

**PROCESO DE COLONIZACIÓN DE TEJIDOS DE *ORYZA SATIVA* Y *ORYZA
GLUMAEPATULA*, POR BACTERIAS ENDOFÍTICAS TRANSFORMADAS CON
PROTEÍNAS AUTOFLUORESCENTES**

LUIS CARLOS RAMOS PÁEZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
CALI
2015**

**PROCESO DE COLONIZACIÓN DE TEJIDOS DE *ORYZA SATIVA* Y *ORYZA
GLUMAEPATULA*, POR BACTERIAS ENDOFÍTICAS TRANSFORMADAS CON
PROTEÍNAS AUTOFLUORESCENTES**

LUIS CARLOS RAMOS PÁEZ

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
PREGRADO EN BIOLOGÍA**

Tutor
Dra. Thaura Ghneim Herrera
Laboratorio de Fisiología Vegetal
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad ICESI

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
CALI
2015**

AGRADECIMIENTOS

En este proyecto de grado fueron numerosas las personas que me apoyaron, e intervinieron en este proceso de formación, a las cuales quiero dar mis más sinceros agradecimientos. Agradezco especialmente a Eliana Torres por haberme compartido sus conocimientos y experiencia; sin su dedicación, empeño y consejos no hubiera podido avanzar en este proyecto. A mi tutora Thaura Ghneim no solo le agradezco, sino la admiro, por su esfuerzo, dedicación, y compromiso con sus estudiantes.

A mis amigos y compañeros de la Universidad les agradezco su apoyo y acompañamiento en este proceso de formación. A mi gran amiga Juliana Chaura, por su apoyo incondicional no solo en este proyecto, sino en toda mi carrera. A Sebastian Jojoa, Alexandra Peña, Alejandra Londoño y la profesora Duina Posso, por sus consejos y colaboración.

Agradezco a la facultad de ciencias naturales y trabajadores de la Universidad Icesi, que colaboraron con el desarrollo de mi proyecto. A los profesores de mi carrera, los cuales me enseñaron y me guiaron por todo este proceso. Y finalmente, sin menos valor, a mí mamá, le agradezco por luchar arduamente para brindarme esta gran oportunidad de estudiar esta hermosa carrera.

Tabla de contenido

1. Resumen del proyecto.....	6
2. Introducción	5
3. Descripción del proyecto.....	6
3.1 Planteamiento del problema	6
3.2 Marco teórico y estado del arte	8
3.2.1 Arroz e importancia agronómica en Colombia y en mundo.	8
3.2.2 Impacto del uso de fertilizante el medio ambiente.....	8
3.2.3 Bacterias endófitas como alternativa para reducir el uso de fertilizantes.....	9
3.3.4 La interacción genotipo-ambiente y su impacto sobre la colonización.....	11
3.2.5 Técnicas de estudios del proceso de colonización de bacterias endófitas	12
3.3 Objetivos.....	15
3.3.1 Objetivo general.....	15
3.3.2 Objetivos específicos	15
3.4 Metodología.....	17
3.4.1 Estandarización de un protocolo de transformación de bacterias endófitas	17
3.4.2 Confirmación de transformación bacteriana y emisión de fluorescencia	18
3.4.3 Diseño y optimización de un sistema de crecimiento para plántulas de arroz.....	20
3.4.4 Determinación de concentración óptima de inóculo bacteriano, medio y condiciones de crecimiento	20
Matriz de marco lógico.....	23
3.5 Resultados.....	26
3.6 Discusión	44
3.7 Conclusiones	55
3.8 Recomendaciones	56
4. Referencias.....	57
5. Anexos.....	62
5.1 Medios de crecimiento	64
5.2 Protocolos utilizados.....	666

Lista de tablas

Tabla 1. Bacterias seleccionadas para marcaje con proteínas autofluorescentes.....	17
Tabla 2. Combinación de parámetros aplicados para inducir la expresión de las proteínas en las bacterias transformadas con AFPs.....	19
Tabla 3. Medios nutritivos utilizados para el cultivo de plántulas de <i>Oryza glumaepatula</i>	21
Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima de ampicilina para las cepas bacterianas seleccionadas, establecida mediante epsilometría	26
Tabla 5. Medios de crecimiento evaluados y seleccionados para las diferentes cepas bacterianas.....	28
Tabla 6. Medidas de absorbancia tomadas después de 24 horas de inoculación de los medios con <i>Pantoea</i> SOG04 transformada con pmCherry.....	43

Lista de figuras

Figura 1. PCR de colonia de las bacterias que fueron transformadas con proteínas autofluorescentes	30
Figura 2. Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria <i>Rhizobium</i> transformada con pRSET-EmGFP crecida en medio LB.....	32
Figura 3. Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria <i>E. coli</i> transformada con pmCherry.....	33
Figura 4. Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria <i>Pantoea</i> transformada con pmCherry.....	34
Figura 5. Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria <i>E. coli</i> transformada con pRSET-EmGFP.....	35
Figura 6. Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria <i>Rhizobium</i> transformada con pRSET-EmGFP crecida en medio YEMB.....	36
Figura 7. Imágenes de las diferentes bacterias transformadas con AFPs, bajo constante excitación de luz fluorescente.....	37
Figura 8. Sistemas de crecimiento para plántulas de arroz.....	40
Figura 9. Imágenes de raíz principal de plántula de arroz creciendo en el montaje seleccionado.	41
Figura 10. Plántulas de <i>Oryza glumaepatula</i> que se desarrollaron en diferentes soluciones nutritivas	42

Lista de abreviaturas

AFP: Auto-Fluorescent Protein, **GFP:** Green Fluorescent Protein, **EmGFP:** Emerald Green Fluorescent Protein, **IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, **PCR:** Polymerase chain reaction, **LB:** Luria Broth medium, **YEMB:** Yeast Mannitol Medium

1. Resumen del proyecto

Dado el crecimiento notable de la población humana, la seguridad alimentaria se ha visto cada vez más comprometida. Por lo anterior, se prevé que en los próximos años, se intensificará la agricultura, sobre todo en países en vía de desarrollo como Colombia, incrementándose de manera significativa el uso de agroquímicos en los cultivos, lo cual tiene implicaciones para el medio ambiente y la salud humana.

El uso de bacterias endófitas es una herramienta potencial para disminuir la aplicación de fertilizantes químicos en cultivos de arroz, dada su función en la promoción del crecimiento vegetal. Diferentes estudios han demostrado la efectividad de las bacterias endófitas como herramientas agronómicas. En arroz, se ha estudiado la colonización por parte de algunos rizobios y otras especies de diazotrofos (*Serratia marcescens*, *Herbaspirillum sp.*, *Klebsiella spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium leguminosarum* y *Pseudomonas spp.*, *Azoarcus spp.*, *Burkholderia vietnamiensis*, entre otros) (James & Olivares, 1998, & Gyaneshwar, et.al, 2001). También se ha demostrado el efecto integrado de bacterias endofitas (*Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chroococcum*) junto con diferentes niveles de fertilizantes químicos (NPK) sobre el crecimiento, y se observó un mejor resultado disminuyendo la cantidad de fertilizantes (Roy & Srivastava, 2013). Sin embargo, para entender el funcionamiento y explotar este potencial, es necesario identificar los factores que regulan la colonización de los tejidos por parte de estas bacterias, y para ello se debe estandarizar una metodología que permita el estudio de la colonización.

En este proyecto se estandarizaron las condiciones necesarias para desarrollar el estudio del proceso de colonización de tejidos de arroz por parte de bacterias endófitas. Se transformaron bacterias endófitas pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Pantoea* aisladas de los tejidos de la especie silvestre de arroz *Oryza glumaepatula* con proteínas autofluorescentes, mediante la modificación de diferentes protocolos de transformación. Se determinó la concentración de IPTG óptima para inducir la expresión de la proteína y se adaptó un nuevo sistema de crecimiento de plántulas que permite el crecimiento de forma individual y el desarrollo radicular en un sistema completamente estéril, además de permitir la visualización directa de las estructuras de la raíz al microscopio. Por otro lado, se determinó la concentración de inóculo bacteriano, los medios y condiciones de crecimiento necesarias para que se pueda dar la colonización en este sistema.

Palabras clave: Bacterias endófitas, transformación, microscopia de epifluorescencia

Summary

Given the remarkable growth of the human population, food security has been increasingly compromised. Therefore, it is expected that agriculture will intensify, especially in developing countries like Colombia, increasing significantly the use of agrochemicals on crops, which has implications for the environment and human health.

Use of endophytic bacteria is a potential tool for reducing the use of agrochemicals fertilizers in rice, given their role in promoting growth. Different studies have shown the effectiveness of endophytic bacteria as agricultural tools. In rice, several studies showed colonization by some rhizobia and other diazotroph species (*Serratia marcescens*, *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Pantoea agglomerans*, and *Pseudomonas* spp *Rhizobium leguminosarum*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia vietnamiensis*, etc.) (James & Olivares, 1998, & Gyaneshwar, et.al, 2001). It has also been shown the integrated effect of endophytic bacteria (*Azospirillum brasilense* and *Azotobacter chroococcum*) with different levels of chemical fertilizers (NPK) on growth and a better result was observed decreasing the amount of fertilizer (Roy & Srivastava, 2013). However, to understand the operation and exploit this potential, it is necessary to identify the factors that regulate tissue colonization by these bacteria, but first a methodology for the study of colonization must be standardized.

In this project, we standardized a set of experimental conditions to allow the study of the colonization process. Bacteria of the genera *Rhizobium* and *Pantoea* were transformed with autofluorescent proteins by modifying different protocols. Optimal IPTG concentration was determined to induce protein expression and a new seedling growth system was developed which allows root development of seedlings in an isolated and completely sterile system, and also let direct visualization of structures of the root in the microscope. As well, the concentration of bacterial inoculum, medium and growth conditions was determined.

Keywords: endophytic bacteria, transformation, epifluorescence microscopy

2. Introducción

Asegurar la disponibilidad de alimento dado el incremento notable de la población humana se ha convertido en un objetivo a nivel mundial, por lo tanto, se han desarrollado diferentes herramientas agronómicas en especies de cultivo como el maíz, trigo y arroz (Fresco, 2003). El arroz representa uno de los alimentos de mayor consumo en el mundo, especialmente en países en desarrollo como Colombia (IRRI, 1998). Sin embargo, uno de los factores limitantes del crecimiento en el arroz es la disponibilidad de nutrientes, particularmente el nitrógeno, lo cual es manejado empleando gran cantidad de fertilizantes (FAO, 2014).

El uso de estos compuestos se ha incrementado tanto en Colombia como en el resto del mundo debido a la creciente expansión de la agricultura. El uso excesivo de estos compuestos conlleva a efectos negativos en el medio ambiente, especialmente en el suelo y el agua; lo cual puede traer un riesgo incluso para la salud humana (FAO, 1997). Es por ello que actualmente, hay un enfoque de desarrollo de diferentes técnicas biológicas aplicadas a la agricultura, como el mejoramiento genético y el uso de bacterias endófitas (Perez & Chamorro, 2013).

Diferentes estudios han señalado el gran potencial de las bacterias endófitas como una nueva herramienta agronómica, capaz de influir significativamente en la promoción del crecimiento vegetal (Beracochea, 2011; Chi, et al., 2005; James & Olivares, 1998; de Bashan, Holguin, & R. Glick, 2007). También ha señalado el uso de estas bacterias como alternativa para reducir el uso de fertilizantes, mediante la fijación de nitrógeno atmosférico (Yanni & Dazzo, 2010). Sin embargo, no se ha estudiado a profundidad algunos de los factores que afectan el éxito de la colonización en cultivos de arroz, como la especificidad genotípica, condiciones hormonales, edad de la planta, condiciones nutricionales, etc.

Para estudiar la colonización de bacterias endófitas se han implementado técnicas tradicionales como el aislamiento en medio de cultivo, lo cual ha arrojado buenos resultados en detección y caracterización de los grupos bacterianos presentes. Sin embargo, esta técnica no determina la localización específica de las bacterias en el tejido donde se establecen; se han desarrollado metodologías que permiten la visualización directa de las bacterias que colonizan los tejidos, como por ejemplo, la transformación de bacterias con proteínas autofluorescentes y posterior visualización de los tejidos en el microscopio de fluorescencia, la cual ofrece la ventaja de observar no solo la localización específica de las bacterias sino evaluar el proceso completo de migración bacteriana. En este proyecto se han establecido las condiciones necesarias para estudiar el proceso de colonización por parte de bacterias del género *Rhizobium* y *Pantoea* marcadas con proteínas autofluorescentes en tejidos de las especies de arroz, *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*.

3. Descripción del proyecto

3.1 Planteamiento del problema

Debido al incremento notable de la población humana, y a los cambios globales a nivel económico, político, social y ambiental, la seguridad alimentaria se ha visto cada vez más comprometida. Asegurar la disponibilidad de alimentos es una de las prioridades, no solo a nivel nacional, sino también un reto a nivel mundial. El arroz es uno de los principales alimentos consumidos en el mundo, especialmente en países de Asia, África y Latinoamérica (IRRI, 1998). Para el año 2010, en Colombia el consumo *per capita* total de arroz fue de 39 kg y se produjeron 2'099.195 toneladas (Fedearroz, 2014).

Entre los objetivos principales de organizaciones nacionales e internacionales como el CIAT, IRRI y Fedearroz, se encuentra: incrementar la productividad, tener sistemas de producción más sustentables y de menor impacto ambiental, y desarrollar estrategias de adaptación frente al cambio climático. Una de las problemáticas de mayor relevancia en este sector, es el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, que afectan no solamente la salud humana, sino también recursos como el suelo, agua y las interacciones ecológicas.

El nitrógeno es uno de los mayores factores limitantes para el crecimiento de la planta de arroz, por lo tanto, anualmente se aplican grandes cantidades de fertilizantes para suplir este nutriente. En Colombia, se consumieron 578.6 kg/ha entre el 2009 y el 2011 en fertilizantes NPK (The World Bank Group, 2014). Para el 2020, se demandará por lo menos el doble de la cantidad de fertilizantes de nitrógeno (Gyaneshwar et al., 2001).

El uso excesivo de nitrógeno en cultivos de arroz, puede resultar en un incremento de malas hierbas y plagas afectando negativamente la producción (FAO, IFA, 2002). Además si no se usa adecuadamente, puede generar un desequilibrio de nutrientes en el suelo, afectando principalmente la disponibilidad de fósforo y potasio (FAO, IFA, 2002), en consecuencia el agricultor debe aplicar fertilizantes complejos y balanceados que normalmente son costosos. Debido a esto, diferentes estrategias alternativas se están aplicando para disminuir el uso de fertilizantes químicos en estos cultivos. Entre esas estrategias se encuentran el uso de organismos biológicos para promover el crecimiento vegetal, el mejoramiento genético y la evaluación de variedades genéticas que exhiban una mayor productividad (Perez & Chamorro, 2013).

