002. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:223–232.
- Zhang L., Birch R. 1997. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *J. Appl. Microbiol.* 82:448–454.
- Zuárez-Moreno Z., Caballero-Mellado J., Coutinho B., Mendonça-Previato L., James E., Venturi V. 2012. Common

features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb. Ecol.* 63:249–266.