La estrategia basada en el uso de organismos biológicos para disminuir el consumo de estos fertilizantes, incluye la utilización de bacterias endófitas. Estos microorganismos pueden apoyar al crecimiento y salud de la planta mediante el incremento de la disponibilidad de nutrientes, inducción de mecanismos de defensa, producción de antibióticos, competencia con patógenos o aporte de sustancias promotoras de crecimiento (Compant et al., 2005). Este efecto simbiótico se evidencia de manera natural en las leguminosas, las cuales tienen la capacidad de crecer sin fertilización nitrogenada gracias a su asociación simbiótica con rizobios, lo cual ahorra millones de euros al año en fertilizantes a los agricultores (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). En consecuencia, diferentes estudios se han adelantado en especies comerciales, principalmente cereales como el maíz, arroz y en caña de azúcar (James E. K., 2000) .

En arroz, se ha estudiado el efecto de la colonización de diferentes cepas endófitas. Chi et. al 2005, observaron que las plantas de arroz que fueron inoculadas con rizobios, exhibían un incremento significativo del número de raíces, biomasa del tallo, tasa fotosintética, eficiencia del uso del agua, y mayores niveles acumulados de ácido indolacético (IAA) y giberilinas que promovían el crecimiento vegetal. Este y otros estudios han demostrado que las bacterias endófitas pueden sustituir en gran medida el uso de agroquímicos, ya que no solo favorecen el crecimiento sino también la salud de la planta. En esta medida usar bacterias endófitas podría contribuir a disminuir el impacto ambiental y los riesgos para la salud humana, generados por el uso excesivo de agroquímicos.

Sin embargo, no se ha estudiado a profundidad algunas bacterias potencialmente beneficiosas para la agricultura, ni tampoco los factores extrínsecos e intrínsecos (especificidad genotípica, condiciones hormonales, edad de la planta, condiciones nutricionales, etc.), que garantizan una colonización exitosa en cultivos de arroz. Explotar esta diversidad genética y funcional de estos microorganismos puede ayudar al desarrollo sustentable de la agricultura en países como Colombia. De manera que profundizar en investigación básica sobre el efecto de estos factores sobre el proceso de colonización, permitirá a largo plazo, contribuir a la implementación de técnicas amigables con el medio ambiente e incluso disminuir el uso de fertilizantes químicos en cultivos de arroz mediante el uso de bacterias endófitas.

* Los rizobios inducen en las leguminosas la formación de estructuras especializadas, llamadas nódulos de fijación de N₂. Sin embargo, estas estructuras no se forman en las raíces del arroz colonizado por estas bacterias sino que se ha demostrado que colonizan al interior de los tejidos, es decir, como endófitos.

3.2 Marco teórico y estado del arte

3.2.1 Arroz e importancia agronómica en Colombia y en mundo.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, para el año 2030, la población mundial alcanzará los 8.000 millones de personas, lo cual implicará una demanda cada vez mayor de alimentos, por lo tanto, la producción de estos deberá aumentar en un 60% (Fresco, 2003). Debido a esto, la intensificación de la agricultura se dará, en mayor medida, en países en vía de desarrollo, como Colombia, donde deberá mejorarse la tecnología de producción de alimentos, así como también incrementar la eficacia del uso del agua y fertilizantes (Fresco, 2003).

El arroz es una gramínea que constituye el segundo alimento más consumido del mundo. Es producido por 113 países, con una producción mundial de 628 millones de toneladas para el año 2005, donde Colombia produjo 9.8% del arroz producido en América Latina y el Caribe (Labrín Sotomayor, 2007). El arroz pertenece al género *Oryza*, el cual incluye tiene 22 especies, dos de ellas cultivadas, *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima* (Joshi et al., 2000). La especie *O. sativa* tiene sus orígenes en Asia, al extremo oriente del Himalaya; en la región China la subespecie *O. sativa japonica* y en la región India la subespecie *O. sativa indica* (Landaverde, 2012).

Existe una notable diversidad genética en el género *Oryza*, contando con más 140.000 variedades locales (Álvarez Chavarría, 2000). Estas variedades silvestres de *Oryza*, son un objetivo de conservación, ya que representan un reservorio importante de genes, que pueden ser útiles para la agronomía (Joshi, et al, 2000). Entre estas especies silvestres se encuentra *Oryza glumaepatula*, la cual es nativa de Sur y Centroamérica, particularmente de los bosques amazónico y zonas inundables de Brasil y Venezuela (International Rice Research Institute, 2000 & Brondani, et al., 2002). Esta especie es cercana filogenéticamente a *Oryza sativa*, por lo que se ha identificado como especie potencial para estudios de mejoramiento genético (Brondani et al., 2002).

3.2.2 Impacto del uso de fertilizante en el medio ambiente.

Un fertilizante es una sustancia que aporta nutrientes esenciales en forma disponible, para que la planta los pueda asimilar fácilmente; de modo que, es indispensable su uso en los diferentes cultivos, en particular el del arroz. La

fertilización de nitrógeno es un determinante principal en la producción. Según la FAO (2014), se debe aplicar entre 150 a 250 kg/ha de fertilizante, para obtener un rendimiento promedio de arroz blanco de 4 000 a 4 500 kg / ha para las variedades japónica, y 1 000 a 1 500 kg / ha para la variedad Indica.

Sin embargo, debido al aumento significativo de áreas de cultivo, también se ha incrementado el uso de fertilizantes. El consumo mundial de fertilizantes creció rápidamente en los años sesenta, setenta y ochenta (FAO, 2002). Según Fresco (2003), hace medio siglo los agricultores solo aplicaban 17 millones de toneladas de fertilizantes en sus tierras y hoy utilizan ocho veces esa cantidad. Esta gran cantidad de fertilizantes aplicadas a lo largo del tiempo ha alterado la composición del suelo, lo cual implica una serie de impactos que varían dependiendo de la cantidad y forma en que se han aplicado.

Entre los impactos que trae el uso indiscriminado de fertilizantes se encuentra la eutrofización, el cual es un proceso de enriquecimiento de las aguas superficiales con nutrientes para las plantas. Un nivel elevado de nutrientes orgánicos en el agua provoca el crecimiento explosivo de algas ocasionando perturbaciones en el equilibrio biológico, afectando flora y fauna de estos ecosistemas. A nivel económico, la eutrofización tiene impactos negativos, ya que esto aumenta la mortalidad de peces, un recurso importante para países en desarrollo (FAO, 1997).

Las aguas subterráneas son un recurso vital para muchas ciudades que se ven afectadas por el uso indiscriminado de fertilizantes. Según la FAO (1997), el agua subterránea también se contamina, fundamentalmente, por la presencia de nitratos, y puede contaminarse hasta el punto en el cual ya no reúne las condiciones establecidas en las normas actuales para el consumo humano, afectando de manera importante la salud de las personas que consumen este recurso. El mal manejo de este tipo de fertilizantes, junto a prácticas inadecuadas de ordenación de la tierra, es causa de erosión y producen también significativas pérdidas de nutrientes.

3.2.3 Bacterias endófitas como alternativa para reducir el uso de fertilizantes.

Una bacteria endófitas se define como aquella bacteria que se localiza al interior de los tejidos de la planta, sin causar síntomas de enfermedad (James & Olivares, 1998). Pueden clasificarse en obligadas si dependen del huésped para su crecimiento, supervivencia y dispersión, o facultativas si cumplen una etapa de su

ciclo de vida fuera del hospedero (Beracochea, 2011). Según Pérez & Chamorro, (2013), estos microorganismos son fuentes inagotable de más de 20.000 compuestos biológicamente activos, los cuales influyen de manera directa en el rendimiento y supervivencia de las plantas hospederas.

Una bacteria diazotrófica es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico. Entre las bacterias diazotróficas asociadas a gramíneas, como el maíz, arroz y trigo, se encuentran *Klebsiella spp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium leguminosarum* y *Pseudomonas spp.*, *Azoarcus spp.* y *Burkholderia vietnamiensis* (James & Olivares, 1998).

De las anteriores, el género *Pantoea*, pertenece a las gammaproteobacterias, familia Enterobacteriaceae, incluye especies asociadas a plantas, ya sean epífitos, endófitos o patógenos (Delétoile et al., 2009). Una especie de este género, *Pantoea agglomerans*, puede promover el crecimiento vegetal mediante diferentes procesos, entre los que se encuentran la producción de fitohormonas, el mejoramiento de la absorción mineral y la fijación de nitrógeno atmosférico (James & Olivares, 1998 & Maclean, 2008). El ácido indolacético bacteriano estimula el desarrollo del sistema radical y crecimiento de la planta hospedera, ya que esta fitohormona estimula la división, elongación y diferenciación de las células vegetales (Maclean, 2008).

Las bacterias diazotróficas del género *Rhizobium* son bacilos, no formadoras de esporas, Gramnegativos, aerobios, pertenecientes a la subclase alfa de las proteobacterias (Madigan, et al., 2009 & Garrity, Brenner, Krieg, & Staley, 2005). Este género se caracteriza por incluir cepas capaces de inducir una mayor dominancia apical en plantas con o sin fijación de nitrógeno atmosférico (Garrity, Brenner, Krieg, & Staley, 2005). Por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* es una especie de este género ampliamente estudiada por su capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno en las leguminosas (Madigan, et al., 2009).

Diferentes estudios han demostrado la presencia de estos géneros bacterianos en el interior de tejidos de especies como arroz, maíz, trigo y caña de azúcar. Esto se debe a un proceso conocido como la *colonización bacteriana*, la cual se define como la multiplicación de una bacteria después de la entrada a un tejido hospedador u otra superficie (Madigan, et al., 2009).

La colonización se puede dar de manera pasiva o activa. En la colonización pasiva, las bacterias endófitas se transfieren a través de las semillas o por medio de yemas, en caso de plantas que se propagan vegetativamente. La colonización activa implica

el acercamiento espacial de la bacteria a la superficie de la raíz atraídas por exudados liberados por la planta que contiene moléculas quimioatrayentes como flavonoides, luego la bacteria entra en contacto con la raíz adhiriéndose a la misma mediante adhesinas y finalmente se ancla a la superficie (Beracochea, 2011). En estos sitios se da una multiplicación bacteriana generando microcolonias, colonizando la superficie. Posteriormente se da la invasión de tejidos internos, mediante liberación de enzimas hidrolíticas o entrando por fisuras naturales (Beracochea, 2011).

El caso más estudiado es el de la colonización de rizobios en las leguminosas, el cual comienza cuando la planta secreta flavonoides que son reconocidos por los rizobios. Estas bacterias responden secretando “factores nod” de nodulación que se unen con los pelos radicales e inducen su crecimiento. Posteriormente, el rizobio invade el pelo radical y se desplaza hacia la raíz principal a través de un tubo de infección. Dentro de la raíz la bacteria libera fitohormonas que activan la división celular vegetal produciendo nódulos. Finalmente la bacteria expresa diferentes genes que codifican para nitrogenasas y otras enzimas (Gilbert & Epel, 2009).

Después de que ocurre la colonización, los endófitos pueden migrar a otros tejidos de la planta o permanecer en un tejido específico. Por lo general estas bacterias endófitas colonizan espacios intercelulares, sin embargo, hay evidencia de endófitos ocupando vasos del xilema (Perez & Chamorro, 2013). Según Chi et al. (2005), Gyaneshwar et al. (2001) y Perrine et al. (2007), la dinámica de colonización de algunos rizobios y de diazótrofos en plantas de arroz, comienza en las raíces laterales emergentes después de 48 horas de inoculación, seguido de una migración hacia el interior de las raíces, ascendiendo hacia la base del tallo, vaina foliar y hojas, donde desarrollan grandes poblaciones. De igual manera *Herbaspirillum* coloniza principalmente espacios intercelulares de las hojas del arroz silvestre (Elbeltagy et al., 2001). Sin embargo, la zona de elongación de la raíz y la zona de pelos radicales, son los tejidos de mayor actividad y presencia bacteriana (Maclean, 2008).

3.3.4 La interacción genotipo-ambiente y su impacto sobre la colonización.

Las comunidades bacterianas endófitas fluctúan en el interior de los tejidos dependiendo de la edad de las plantas, condiciones ambientales y genotipo del huésped (Adams & Kloepper, 2002). Por ejemplo, existen especies de leguminosas que son capaces de fijar nitrógeno solo cuando se relaciona con una especie en particular de *Rhizobium* (Gilbert & Epel, 2009). Esto es debido a que el nódulo de la

leguminosa, controla la cantidad de oxígeno necesario para evitar la inactivación de la nitrogenasa de la bacteria (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). Por otro lado, algunos rizobios son capaces de colonizar especies próximas de leguminosas (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009); de manera que existe un notable rango de especificidad entre las especies a la hora de establecerse la colonización.

Diversos factores ambientales también pueden afectar la colonización de las bacterias, entre ellos se encuentra la competencia bacteriana en la rizósfera de la planta y la disponibilidad de nutrientes del suelo. Dependiendo de las poblaciones bacterianas asociadas a la rizósfera, a la cantidad y calidad de nutrientes del suelo, va a existir un gradiente microambiental de deficiencia de nutrientes que estimula la migración de ciertas especies bacterianas a fuentes alternas de nutrientes, como el interior de los tejidos vegetales (Maclean, 2008).

Las fitohormonas también contribuyen a la complejidad de la respuesta de la planta a la colonización. Un ejemplo concreto es el caso de *Azospirillum*, donde las hormonas vegetales como el IAA (ácido indol-acético) pueden promover su capacidad de fijar nitrógeno así como su crecimiento (de Bashan, Holguin, & R. Glick, 2007).

3.2.5 Técnicas de estudios del proceso de colonización de bacterias endófitas

Debido al creciente interés en el desarrollo biotecnológico en la aplicación de bacterias endófitas para mejorar procesos de biorremediación y producción sostenible de cultivos alimentarios y no alimentarios, se han aplicado diferentes técnicas de metaproteómica, metaproteogenómica y metatranscriptómica para descifrar el potencial genómico y funcional de las bacterias endófitas y sus beneficios en la interacción con la planta (Perez & Chamorro, 2013).

Una de las técnicas tradicionales para la localización de bacterias en un tejido, es el aislamiento en medio de cultivo. En esta metodología se realiza la homogenización de tejidos específicos para obtener las bacterias en su interior, y han sido complementadas con técnicas como PCR, hibridaciones moleculares o técnicas inmunológicas (Cubero, 2008). Esta técnica ha arrojado buenos resultados en detección y diagnóstico, sin embargo, no aportan suficiente evidencia en el momento de determinar la localización específica de las bacterias en el tejido donde se establecen, por lo que actualmente se considera a la microscopia como una alternativa directa que provee esta evidencia (Gyaneshwar et al., 2001). La

microscopia electrónica de transmisión es otra técnica utilizada para localizar bacterias al interior de los tejidos vegetales, sin embargo, debido a la complejidad del protocolo y que no permite visualizar si lo observado corresponde a células vivas o no, actualmente, se emplea la técnica de microscopia de epifluorescencia (Cubero, 2008).

Las proteínas autofluorescentes tienen la ventaja de que emiten fluorescencia sin necesidad de tratamientos previos, lo que las convierte en un marcador ideal para visualizar microorganismos (Larrainzar , O’Gara, & Morrissey, 2005). Entre las múltiples ventajas de aplicar esta técnica se encuentran: fácil detección, no se necesita de un sustrato exógeno, posibilita la visualización de células individuales, posibilita observar las bacterias en su entorno sin destruirlo, permite la visualización en tiempo real y permite discriminar células vivas (Cubero, 2008). Sin embargo, tiene como inconvenientes que no se pueda utilizar como marcador de estudios de supervivencia de microorganismos y de expresión transitoria de proteínas, debido a su persistencia durante largo tiempo (Cubero, 2008).

Dentro de las proteínas fluorescentes, la proteína pmOrange es la más brillante, pero poco estable en pH variable. Por otro lado la proteína pmCherry posee la mayor foto estabilidad de todas las proteínas (CShaner, Steinbach, & Tsien, 2005). El tiempo de detección media de las proteínas fluorescentes oscila entre 8 a 12 horas, con algunas excepciones como la proteína HcRed1 que tiene un tiempo de detección de 16 horas (Cubero, 2008). Otros autores como Larrainzar , O’Gara, & Morrissey (2005), establecieron que la proteína DsRed requiere 48 horas para alcanzar su máxima fluorescencia, por lo que el tiempo de emisión de la fluorescencia y su detección es específico para cada proteína.

Las técnicas de microscopia óptica y electrónica han promovido un considerable progreso en el estudio de la localización de bacterias diazotróficas en leguminosas. Estas técnicas han sido apoyadas por el desarrollo de marcadores “inmunogold” e inmunofluorescentes usando anticuerpos monoclonales o policlonales. También se han empleado reporteros que se expresan constitutivamente como β -galactosidasa (Lac-Z), β -glucoronidasa (GUS) y proteína verde fluorescente (*gfp*) las cuales son más usadas para estudios de localización (James E. K., 2000).

En el estudio de la colonización de *Serratia marcescens* en arroz, se empleó la cepa IRGB500 marcada con *gusA*, y se visualizó microscópicamente la actividad de GUS en las raíces, tallos y hojas donde se estableció la bacteria marcada. (Gyaneshwar et al., 2001). En el estudio de la colonización de *Herbaspirillum* en plantas de arroz,

Elbeltagy et al. (2001), transformaron cepas de esta bacteria endófitas con DNA que codifica la proteína verde fluorescente, y observaron mediante microscopía de fluorescencia la colonización en espacios intercelulares de tejidos del tallo de plántulas de 7 días de la especie silvestre *O. officinalis*.

También se marcaron diferentes especies de rizobios endófitos (*Sinorhizobium melilotii*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium haku*) con *gfp* para estudiar mediante microscopía de fluorescencia la colonización, migración, y dinámicas de crecimiento de estas bacterias en variedades de arroz *O. sativa* spp japónica cv. *Zhonghua* y cv. *Nipponbare* (Chi et al., 2005). Esta técnica también permitió estudiar la migración diaria de rizobios en plántulas, y se ha reportado su visualización en plántulas hasta 21 días después de la inoculación. (Perrine, et al., 2007). En algunos otros estudios, se ha empleado un módulo anexo al microscopio de epifluorescencia llamado laser confocal, que permite excitar la muestra con diferentes longitudes de onda simultáneamente obteniendo imágenes de mayor calidad y series de imágenes del tejido cambiando el plano del foco.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Estandarizar un protocolo que permita el estudio del proceso de colonización de bacterias endófitas pertenecientes a los géneros *Rhizobium* sp. y *Pantoea* sp. transformadas con proteínas autofluorescentes, en diferentes tejidos de plántulas *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*, bajo condiciones controladas de laboratorio (medio confinado).

3.3.2 Objetivos específicos

- I. Estandarizar un protocolo de transformación eficiente, sencillo y viable para bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Pantoea* con los plásmidos codificantes de las proteínas autofluorescentes EmGFP y mCherry

Indicadores:

- Colonias bacterianas creciendo en placas de agar con ampicilina.

- II. Confirmar si las bacterias *Rhizobium* sp. y *Pantoea* sp. se encuentran transformadas con sus respectivos plásmidos codificantes de proteínas autofluorescentes (pmCherry y pRSET-EmGFP) y determinar la concentración óptima de IPTG para la inducción de la proteína, tiempos de visualización y estabilidad de la transformación.

Indicadores:

- Fragmento de pRSET-EmGFP y pmCherry amplificado
- Registro fotográfico de las bacterias fluorescentes bajo diferentes concentraciones de IPTG y diferentes tiempos de visualización

- III. Estandarizar una metodología que permita el crecimiento, manipulación y visualización en el microscopio, de las plántulas de *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula* bajo condiciones de total esterilidad.

Indicadores:

- Metodología validada para crecimiento, manipulación y visualización en el microscopio de plántulas en condiciones de total esterilidad

- IV. Determinar la concentración óptima de inóculo bacteriano, medio y condiciones de crecimiento que permitan establecer las condiciones óptimas para la inoculación de estas cepas bacterianas en los tejidos de *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*

Indicadores:

- Registro fotográfico de plántulas de arroz sometidas a diferentes medios de crecimiento y concentraciones de inóculo bacteriano.

3.4 Metodología

3.4.1 Estandarización de un protocolo de transformación de bacterias endófitas

Previo a realizar las transformaciones, se seleccionaron las cepas de bacterias endófitas a transformar. Estas bacterias fueron caracterizadas y aisladas por Ghneim y colaboradores, de los tejidos de la especie silvestre de arroz *Oryza glumaepatula*, en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad ICESI (Tabla 1). Las bacterias fueron seleccionadas con base a su susceptibilidad a la ampicilina, por medio de un antibiograma por E-test (epsilometría)

Tabla 1 Bacterias seleccionadas para marcaje con proteínas autofluorescentes. La identidad de las bacterias fue determinada mediante secuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rRNA.

Género	ID del Laboratorio	Especie más cercana según la secuenciación del gen 16S rRNA	Porcentaje de identidad
<i>Pantoea</i> sp.	SOG04	<i>Pantoea agglomerans</i>	99.03%
<i>Pantoea</i> sp.	SOG13	<i>Pantoea agglomerans</i>	98.89%
<i>Pantoea</i> sp.	SOG14	<i>Pantoea agglomerans</i>	99.02%
<i>Pantoea</i> sp.	SOG18	<i>Pantoea stewartii</i>	91.60%
<i>Pantoea</i> sp.	SOG31	<i>Pantoea agglomerans</i>	98.96%
<i>Pantoea</i> sp.	SOL40	<i>Pantoea dispersa</i>	99.10%
<i>Rhizobium</i> sp.	SOG25	<i>Rhizobium huautlense</i>	95.67%
<i>Rhizobium</i> sp.	SOG26	<i>Rhizobium huautlense</i>	95.91%

*Las cepas bacterias con porcentajes de similitud inferior al 97% son consideradas especies putativamente nuevas

Previo a este estudio, la transformación de las bacterias endófitas fue llevado a cabo por Jojoa (2014), partiendo del protocolo utilizado por Elbeltagy et al. (2001). Mediante la modificación del protocolo inicial, lograron transformar la bacteria endófitas *Pantoea* SOG04, y la cepa control *Escherichia coli* DH5 α . Sin embargo, la eficacia de este protocolo transformación fue relativamente baja para las bacterias endófitas del género *Pantoea* y fallido para las bacterias del género *Rhizobium*. Por lo tanto, en este proyecto se realizaron algunas modificaciones al protocolo previamente utilizado en el laboratorio, dentro de las cuales se incluyen: cambio de los medios de crecimiento, cambio en la fase de colecta de las células para inducir su competencia, concentraciones diferentes de plásmido, diferentes tiempos de incubación en hielo de la mezcla plásmido-bacteria competente, diferentes voltajes, número de pulsos, tiempos de recuperación y diferentes concentraciones de

antibiótico de selección, pues todos estos factores son determinantes de la eficiencia del proceso de transformación. Los detalles de estas modificaciones se presentan en la sección de resultados.

Por otro lado, también se evaluó la técnica de transformación mediante choque térmico como técnica alternativa a la electroporación. Se partió del protocolo establecido por Sambrook y Russell (2001) con modificaciones, específicamente en lo relativo al tiempo de incubación en hielo y al tiempo de recuperación.

Los plásmidos empleados en las transformaciones fueron pmCherry (CloneTech) para el género *Pantoea* con un tamaño de 3344 pb, mientras que para *Rhizobium* se utilizó pRSET-EmGFP (Invitrogen) de 3600pb (Anexo 2). Estos plásmidos contienen el promotor *lac*, los genes de expresión de las proteínas autofluorescentes correspondientes y un gen de selección el cual confiere resistencia a ampicilina (a una concentración máxima de 50 µg/mL). Los plásmidos de pmCherry fueron extraídos de las bacterias de *E. coli* previamente transformadas por Jojoa (2014), mediante el protocolo de extracción de plásmido por lisis mediante calentamiento propuesto por Sambrook y Russell (2001). Durante las transformaciones con pmCherry se emplearon los plásmidos que fueron extraídos de bacterias previamente transformadas en el laboratorio, a excepción de la primera transformación para la que se empleó el plásmido comercial (CloneTech).

3.4.2 Confirmación de transformación bacteriana y emisión de fluorescencia

Para la confirmación de la transformación se realizó una PCR de colonia directa, amplificando una región específica de los genes codificantes de las proteínas mCherry y EmGFP. Los cebadores y condiciones de PCR se detallan en el Anexo 1. Se tomaron colonias individuales frescas para la amplificación mediante una punta estéril. Se utilizó como control positivo el plásmido pmCherry y como control negativo bacterias sin transformar.

Las bacterias *E. coli* DH5α transformadas con pmCherry y con pRSET-EmGFP y *Pantoea* SOG04 transformada con pmCherry fueron cultivadas en placas de Agar LB suplementadas con ampicilina (50µg/mL). La cepa *Rhizobium* SOG26 transformada con pRSET-EmGFP fue sembrada en placas agar YEMB con ampicilina (50ug/mL). Bacterias no transformadas de *E. Coli* DH5α, *Pantoea* SOG04 y *Rhizobium* SOG26 fueron cultivadas en placas Agar LB sin ampicilina. Todas las placas de cultivo fueron incubadas a 30°C durante 24h.

Para determinar la concentración óptima de IPTG necesaria para la inducción de la proteína, se realizó un monitoreo temporal mediante registro fotográfico que permitió la visualización de las bacterias a las 12, 24, 48, 72 y 156 horas. La visualización de las bacterias se realizó en el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 55i trinocular) de la Universidad Icesi, utilizando filtro Nikon YZE para bacterias transformadas con pmCherry, y el filtro GFP para bacterias transformadas con pRSET-EmGFP. Las fotografías fueron tomadas con la cámara para microscopios Nikon -DS-Fi1.

Previo al monitoreo temporal se realizó el protocolo de inducción para todas las bacterias transformadas. Las bacterias fueron inducidas y crecidas en medio LB bajo diferentes concentraciones de IPTG y Ampicilina (Tabla 2). Adicionalmente se inoculó la bacteria *Rhizobium* SOG26 transformada con pRSET-EmGFP en medio YEMB.

Tabla 2. Combinación de parámetros aplicados para inducir la expresión de las proteínas en las bacterias transformadas con AFPs

Cepa Bacteriana	Concentración Ampicilina (µg/mL)	Concentración IPTG (mM)
<i>Escherichia coli</i> transformada con pmCherry	50	0
	50	0.5
	50	1
	70	0
<i>Pantoea</i> SOG04 transformada con pmCherry	50	0
	50	0.5
	50	1
	70	0
<i>Escherichia coli</i> transformada con pRSET-EmGFP	50	0
	50	0.5
	50	1
	70	0
<i>Rhizobium</i> SOG26 transformada con pRSET-EmGFP en medio YEMB	50	0
	70	0.5
	70	1
	70	0
<i>Rhizobium</i> SOG26 transformada con pRSET-EmGFP en medio LB	50	0
	50	0.5
	50	1

	70	0
--	----	---

Para determinar los tiempos de visualización apropiados para estudiar el proceso de colonización en tejidos y verificar la estabilidad de la transformación, se tomaron fotografías de las bacterias que crecían en diferentes tratamientos (concentración de ampicilina e IPTG) en intervalos de tiempo de 0 a 5 min. Por otro lado, se midió la absorbancia de cada medio a una densidad óptica de 600 nm antes de realizar cada visualización, con el fin de establecer si existe una relación entre la densidad bacteriana y la emisión de fluorescencia.

3.4.3 Diseño y optimización de un sistema de crecimiento para plántulas de arroz

Con el fin de establecer una metodología que permitiera la manipulación, el crecimiento y visualización directa en el microscopio sin daño a los tejidos de las plántulas de *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula* bajo condiciones de total esterilidad, se adaptaron diferentes montajes partiendo del sistema hidropónico adaptado por Posso (sin publicar), descrito por Courtois et al. (2013) y Perrine et al. (2007). En la adaptación del montaje se evaluaron diferentes materiales y pegamentos; y se seleccionó el sistema que proporcionó las condiciones ya mencionadas.

3.4.4 Determinación de concentración óptima de inóculo bacteriano, medio y condiciones de crecimiento

Uno de los factores extrínsecos que garantizan una colonización exitosa son las condiciones nutricionales percibidas por la bacteria y la planta. De esta manera, es importante determinar las condiciones óptimas de crecimiento que permitan la colonización de los tejidos por parte de las bacterias; así como también, la concentración adecuada de inóculo bacteriano que permita la colonización sin afectar la salud de la planta. Sin embargo, es importante considerar que para determinar las condiciones nutricionales o medios de crecimiento óptimos que garanticen la colonización en las plántulas de arroz, es necesario inocular las plántulas con las bacterias transformadas; lo cual solo será posible cuando la Universidad Icesi obtenga los permisos correspondientes para el trabajo con organismos vivos modificados solicitados ante el ICA.

En este proyecto se evaluó el crecimiento de las plántulas de arroz en diferentes medios nutritivos, que difieren en su composición y pH (Tabla 3); así como también

el crecimiento de las bacterias transformadas en estos mismos medios. La información que se generó de esta evaluación puede contribuir a establecer que medios y condiciones pueden permitir una colonización, dado el comportamiento de crecimiento expuesto por plántulas y bacterias.

Tabla 3. Medios nutritivos utilizados para el cultivo de plántulas de *Oryza glumaepatula*.

Medio nutritivo	pH
Solución nutritiva Kimura B	5.5
Solución nutritiva Kimura B	8.6
Solución nutritiva Kimura con extracto de levadura (5g/L)	6.8
Solución nutritiva Kimura B con Bactopectona (10g/L)	5.9
Solución nutritiva Kimura B con extracto de levadura (5g/L) y Bactopectona (10g/L)	6.6
Medio LB	6.8

Previamente a la germinación, las semillas fueron esterilizadas (Protocolo de esterilización de semillas en anexos) e incubadas durante dos días a 30°C en total oscuridad. Posteriormente las semillas fueron dispuestas en los montajes previamente esterilizados e instaladas en tubos falcón de 50mL con Solución nutritiva Kimura B (pH 5.5). Los tubos falcón fueron sellados con papel aluminio y dispuestos en cámara de crecimiento durante 24 horas. Posteriormente la solución nutritiva fue remplazada por los diferentes medios mencionados anteriormente (previamente autoclavados). Se incubaron las plántulas durante 7 días en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de 12h luz/oscuridad y ciclos de 28°C/25°C día/noche.

Para determinar en qué medios nutritivos la bacteria transformada podría crecer de manera óptima, se inoculó la bacteria *Pantoea* SOG04 transformada con pmCherry en los medios anteriores suplementados con ampicilina (50ug/mL). Los medios se incubaron a 30°C con agitación constante a 180rpm, durante 24 horas y se midió la absorbancia a una densidad óptica de 600nm para establecer el crecimiento bacteriano.

Basándose en los resultados anteriores se procedió a inocular plántulas de *Oryza glumaepatula* con bacterias no transformadas *Rhizobium* SOG26 y *Pantoea* SOG04. Pues como se mencionó anteriormente, aún estamos a la espera de la aprobación del permiso del ICA que nos permitirá inocular las plántulas con bacterias transformadas. El inóculo inicial se preparó a partir de colonias bacterianas frescas (no más de 24 horas) en medio LB durante 24 horas (187 rpm y 30°C). Posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, a 8000rpm durante 10 min a 4°C, y se diluyó a una DO₆₀₀ de 0.1. Posteriormente, se inocularon 40mL de solución nutritiva y solución nutritiva + extracto de levadura (5g/L), previamente esterilizadas, con 5uL y 5mL de dilución bacteriana. Finalmente, se introdujeron a estas soluciones plántulas de 4 días, que fueron crecidas en condiciones asépticas dentro de sus respectivos montajes. Los tubos falcón fueron sellados con papel aluminio y dispuestos en cámara de crecimiento durante 3 días para su posterior observación.

Matriz de marco lógico

Objetivo general: Estandarizar un protocolo que permita el estudio del proceso de colonización de bacterias endofíticas *Rhizobium* sp. y *Pantoea* sp. transformadas con proteínas autofluorescentes, en diferentes tejidos de plántulas *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*, bajo condiciones controladas de laboratorio (medio confinado).

Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicador
<p>I. Estandarizar un protocolo de transformación eficiente, sencillo y viable para las bacterias <i>Rhizobium</i> sp. y <i>Pantoea</i> sp con los plásmidos codificantes de proteínas autofluorescentes EmGFP y mCherry</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Realizar una revisión bibliográfica de los protocolos desarrollados para transformar bacterias pertenecientes a estos géneros ✓ Establecer que variables pueden incrementar la eficiencia y eficacia de la transformación ✓ Transformar las bacterias endofíticas, teniendo en cuenta las anteriores variables 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se dispondrá de las bacterias endofíticas ✓ Se dispondrá de los plásmidos pRSET-EmGFP y pmCherry 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Colonias bacterianas creciendo en placas de agar con ampicilina.

<p>II. Confirmar si las bacterias <i>Rhizobium</i> sp. y <i>Pantoea</i> sp. se encuentran transformadas con los plásmidos de sus respectivas proteínas autofluorescentes (mCherry y EmGFP) y determinar la concentración optima de IPTG para la inducción de la proteína, tiempos de visualización y estabilidad de la transformación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Amplificar un fragmento de pRSET-EmGFP y pmCherry a partir de colonia directa mediante PCR, empleando cebadores específicos ✓ Evaluar la expresión de los genes insertados mediante inducción de la autofluorescencia con IPTG y observación con el microscopio de fluorescencia. ✓ Monitorear temporalmente la expresión de fluorescencia de las diferentes bacterias transformadas crecidas e inducidas bajo diferentes concentraciones de IPTG 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se dispondrá de bacterias transformadas con AFP ✓ Se dispondrá de microscopio de epifluorescencia y los filtros correspondientes ✓ Se contará con el instrumento fotográfico y software adecuado para este registro. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fragmento de pRSET-EmGFP y pmCherry amplificado ✓ Registro fotográfico de las bacterias fluorescentes bajo diferentes concentraciones de IPTG y diferentes tiempos de visualización
<p>III. Estandarizar una metodología que permita el crecimiento, manipulación y visualización en el</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se dispondrá de semillas de <i>O. glumaepatula</i> con alto porcentaje de viabilidad y supervivencia. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Metodología validada para crecimiento, manipulación y visualización en el microscopio de plántulas

<p>microscopio, de las plántulas de <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i> bajo condiciones de total esterilidad.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Adaptar el sistema de crecimiento desarrollado en el laboratorio al sistema radicular de <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i> ✓ Evaluar el sistema de crecimiento en plántulas de <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i> 		<p>en condiciones de total esterilidad</p>
<p>IV. Determinar la concentración óptima de inóculo bacteriano, medio y condiciones de crecimiento que permitan establecer la metodología apropiada para la inoculación de estas cepas bacterianas en los tejidos de <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sembrar semillas de <i>O. glumaepatula</i> en diferentes medios de crecimiento ✓ Inocular diferentes medios de crecimiento con las bacterias y medir su densidad óptica ✓ Inocular las plántulas con las bacterias sin transformar y observar su crecimiento 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se contará con los medios de crecimiento ✓ Plántulas viables para inoculación. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Registro fotográfico de plántulas de arroz sometidas a diferentes medios de crecimiento y concentraciones de inóculo bacteriano.

3.5 Resultados

3.5.1 Estandarización de un protocolo de transformación de bacterias endófitas

- **Elección de las bacterias a transformar**

Las bacterias endófitas que fueron sometidas a los protocolos de transformación, pertenecen a un grupo de bacterias aisladas de los tejidos internos del arroz silvestre *Oryza glumaepatula*. Estas bacterias fueron aisladas e identificadas mediante secuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rRNA, por Ghneim y colaboradores (en preparación). Posteriormente se seleccionaron las cepas a transformar con base a su susceptibilidad natural a la ampicilina (Tabla 4). Las bacterias que fueron seleccionadas pertenecen a los géneros *Pantoea* (SOG04, SOG13, SOG14, SOG18, SOG 31 Y SOL40) y *Rhizobium* (SOG26); adicionalmente, se incluyeron las cepas *Azotobacter vinelandii* (ATCIC 478) y *E.coli DH5α* como cepas control.

Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima de ampicilina para las cepas bacterianas seleccionadas, establecida mediante epsilometría

Cepas bacterianas	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/ml)*
<i>Pantoea</i> SOG04	1
<i>Pantoea</i> SOG13	1
<i>Pantoea</i> SOG14	1.5
<i>Pantoea</i> SOG18	<0.016
<i>Pantoea</i> SOG31	1
<i>Pantoea</i> SOL40	4
<i>Rhizobium</i> SOG26	<0.016
<i>Rhizobium</i> SOG25	256
<i>Azotobacter vinelandii</i> (ATCC 478)	0.75
<i>E. coli</i> DH5α	0.75

*Cepa bacteriana susceptible con CIM menor a 8 Susceptible a la ampicilina, y resistente con un CIM mayor a 32

- **Modificaciones del protocolo de electro transformación**

Existen diferentes técnicas de transformación como la conjugación, transformación química o transformación por electroporación las cuales varían en su eficacia dependiendo de las propiedades metabólicas y estructurales de cada bacteria. Es

por ello, que decidimos evaluar diferentes protocolos de transformación para cada cepa bacteriana.

De acuerdo a trabajos anteriores, Jojoa (2014) logró transformar la cepa endófito *Pantoea* SOG04, además de la bacteria control *Escherichia coli* DH5 α , con plásmidos codificantes de proteínas autofluorescentes, modificando la metodología de transformación por electroporación establecida por Elbeltagy et al., (2001). En dicho protocolo las bacterias fueron crecidas en medio nutritivo suplementado con 20mM de Mg²⁺ hasta alcanzar la fase estacionaria. Luego, estas bacterias se volvieron competentes enfriándolas y lavándolas con agua fría, destilada y estéril. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en glicerol al 10%. En la transformación se tomaron 50 μ L de una alícuota de células competentes y se mezclaron rápidamente con 200ng de plásmido. La mezcla fue incubada en hielo por 15 minutos y transferida posteriormente a cubetas de 2mm previamente enfriadas. Estas bacterias fueron electroporadas con un solo pulso de 2500V, durante 5 ms; y recuperadas en medio S.O.C (Invitrogen) entre 4 a 8 horas, dependiendo de cada cepa. Finalmente, 100 μ L de las células recuperadas, fueron sembradas en placas de agar LB con ampicilina (50 μ g/ml), e incubados durante 48h a 30°C (Jojoa, 2014). Sin embargo, no fue eficaz la transformación para otras bacterias endófitas, particularmente para *Rhizobium*, por lo que se decidió realizar modificaciones al protocolo.

En el presente trabajo, la primera modificación que se realizó fue el medio de crecimiento de las bacterias ya que, según Aune y Aachmann (2010), los componentes que incrementan las tasas de crecimiento también pueden mejorar el éxito de transformación. Por lo tanto, se realizó una evaluación del crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo que diferían en la concentración de sales y fuente de carbono, y se seleccionaron aquellos medios en los que se presentó un mayor crecimiento visible a las 48 horas (Tabla 5).

Tabla 5. Medios de crecimiento evaluados y seleccionados para las diferentes cepas bacterianas

Cepa Bacteriana	Medios de crecimiento evaluados	Medios de crecimiento seleccionados
<i>Pantoea</i> SOG04 <i>Pantoea</i> SOG13 <i>Pantoea</i> SOG14 <i>Pantoea</i> SOG 18 <i>Pantoea</i> SOG 31 <i>Pantoea</i> SOL40	LB YEMB Medio específico para <i>Pantoea</i> Caldo Nutritivo	LB
<i>Rhizobium</i> SOG26	LB YEMB Medio específico para <i>Rhizobium</i>	Medio específico para <i>Rhizobium</i>
<i>Azotobacter vinelandii</i>	LB Medio específico para <i>A. vinelandii</i>	Medio específico para <i>A. vinelandii</i>
<i>E. coli</i> DH5 α	LB Caldo nutritivo	LB

Posteriormente, se sembraron las bacterias en los medios de crecimiento seleccionados y luego se prepararon las células electrocompetentes. Con estas células se procedió a realizar la electroporación con la variación de algunos parámetros:

Primero, se adicionó menor cantidad del plásmido pmCherry comercial (Invitrogen) (100ng), dado que para estas cepas se desconocía el punto de saturación de concentración de plásmido a la cual la eficiencia de transformación disminuye. Además, se recuperaron las bacterias tanto en medio de cultivo S.O.C comercial (Invitrogen), como el medio S.O.C preparado en el laboratorio y se varió el tiempo de incubación de 4h, 12h, y 48 h. En esta transformación se empleó el plásmido comercial pmCherry (Invitrogen) solo en la cepa control *E. coli* DH5 α , con las demás cepas se empleó el plásmido pmCherry extraído mediante el protocolo de extracción de plásmido por lisis de calentamiento (Sambrook & Russell, 2001).

De acuerdo a lo anterior, se logró transformar con una alta eficiencia la bacteria *E. coli* DH5 α , que fueron recuperadas en medio S.O.C Comercial (Invitrogen) por 48h a 30°C. Se observaron algunas colonias transformadas de color rosado autoexpresando la proteína autofluorescente mCherry y colonias satélite creciendo alrededor.

Posteriormente se repitió la electroporación, incrementando la concentración de plásmido pmCherry extraído por el protocolo de Sambrook y Russell, (2001) a 300 ng. Se eliminó el tiempo de incubación en hielo de la mezcla células competentes-plásmido, dada la posibilidad de que en la mezcla existieran DNAsas que estuvieran

degradando el plásmido. Se electroporaron a voltajes diferentes (2500V y 2120 V). La constante de tiempo, celdas y medios de recuperación (S.O.C comercial (Invitrogen), S.O.C preparado en el laboratorio) fueron los mismos anteriormente mencionados. Se dejaron recuperar durante 12 y 48 horas. Con estas modificaciones se consiguió transformar la cepa SOG04 del género *Pantoea* (un solo pulso de 2500v y recuperada por 48h).

Se evaluó la densidad óptica de las células, previo a realizar el protocolo de competencia y se determinó que las células a las 48 horas se encontraban en fase estacionaria. Por lo tanto, se decidió repetir el protocolo de células competentes esta vez solo para las cepas *Pantoea* SOG18 y *Rhizobium* SOG26 procurando no exceder DO_{620nm} de 0.5, con el fin de coleccionar las células en fase exponencial, en donde se encuentran en un estado fisiológico más sano.

A continuación, se realizó la electrotransformación a 2500v con una variación entre 1 a 2 pulsos. También se decidió emplear diferentes medios de recuperación: SOB/SOC, medio LB, medio específico para *Azotobacter vinelandii*, medio específico para *Rhizobium* y medio específico para *Pantoea*, durante 12 horas a 30°C y 190 rpm. Por otro lado, se disminuyó la concentración de ampicilina de las placas de agar donde se sembraron a 6 µg/mL y 25µg/mL. A pesar de estas modificaciones no se obtuvo ninguna bacteria transformada.

Se resolvió cambiar nuevamente el medio a uno de crecimiento lento, al observar que la bacteria *Rhizobium* SOG26 estaba creciendo en forma de agregado o moco, lo cual indicó que posiblemente esta cepa estaba segregando en exceso metabolitos secundarios y polisacáridos que impedían la modificación de la membrana plasmática y de este modo su transformación. Se eligió por lo tanto el medio YEMB para esta cepa, y se coleccionaron en fase estacionaria. Se realizó el protocolo de electroporación con el plásmido pRSET-EmGFP comercial (Invitrogen) y transcurrido el tiempo de incubación se sembraron en placas de Agar YEMB con ampicilina 50 µg/mL. De esta manera se logró transformar eficazmente esta cepa de *Rhizobium*.

- **Modificaciones del protocolo de transformación por choque térmico**

Alternativo a la electroporación, se realizó la transformación por choque térmico de las cepas bacterianas de *E. coli* DH5α, *Azotobacter vinelandii*, *Pantoea* SOG18, *Rhizobium* SOG26, empleando el plásmido pmCherry extraído por el protocolo de Sambrook y Russell (2001). Se varió el tiempo de incubación en hielo de 2 minutos

a 30 minutos, así como también el tiempo de recuperación de 1 hora a 12 horas. Solo se obtuvieron transformantes para *E. coli* DH5 α .

2.5.2 Confirmación de transformación bacteriana y emisión de fluorescencia

- **Confirmación de la transformación mediante PCR**

Mediante la PCR se observó la amplificación del fragmento esperado de pRSET-EmGFP y pmCherry en las bacterias que fueron transformadas con proteínas fluorescentes (*Escherichia coli*, *Rhizobium sp.* y *Pantoea sp.*), aunque muy tenue en *Rhizobium*, debido a que posiblemente había menos cantidad de bacterias con el plásmido que satélites en la colonia que fue tomada para la PCR. Esta amplificación de los fragmentos pRSET-EmGFP y pmCherry, no se observó en las bacterias que no fueron transformadas.

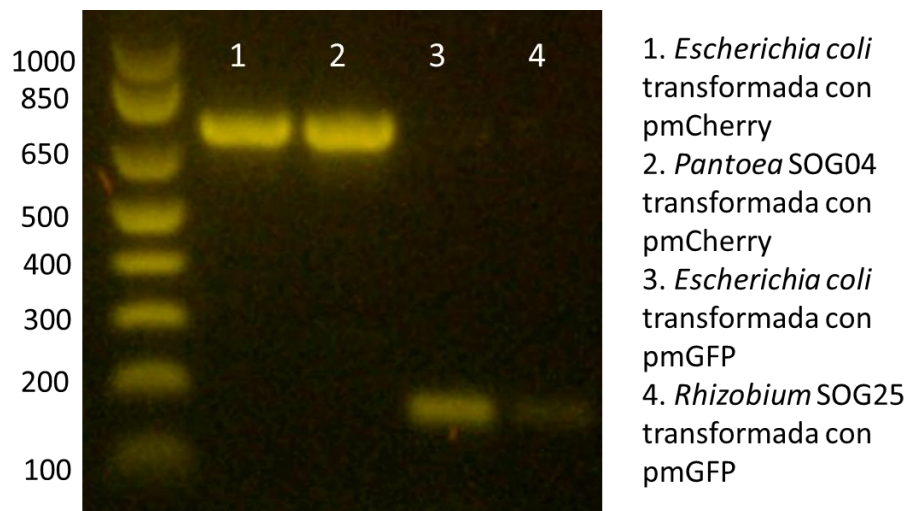


Figura 1. PCR de colonia de *E. coli* transformada con pmCherry y pRSET-EmGFP, *Pantoea* SOG04 transformada con pmCherry y *Rhizobium* transformada con pRSET-EmGFP. Tamaño del producto esperado: para pmCherry 699pb, para pRSET-EmGFP 187pb. Gel agarosa al 1.2%. Marcador molecular 1Kb Plus (Life Technologies)

- **Confirmación de la transformación por microscopia de fluorescencia y determinación de concentración óptima de IPTG para inducción de la proteína**

La confirmación de la transformación de las bacterias se realizó mediante visualización directa en el microscopio de epifluorescencia. Se observó la emisión de fluorescencia por parte de todas las bacterias sin necesidad de inducción, a

excepción de la cepa *Rhizobium* SOG26. La curva de crecimiento realizada nos indicó que esta bacteria, bajo ninguna de las condiciones de crecimiento, alcanza una densidad óptica (600nm) mayor a 0.028, lo que explica la ausencia de fluorescencia en los tratamientos o tiempos de exposición (Figura 2. A y B). Por otro lado, esta bacteria en medio YEMB, aunque si obtuvo un crecimiento relativamente lento, no se observó fluorescencia transcurrido varios días, por lo que no se logró inducir esta bacteria bajo ninguna concentración de IPTG o variación de ampicilina (Figura 6.A).

La bacteria *E. coli* transformada tanto con pmCherry como con pRSET-EmGFP mostraron un crecimiento rápido alcanzando la fase estacionaria en un tiempo de 72 horas (Figura 3.A y Figura 5.A). La bacteria *Pantoea* SOG04 transformada con pmCherry tuvo un crecimiento diferencial entre los tratamientos con y sin IPTG. Alcanzó la fase estacionaria a las 72 horas. La cantidad de bacterias fluorescentes que se observaron aumentó al transcurrir las horas, por lo que está directamente relacionado con su crecimiento bacteriano.

Las bacterias transformadas con AFPs que fueron expuestas prolongadamente a la luz fluorescente, presentaron un descenso notable y rápido de la fluorescencia al pasar el tiempo (Figura 7). Lo anterior, fue más notorio en las bacterias *E. coli* transformada con pRSET-EmGFP. A los pocos segundos de ser expuesta, empezó a disminuir la fluorescencia. Por lo tanto, se concluye que el cambio notable en el grado de la fluorescencia está relacionado con el tipo de proteína de fluorescencia más que con el genotipo bacteriano o la concentración de IPTG a la cual las bacterias fueron sometidas.

	Tratamiento		Tiempo de visualización	
	Concentracion Ampicilina	Concentracion IPTG mM	12-14h	156h
Rhizobium SOG26 transformada con pmGFP en medio LB	50	0		
	50	1		

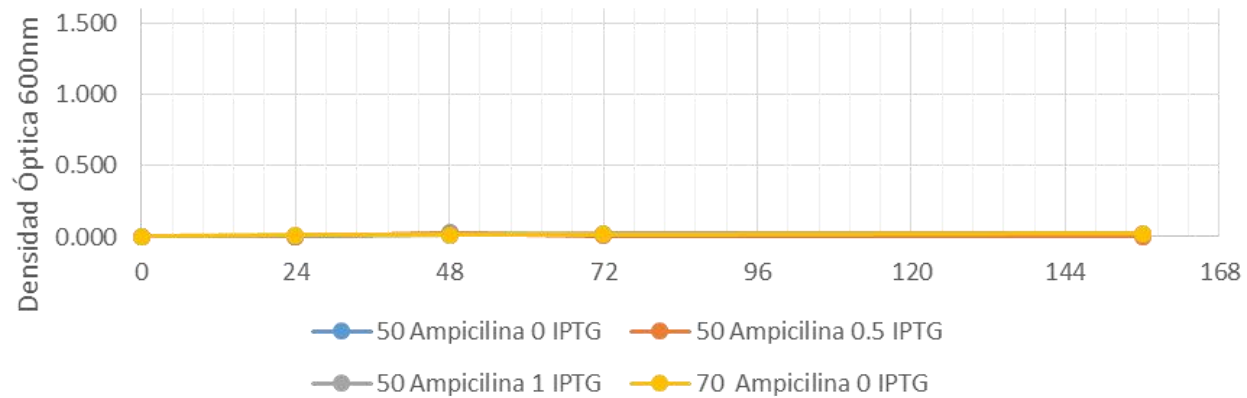


Figura 2. (A) Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria *Rhizobium* transformada con pRSET-EmGFP crecida en medio LB, usando el objetivo de 10x. (Resolución 2650x1920, Exposición 8 segundos, Ganancia 4x, contraste lineal). (B) Curva de crecimiento de la bacteria bajo diferentes concentraciones de ampicilina e IPTG

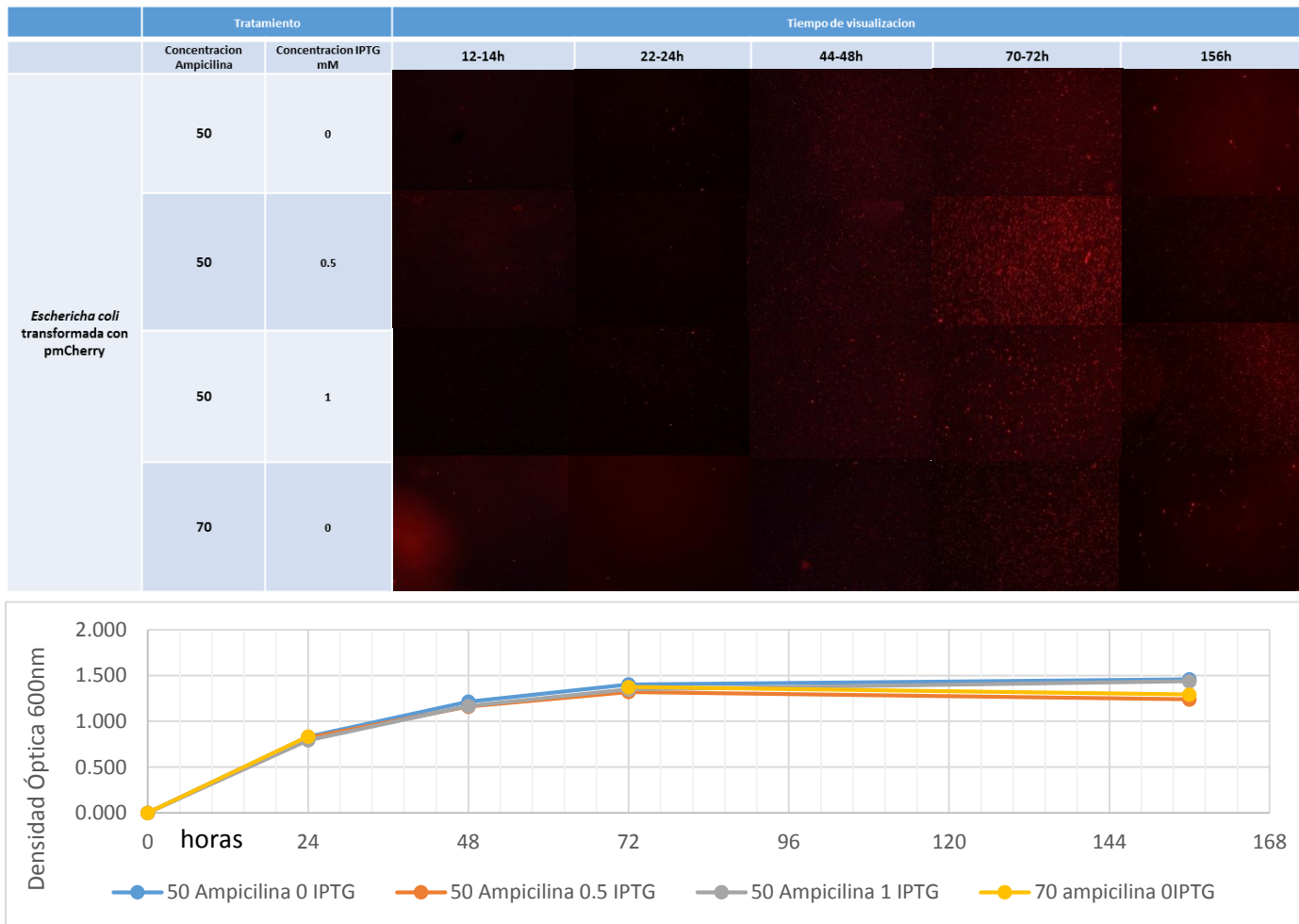


Figura 3. (A) Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria *E. coli* transformada con pmCherry usando el objetivo de 10x. (Resolución 2650x1920, Exposición 8 segundos, Ganancia 4x, contraste lineal). (B) Curva de crecimiento de la bacteria bajo diferentes concentraciones de ampicilina e IPTG

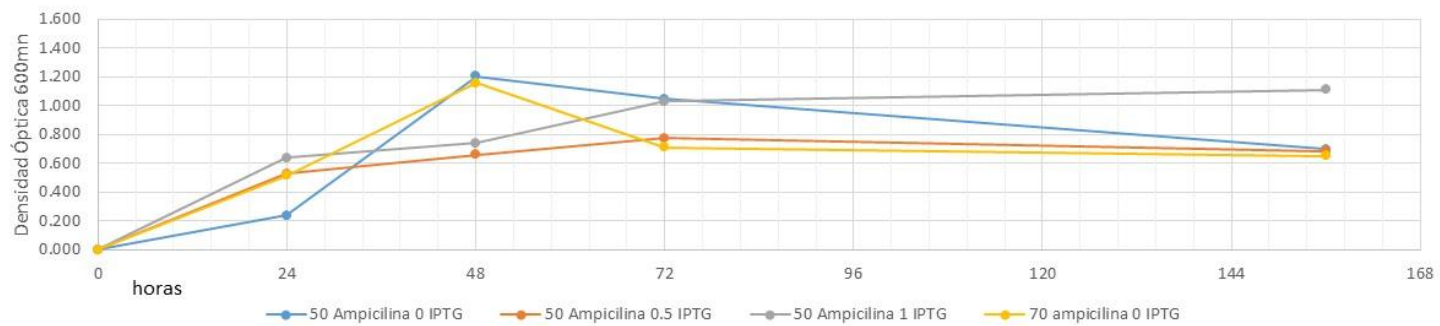
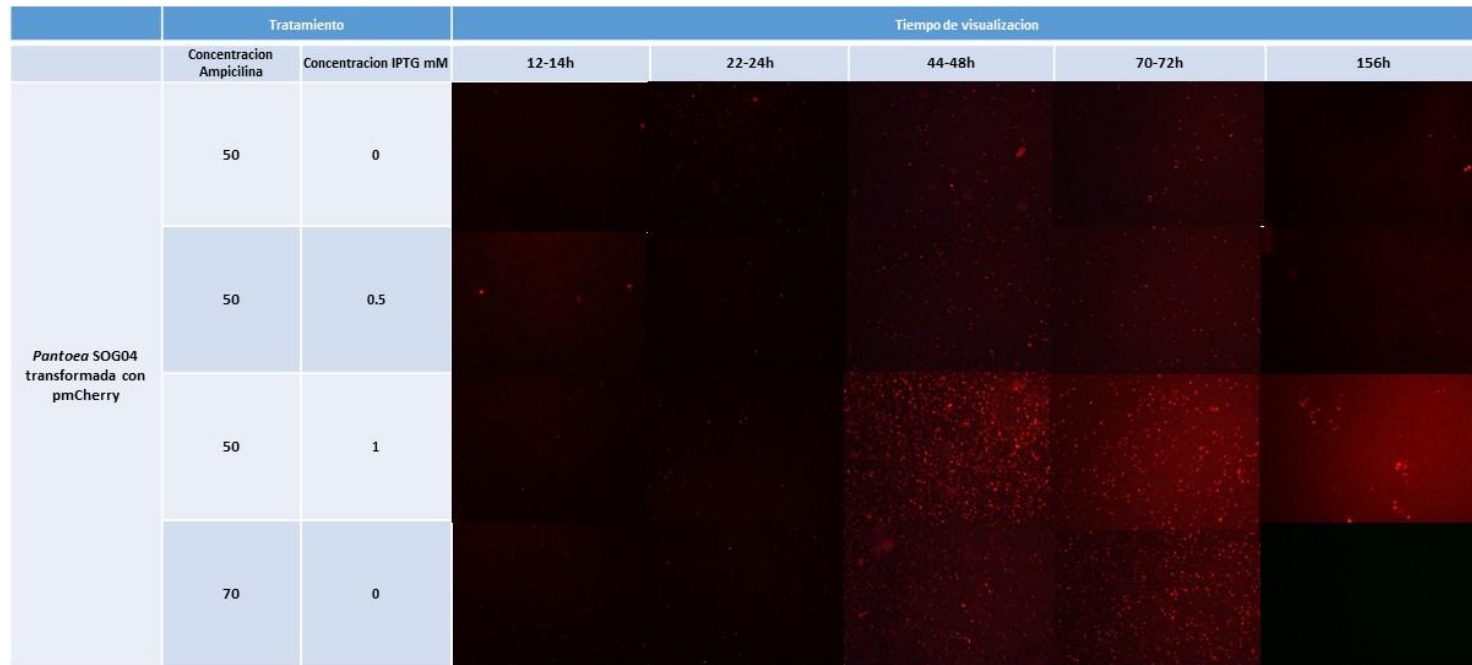
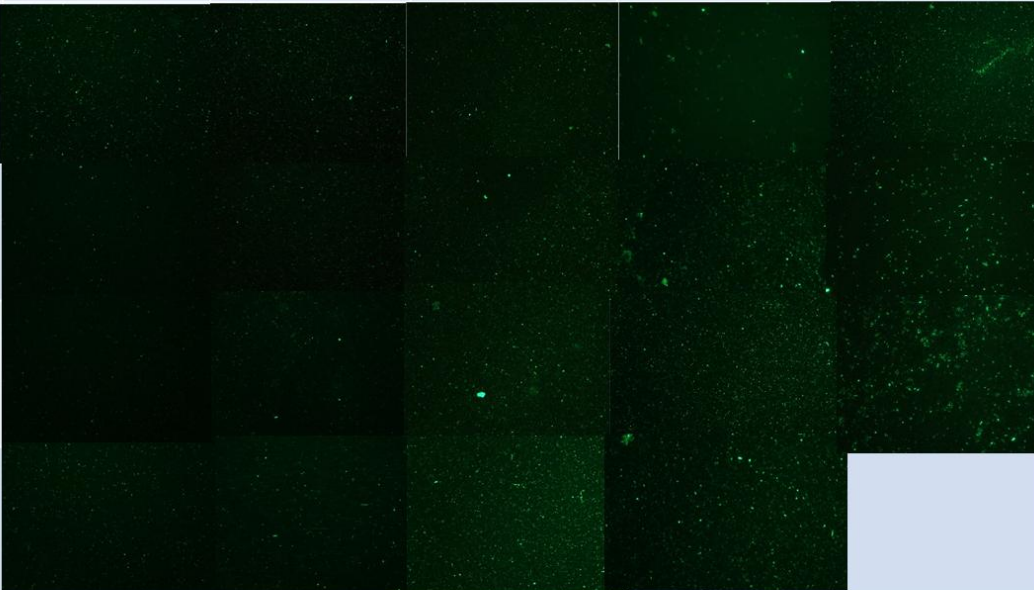


Figura 4. (A) Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria *Pantoea* transformada con pmCherry usando el objetivo de 10x. (Resolución 2650x1920, Exposición 8 segundos, Ganancia 4x, contraste lineal). (B) Curva de crecimiento de la bacteria bajo diferentes concentraciones de ampicilina e IPTG

	Tratamiento		Tiempo de visualización				
	Concentración Ampicilina	Concentración IPTG mM	12-14h	22-24h	44-48h	70-72h	156h
<i>Escherichia coli</i> transformada con pmGFP	50	0					
	50	0.5					
	50	1					
	70	0					

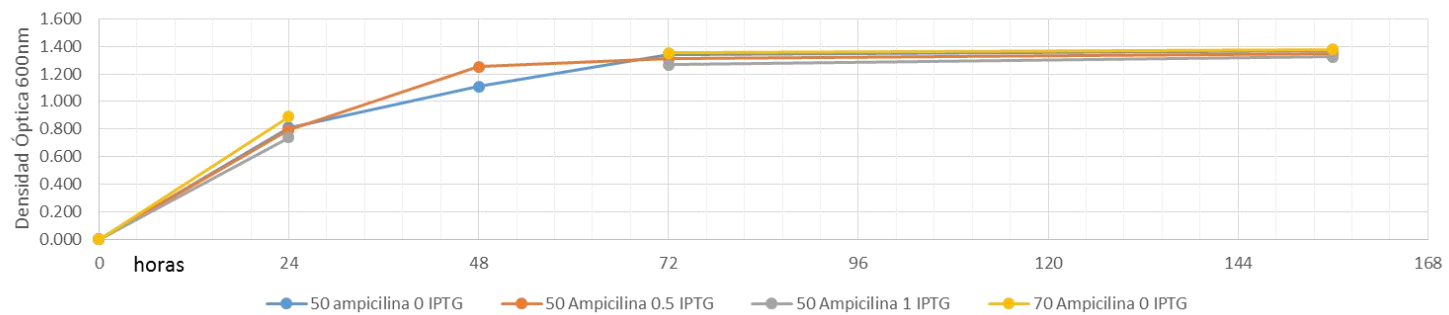


Figura 5. (A) Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria *E. coli* transformada con pRSET-EmGFP usando el objetivo de 10x. (Resolución 2650x1920, Exposición 8 segundos, Ganancia 4x, contraste lineal). (B) Curva de crecimiento de la bacteria bajo diferentes concentraciones de ampicilina e IPTG

	Tratamiento		Tiempo de visualización			
	Concentracion Ampicilina	Concentracion IPTG mM	12-14h	44-48h	156h	Sin fluorescencia
Rhizobium SOG26 Transformada con pmGFP en medio YEMB	50	0				
	70	1				

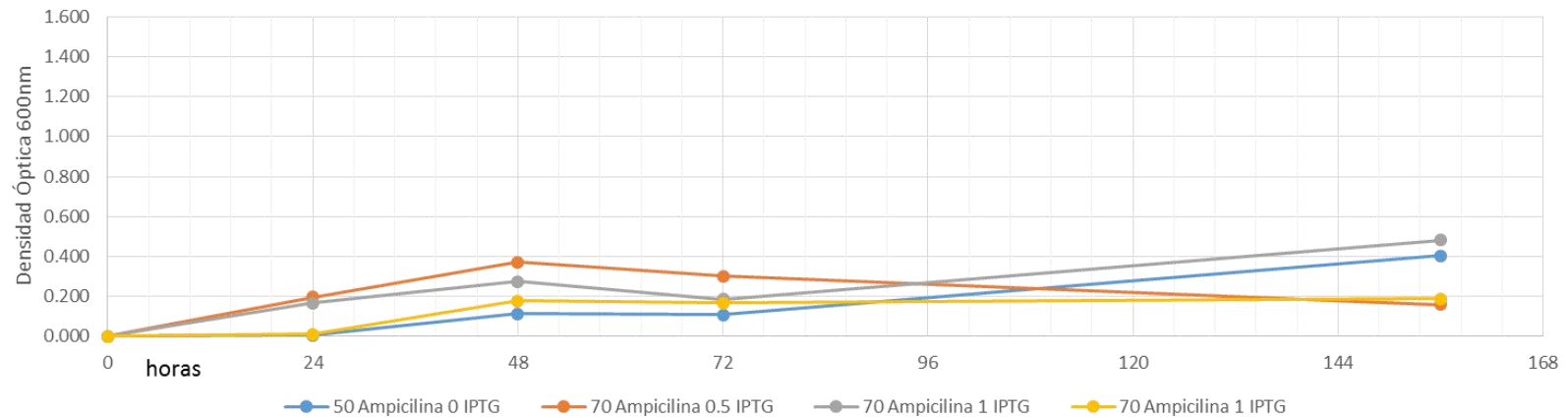


Figura 6. (A) Curso temporal de emisión de fluorescencia de la bacteria *Rhizobium* transformada con pRSET-EmGFP usando el objetivo de 10x. (Resolución 2650x1920, Exposición 8 segundos, Ganancia 4x, contraste lineal). (B) Curva de crecimiento de la bacteria bajo diferentes concentraciones de ampicilina e IPTG

	Concentracion IPTG mM	0 min	4-5min
<i>Escherichia coli</i> transformada con pmCherry	0		
	0.5		
	1		
<i>Pantoea</i> SOG04 transformada con pmCherry	0		
	0.5		
	1		
<i>Escherichia coli</i> transformada con pmGFP	0		
	0.5		
	1		

Figura 3. Imágenes de las diferentes bacterias transformadas con AFPs, bajo constante excitación de luz fluorescente (Objetivo de 10x, resolución 2650x1920, exposición 8 segundos, ganancia 4x, contraste lineal)

Diseño y optimización de un sistema de crecimiento para plántulas de arroz

Para estudiar el proceso de colonización de bacterias marcadas con AFPs en los tejidos de arroz, fue necesario optimizar un sistema de crecimiento para plántulas de arroz que permita observar al microscopio de manera directa y no destructiva, las estructuras de la raíz. Aunque diferentes estudios han demostrado la efectividad de realizar cortes de los tejidos y observar en donde se establecen las bacterias marcadas, nuestro sistema permitirá seguir en tiempo real, todo el proceso de colonización y la migración de las bacterias por las raíces.

Este montaje se optimizó a partir de un par de sistemas desarrollados previamente por Posso (sin publicar), Courtois y colaboradores (2013) y Perrine et al. (2007). Se realizaron modificaciones para ajustarlo a las características radiculares de plántulas *O. sativa* y *O. glumaepatula*, de tal forma que permitirá la evaluación de la colonización, sin destruir las plántulas y con mínima perturbación del sistema radicular. Así mismo, se estableció un protocolo que permitirá trabajar con las plántulas bajo condiciones de total esterilidad.

El sistema consistió en una lámina de portaobjetos con un cubre objetos (24x60mm), separados por láminas de foami (etilvinilacetato), el cual le dio la separación apropiada (2mm) para el crecimiento de la raíz, además de ser un soporte para la semilla en germinación (Figura 8.B).

Dentro de los aspectos importantes para la optimización del sistema, se identificó la selección del material de sellado ya que se requería un material inerte y resistente, que no afectara el desarrollo de la planta o composición del medio así como que también permitiera ajustar la separación entre las láminas.

Por lo tanto, se evaluaron diferentes pegantes como esmalte, silicona y cianoacrilato de etilo. Se estableció que el esmalte podría comprometer el crecimiento de las raíces y la supervivencia de las bacterias, dado que difunde fácilmente en el medio líquido. Por otro lado, el cianoacrilato de etilo (Superbonder) seca rápidamente, dificultando el trabajo en condiciones de esterilidad. De este modo, se concluyó que el pegamento silicona, dejándolo secar por varios días, es un material inerte, de fácil manipulación y de gran resistencia, por lo cual fue seleccionado para el sistema de crecimiento.

Respecto al ajuste de la separación entre laminas, se diseñaron montajes que permitían separaciones de 0.17mm, 0.34mm, 0.51mm y 0.68 mm, usando vidrios

recortados y 2mm empleando láminas de foami. Solo la separación de 0.68mm permitió un crecimiento radicular adecuado en las plántulas, sin embargo, la semilla al tener un grosor mayor rompía fácilmente el vidrio. El foami, proporcionó la separación adecuada para el crecimiento de las raíces sin dañar los tejidos de la semilla.

Otro limitante que se presentó en la adaptación del sistema consistió en que la semilla se deslizaba a través del montaje, comprometiendo los resultados del estudio de colonización. Por lo tanto, se diseñó una plataforma en foami en el cual la semilla se estabilizó y permitió que las raíces pudieran crecer de manera apropiada.

Teniendo en cuenta la adaptación del sistema al estudio de colonización, se estableció un protocolo que permitió trabajar con las plántulas bajo condiciones de total esterilidad. Este consistió en una esterilización del montaje con hipoclorito al 2.5% durante 1 a 2 días, seguido de varios enjuagues con agua destilada. En condiciones asépticas se introduce la semilla en germinación al interior del montaje y este es introducido en un falcón de 50mL.

Se evaluó la esterilidad del sistema, añadiendo medio LB autoclavado e incubándolo a 30°C. Después de 6 días no se observó contaminación. Este protocolo se repitió con el mismo sistema incorporando solución nutritiva (Half-strength Kimura B nutrient solution) como medio de crecimiento para las plántulas de arroz. No se observó contaminación y las plántulas crecieron de manera adecuada. Con este montaje se pudo observar detalladamente las diferentes estructuras de la raíz, sin ningún tipo de manipulación del tejido (Figura 9).

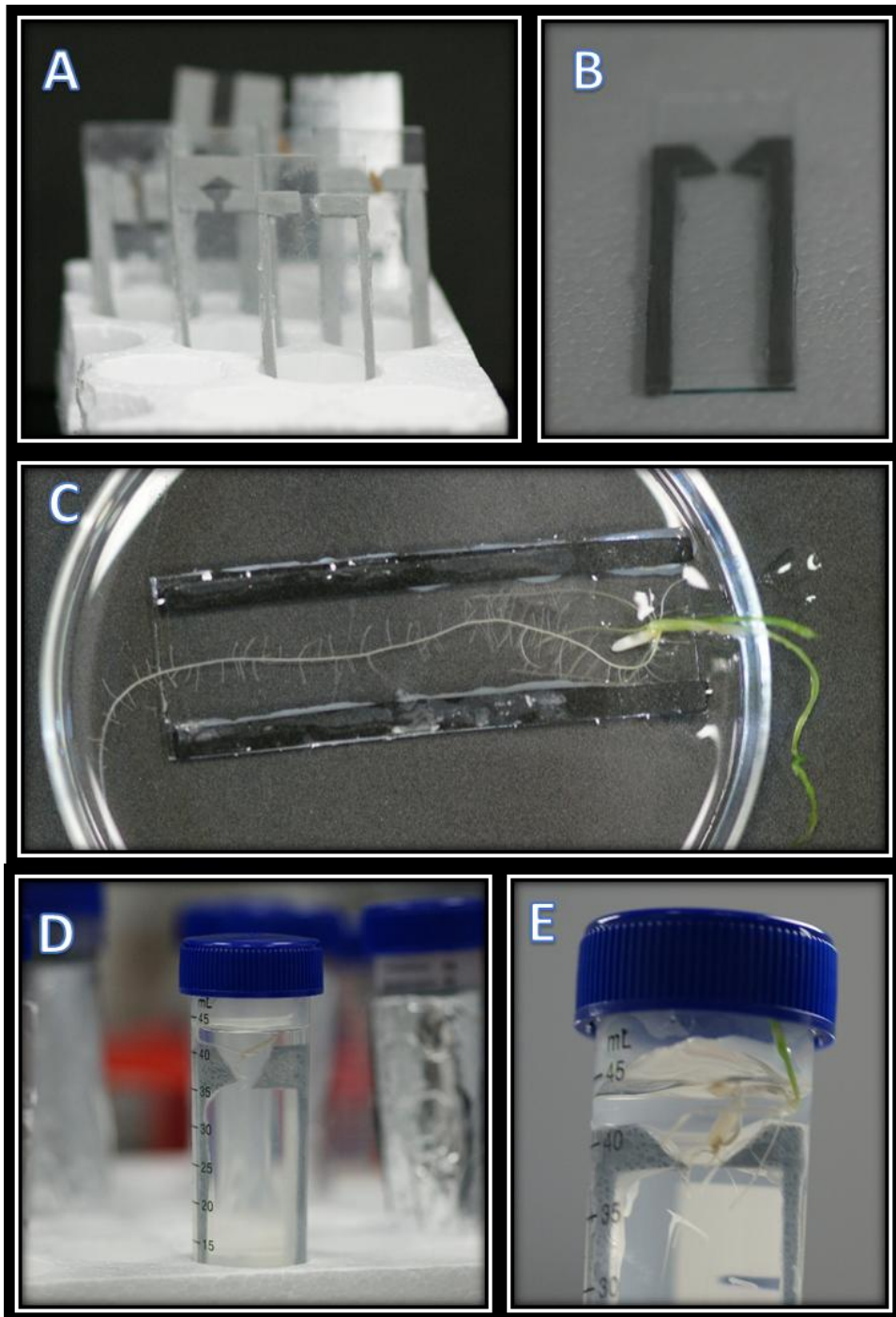


Figura 8. [A] Diseños de montajes realizados. [B] Montaje seleccionado.[C] Plántula de arroz, *creciendo en el sistema de placas.*[D] sistema cerrado completamente. .[E] plántula creciendo en el sistema, totalmente estéril

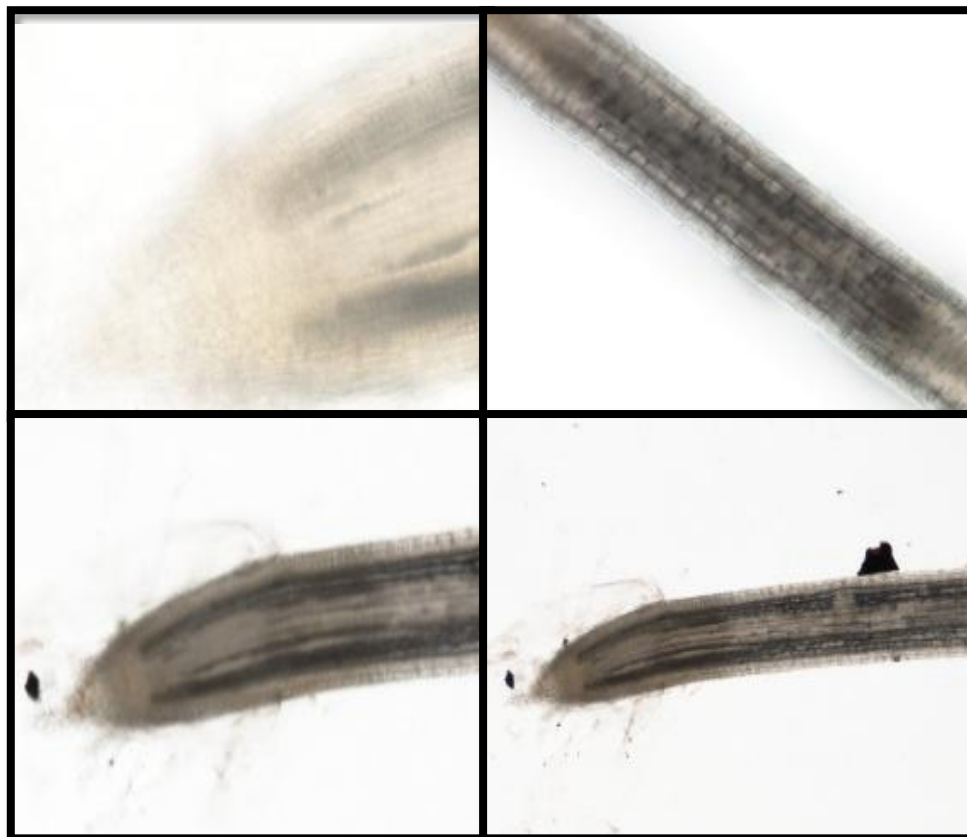


Figura 9. Imágenes de raíz principal de plántula de arroz creciendo en el montaje seleccionado. Tomadas con el objetivo [Arriba izquierda] 40x, [Abajo, Arriba derecha] 10x.

Determinación de concentración óptima de inóculo bacteriano, medio y condiciones de crecimiento

Dentro de los factores extrínsecos que influyen en el proceso de colonización se encuentra el balance nutricional tanto para la planta como para la bacteria. La cantidad y calidad de nutrientes presentes en el medio puede estimular la migración de las bacterias hacia fuentes alternativas de nutrientes como es el interior de los tejidos vegetales (Macleán, 2008). Es por ello, que se deben ajustar las condiciones y medio de crecimiento óptimo que permita el crecimiento apropiado de la planta y garantice la colonización por parte de la bacteria.

Las plántulas que crecieron en un medio óptimo para plántulas de arroz alcanzaron un buen desarrollo radicular, así como un notable desarrollo de hoja y tallo, sin

síntomas de deficiencia nutricional. Sin embargo, las plántulas que crecieron en solución con extracto de levadura, aunque mostraron desarrollo radicular y apical desarrollaron un color amarillo en toda la raíz, similar a la coloración característica del medio. Por otro lado, las plántulas que crecieron en extracto de levadura y bactopectona presentaron poco desarrollo radicular y manchas oscuras en toda la raíz y tallo. Las plántulas que crecieron en medio nutritivo con bactopectona murieron y presentaron poco crecimiento radicular. Finalmente, las plántulas que crecieron en medio LB no desarrollaron tallo ni raíz (Figura 10).

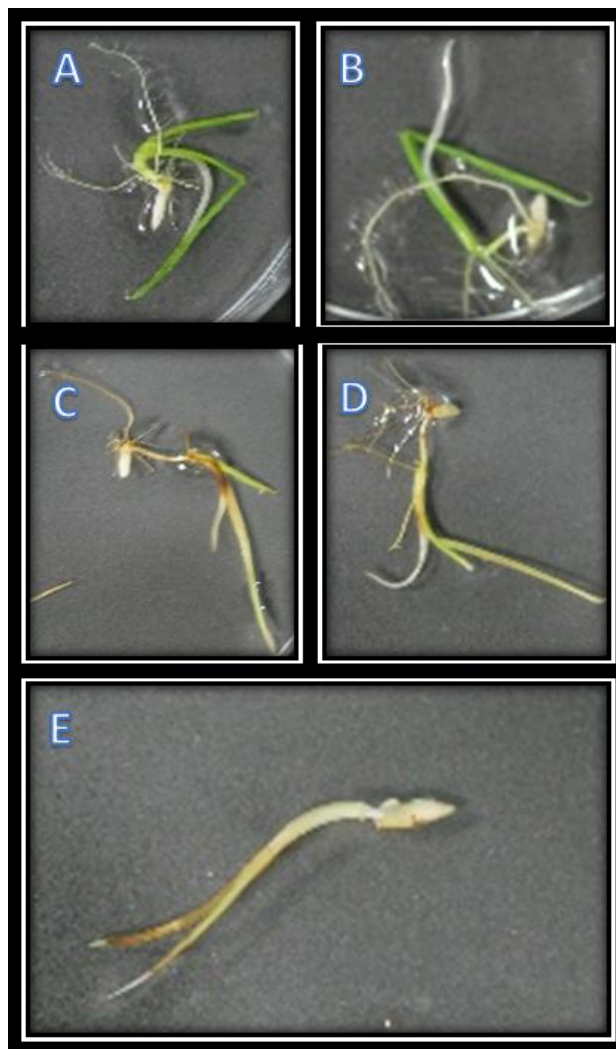


Figura 10. Plántulas de *Oryza glumaepatula* que se desarrollaron en [A] Solucion nutritiva pH5.5 [B] Solucion nutritiva pH 8.5. [C] Solucion nutritiva + Extracto de levadura [D] Solucion nutritiva +Bactopectona. [E] Solucion nutritiva+Extracto de levadura+ Bactopectona.

Por otro lado, la bacteria *Pantoea* SOG04 transformada con pmCherry no creció en el medio nutritivo ajustado a las necesidades de la planta. La bacteria obtuvo un máximo de crecimiento en solución nutritiva con extracto de levadura, y en la solución nutritiva que contiene extracto de levadura y bactopectona (Tabla 6).

Tabla 6. Medidas de absorbancia tomadas después de 24 horas de inoculación de los medios con *Pantoea* SOG04 transformada con pmCherry

Medio de crecimiento	DO _{600nm}
Solucion nutritiva pH 5.5	0.004
Solucion nutritiva pH 8.6	0.006
Solucion nutritiva + Bactopectona	0.573
Solucion nutritiva + extracto de levadura	0.766
Solucion nutritiva + Bactopectona+ extracto de levadura	0.714

Tres días después de la inoculación con las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Pantoea*, las plántulas reaccionaron a la cantidad de inóculo y medio en el cual se desarrollaron. Las plántulas que crecieron en solución nutritiva Kimura B bajo las diferentes concentraciones de inóculo tanto de la bacteria *Rhizobium* como la *Pantoea*, presentaron un desarrollo normal. No hubo un efecto evidente de la concentración de inóculo en el desarrollo de la planta en este medio. Por otro lado, las plántulas que fueron inoculadas con 5uL y 5mL de *Rhizobium*, en el medio nutritivo con extracto de levadura, presentaron un crecimiento adecuado pero con manchas cafés en el tallo. Las plántulas inoculadas con *Pantoea* SOG04 presentaron un crecimiento adecuado y sin ningún tipo de manchas, el medio se observó turbio por lo que hubo un crecimiento bacteriano pronunciado.

3.6 Discusión

Para estudiar el proceso de colonización de bacterias endófitas en tejidos de arroz, el marcaje con proteínas autofluorescentes ofrece múltiples ventajas. Entre estas se encuentran su fácil detección, la visualización de células vivas individuales en su entorno sin destruirlo, además de permitir la visualización en tiempo real (Cubero, 2008). Para ello es necesario la transformación genética de la bacteria, el cual es un proceso por el cual la célula incorpora en su interior moléculas de ADN libre y las mantiene en su genoma por recombinación homóloga o en forma de replicón extracromosómico (Rivero, García, & Calzada, 2012).

Múltiples protocolos biotecnológicos relacionados con introducción de ADN foráneo se han estandarizado para bacterias de alto interés económico como lo son *Agrobacterium tumefaciens*, *Azotobacter vinelandii* (Glick, Brooks, & Pasternak, 1985) y en organismos modelo como *Escherichia coli* (Green & Sambrook, 2012). Sin embargo, estos protocolos no generan una alta eficiencia en la transformación de bacterias relacionadas, particularmente en endófitos descubiertos en las últimas décadas, debido a particularidades estructurales y metabólicas de cada especie bacteriana. Es por ello, y por la gran importancia que representan estas bacterias para la industria agrícola, que se deben estandarizar protocolos que sean altamente reproducibles, con una alta eficiencia, y que sean específicos para la bacteria de interés.

Jojoa (2014), consiguió transformar la bacteria endófito *Pantoea* SOG04, modificando el protocolo utilizado por Elbeltagy et al., (2001). Entre las variables que modificó se encontró el medio de crecimiento, medios de recuperación y cambios en los parámetros de centrifugación para las células competentes. Por otro lado, logró identificar algunos factores que pudieron afectar la eficacia de transformación en *Rhizobium*, como lo es que las bacterias estuviesen siendo sometidas a dosis inadecuadas de ampicilina en el medio de selección, la fase de crecimiento en la que se encontraban las bacterias a la hora de ser colectadas, o el tiempo de recuperación (Jojoa, 2014).

El presente trabajo retomó la transformación de las bacterias endófitas evaluadas por Jojoa (2014) considerando las limitaciones identificadas en ese trabajo.

Debido a que algunas bacterias tienen la capacidad natural de producir betalactamasas, lo cual los hacen resistentes a la ampicilina, fue necesario realizar

un antibiograma por E-test a las bacterias para establecer la concentración inhibitoria mínima. El plásmido empleado en la transformación contiene el gen de resistencia a la ampicilina, el cual confiere resistencia a una concentración de 50µg/mL. Por lo tanto, se descartaron las cepas que presentaran una concentración inhibitoria mínima superior a dicha concentración, ya que de otro modo, no sería posible seleccionar las bacterias transformadas. Se seleccionaron las cepas del género *Pantoea* (SOG04, SOG13, SOG14, SOG18, SOG31, SOL40) y del género *Rhizobium* la cepa SOG26

El éxito de un protocolo de transformación depende de múltiples factores, dentro de los que se encuentran el tamaño y pureza del plásmido a insertar, medio de crecimiento, uso de compuestos que modifiquen las propiedades de la membrana plasmática, temperatura, pH, entre otros (Green & Sambrook, 2012). Estos factores varían de manera particular entre especies y cepas bacterianas debido a constituyentes estructurales de cada bacteria como lo son las diferencias en la pared celular y estructura de la membrana plasmática, diferencias en los sistemas de modificación de las endonucleasas de restricción y diferencias en la cantidad de nucleasas extracelulares (Aune & Aachmann, 2010). Es por ello, que las técnicas de transformación deben ser optimizadas para cada tipo de célula para generar un mayor éxito en la transformación.

En este proyecto se aplicaron dos metodologías de transformación: la electroporación y el choque térmico. De estas, la electroporación es una de las más empleadas por su alta reproducibilidad y por su alta tasa de transformantes supervivientes. Esta técnica se ha utilizado principalmente en microorganismos con paredes celulares gruesas y difíciles de transformar (Madigan, et al., 2009). Sin embargo, parámetros como la composición del buffer de electroporación, número y duración de los intervalos del pulso, intensidad del pulso, entre otras deben ser previamente optimizadas con el fin de obtener una mayor eficiencia en la transformación (Aune & Aachmann, 2010; así como también el número de lavados celulares previo a la electroporación, el número de células a electroporar, la cantidad de ADN y la fase de crecimiento celular (Wu, et al., 2010).

Se logró transformar bacterias del género *Pantoea* (SOG04) con pmCherry, del género *Rhizobium* (SOG26) con pRSET-EmGFP y la cepa control *E. coli* DH5α tanto con pmCherry como con pRSET-EmGFP, al modificar las diferentes variables ya mencionadas. Se evidenció la producción de un moco por parte de la cepa *Rhizobium* SOG26, posiblemente resultados del metabolismo intrínseco de esta

cepa que provocaba la secreción de polisacáridos y metabolitos secundarios. Según Garrity et al. (2005), el crecimiento de *Rhizobium* en un medio enriquecido con carbohidratos, es usualmente acompañado por una gran cantidad de polisacáridos extracelulares. Este moco provocó que las bacterias crecieran en forma de agregado, lo cual afectó en gran medida el éxito de la transformación al limitar el acceso a la membrana plasmática por medio de los diferentes tratamientos realizados.

La variación de parámetros como el voltaje (2120V, 2500V) y el número de pulsos (1 – 2), aumentan la conductividad eléctrica, afectando temporalmente la permeabilidad de la membrana plasmática mediante la formación de poros, permitiendo la entrada de macromoléculas como el ADN (Díaz & López, 2014). Diversos estudios han demostrado, que modificando estas variables puede incrementarse considerablemente el éxito de la transformación. Por ejemplo, un incremento en el número de pulsos, incrementa la eficiencia de transformación en dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, e incluso se ha incrementado esta eficiencia empleado un simple pulso con larga duración (Mahmood, et al., 2008). Sin embargo, un exceso de voltaje o un elevado número de pulsos puede provocar la lisis de las células lo cual conlleva a un menor número de transformantes viables. Los poros formados durante la electroporación no solo facilitan la entrada de material extracelular, sino que también permiten la salida de componentes intracelulares (Garg, Dogra, & Sharma, 1999).

Por otro lado, el éxito de la electrotransformación depende también de factores extrínsecos como la cantidad de sales presentes en el medio de las células competentes, o la cantidad de plásmido. Por lo general, la eficiencia de transformación incrementa proporcionalmente a la concentración de ADN hasta alcanzar el punto de saturación; sin embargo, este punto de saturación también es específico para cada especie (Aune & Aachmann, 2010). Es por ello, que en este proyecto se varió la concentración de plásmido de 100ng a 300ng. La pureza del plásmido y la topología de éste, influyen de manera considerable en la eficiencia de transformación, ya que puede contener endonucleasas, exceso de sales u otros componentes que puedan afectar el voltaje o la estabilidad del plásmido (Aune & Aachmann, 2010).

Otro factor que influye en el éxito de la transformación es la competencia de las células a transformar, es decir, la capacidad de una célula de aceptar ADN y ser transformada, lo cual está determinado genéticamente (Madigan et al., 2009). Por

lo tanto, las condiciones para volver las células competentes también fueron estandarizadas para estas bacterias. El éxito de la competencia depende en gran medida de la fase de crecimiento y el momento en que son colectadas las células. Estos parámetros son importantes a la hora de obtener altos niveles de eficiencia en la transformación (Aune & Aachmann, 2010). En la mayoría de protocolos de transformación para *E. coli* se ha observado una alta eficiencia al coleccionar células en la fase exponencial tardía (Aune & Aachmann, 2010). Sin embargo, para el caso particular de *Rhizobium* y *Pantoea* la transformación se logró al coleccionarlas aproximadamente la mitad de la fase exponencial, fase en la cual las bacterias se encuentran en el estado fisiológico más sano (Madigan, et al., 2009).

Los medios de crecimiento favorecen en gran medida la eficacia de transformación, ya que influyen directamente en el crecimiento, metabolismo y de esta manera en sus características estructurales. El éxito de la transformación con *Rhizobium* se logró por medio de un cambio en el medio de crecimiento. Este medio permitió el crecimiento lento de la bacteria, evitando que se produjera la mucosidad que provocaba la formación de los agregados. La extensa formación y segregación de contenidos extracelulares y metabolitos secundarios, limitaban la transformación al no permitir que se abriera el poro adecuadamente o bloqueando la entrada del plásmido. El medio de crecimiento también puede tener otros efectos, como aumentar la fragilidad de la pared celular bacteriana (Aune & Aachmann, 2010) o afectar la velocidad de crecimiento de las bacterias (Madigan, et al., 2009).

Según Garg et al. (1999), los sistemas de transformación que se han desarrollado para el género *Rhizobium* son menos eficientes que otros desarrollados para otras bacterias. Debido a esto, diferentes estudios de colonización han empleado técnicas dispendiosas como la conjugación, lo cual requiere plásmidos complejos con genes de transferencia (Chi, et al., 2005 & Perrine, et al., 2007). Sin embargo, Garg y colaboradores (1999) lograron desarrollar un protocolo de alta eficiencia para la transformación específica de *Rhizobium leguminosarum*, obteniendo 10^8 transformantes/ μ g de DNA, mediante la modificación de parámetros como el voltaje y densidad de células competentes. Los autores lograron transformar a una intensidad de pulso de 14 kV/cm, con una duración de pulso de 7.3 ms. Para nuestra cepa particular de *Rhizobium*, se logró transformar a una fuerza de pulso de 12.5 kV/cm, con una duración de pulso de 5.0 ms.

Aunque en este proyecto se logró establecer las condiciones que permiten una transformación exitosa en las cepas *Pantoea* SOG04, *Rhizobium* SOG26 y *E. coli*

DH5 α , las otras bacterias del género *Pantoea* (SOG13, 14, 18, 31, 40), y la bacteria control *Azotobacter vinelandii* no se lograron transformar. Esto confirma el hecho de que deben optimizarse las condiciones para cada tipo de bacteria, y no puede generalizarse los protocolos para todas las demás.

Múltiples causas pudieron evitar el éxito de la transformación en estas bacterias. Entre ellas, es posible que el plásmido no se encontrara totalmente puro. A pesar de que el plásmido fue extraído mediante un protocolo de lisis por calentamiento, la preparación podría contener DNAsas, las cuales son capaces de degradar el DNA del plásmido al disminuir la temperatura. La fuente del plásmido también puede influir en la eficiencia de la transformación. Como el plásmido fue propagado en la bacteria *E. coli* ya transformada, es posible que los sistemas de restricción de la célula receptora degraden el ADN extraño, que es reconocido como tal por su patrón de metilación divergente que proviene de la célula de origen (Aune & Aachmann, 2010).

Diferentes compuestos orgánicos como DMSO, DTT, mercaptoetanol y glicina, se han incorporado en diversos protocolos de transformación para modificar la fluidez de la membrana y de esta manera incrementar la permeabilidad de la membrana a macromoléculas y facilitar el ingreso de ADN. La glicina específicamente interfiere con la biosíntesis de membranas mediante la sustitución de L- y D-alanina de peptidoglicano con glicina y reduciendo así el crecimiento celular. También puede inhibir el crecimiento bacteriano al metabolizarse en acetato de etilo el cual es un inhibidor de crecimiento (Ahmad, Rubbab, Deeba, Naqvi, & Rubbab, 2014). Sin embargo muchos de estos componentes pueden ser tóxicos para las bacterias y la concentración adecuada de estos componentes depende de cada tipo de bacteria. Las células competentes que se utilizaron en las transformaciones contenían glicina y es posible que este compuesto afectara en cierta medida la supervivencia de las bacterias que no fueron transformadas.

Por otro lado, se utilizó la transformación mediante choque térmico como una técnica alterna a la electroporación, esto, con el fin de establecer si se lograba mejorar la eficiencia de transformación. Con esta técnica se modificaron variables como los tiempos de incubación en frío y calor. En este procedimiento las bacterias fueron incubadas en una solución que contiene iones Ca²⁺, con el fin de que se unan al ADN mediante interacciones electrostáticas y se facilite la adsorción de este sobre la superficie celular (Sambrook & Russell, 2001). Posteriormente las células se someten a un cambio brusco de temperatura, lo cual provoca que se desestabilice

la membrana celular formando poros temporales en ésta, favoreciendo la entrada del ADN (Rivero, García, & Calzada, 2012). De todas las bacterias seleccionadas, solo se logró transformar la bacteria *E. coli* con esta metodología.

La temperatura es un factor crucial para esta técnica pues afecta la permeabilidad de las membranas. Particularmente para *E. coli* la proporción de lípidos insaturados en las membranas incrementa cuando son cultivadas a temperaturas inferiores a 37°C, lo cual permite que incremente la fluidez de la membrana y la haga más permeable al ADN (Ahmad, et al., 2014). Aunque la estructura de la pared celular de *Rhizobium* es similar a otras bacterias Gram negativas como *E. coli*, este género tiene una inusual y compleja composición de fosfolípidos en la membrana plasmática, que dependiendo de las condiciones nutricionales, los fosfolípidos pueden ser remplazados por lípidos de membrana que no contienen fósforo. Al tener una composición compleja y variable de lípidos en la membrana plasmática, se requerirá para esta cepa establecer en que rangos de temperatura se puede lograr la fluidez adecuada para el ingreso de macromoléculas como el ADN.

Existen otras técnicas empleadas para transformación como la conjugación, sonificación y “congelamiento/descongelamiento” (Vincze & Bowra, 2006). Entre estas, la conjugación es la técnica más empleada para *Rhizobium*. La conjugación es un mecanismo de transferencia genética que implica el contacto entre células, lo cual involucra una célula donadora que contiene el plásmido conjugativo y una célula receptora (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009). En este proyecto, por límite de tiempo no se probaron otras metodologías de transformación.

Confirmación de emisión de fluorescencia y estabilidad de la fluorescencia

Posterior a la transformación se procedió a confirmar si el gen se encontraba presente en las bacterias y si estas estaban expresando la proteína, así como también el tiempo de emisión de fluorescencia y la estabilidad de la fluorescencia durante largos periodos de visualización. Mediante la confirmación por PCR se determinó que todas las bacterias transformadas portaban el gen, y la visualización por el microscopio de epifluorescencia confirmó que las bacterias transformadas estaban autoexpresando la proteína sin necesidad de inducción, a excepción de la cepa *Rhizobium* SOG26 que no emitía ningún tipo de fluorescencia.

El IPTG (Isopropiltiogalactosa) es uno de una serie de análogos de la galactosa, el cual actúa en la inducción de las proteínas autofluorescentes, al unirse a la proteína

del represor *lac*, alterando su conformación de modo que no pueda unirse a la región promotora del operon *lac* (Green & Sambrook, 2012). El IPTG induce la transcripción del operon *lac*, y por lo tanto la producción de la proteína de fluorescencia. El vector que fue transfectado en las bacterias, contiene el operon *lac* para prevenir la inducción de las proteínas, hasta que una apropiada densidad celular ha sido alcanzada (Green & Sambrook, 2012). De este modo, la autoinducción de las diferentes bacterias transformadas pueda deberse a una alta densidad de bacterias produciendo lactosa u otros compuestos que modifiquen el represor *lac*.

Por otro lado, la máxima inducción del promotor *lac* (represor de la expresión de proteínas autofluorescentes), requiere la acción de la proteína activadora del Adenosín Monofosfato Cíclico (cAMP), el cual es mayormente activo cuando las células están creciendo en un medio sin glucosa (Green & Sambrook, 2012). El medio LB en el cual fueron crecidas e inducidas las bacterias transformadas, tiene un alto contenido en glucosa, lo cual también pudo contribuir a la alta expresión de la proteína en estas bacterias.

En este proyecto se realizó la inducción a diferentes concentraciones de IPTG, con el fin de establecer la concentración óptima en la cual se observa una mayor expresión de proteínas autofluorescentes. La bacteria *E coli* transformada con pmCherry tuvo un máximo de expresión a las 70-72 horas, al comienzo de la fase estacionaria. La concentración óptima de IPTG para esta bacteria fue de 0.5mM IPTG con 50 µg/mL de ampicilina. Por otro lado, la bacteria *Pantoea* transformada con pmCherry tuvo máximo de expresión a las 44-48 horas al comienzo de la fase estacionaria. Esta bacteria tiene un crecimiento más acelerado que *E coli* bajo estas condiciones, lo cual implica una mayor densidad de bacterias produciendo proteínas fluorescentes en menor tiempo. La concentración óptima de IPTG para esta bacteria es de 1mM IPTG con 50 µg/mL de Ampicilina.

Finalmente para la *E. coli* transformada con pRSET-EmGFP, se observó una mayor fluorescencia en la fase exponencial tardía, entre las 44 y 48 horas después de inoculada. La concentración óptima de IPTG para esta bacteria es de 1mM IPTG con 50 µg/mL de ampicilina, sin embargo si se aumenta la cantidad de ampicilina a 70µg/mL se observa una mayor cantidad de bacterias fluorescentes, incluso sin necesidad de IPTG, debido a que a esta concentración más alta de antibiótico puede provocar una mayor selección de células que portan el plásmido por un periodo más prolongado. Las diferencias en la concentración de IPTG óptima para la expresión

de la proteína de fluorescencia, se deben particularmente a la maquinaria celular de cada cepa bacteriana (Green & Sambrook, 2012).

Por otro lado se estableció que tanto la cepa *Pantoea* SOG04 como la *E. coli* transformadas con pmCherry decrecieron significativamente la expresión la proteína de fluorescencia a las 156 horas, mientras que *E. coli* transformada con pRSET-EmGFP continuo emitiendo fluorescencia constantemente incluso después de 156 horas. Este descenso en la expresión puede ser causado por una muerte importante de bacterias. Como las bacterias se encontraban en un sistema cerrado sin renovación de medio, el crecimiento exponencial no puede ser mantenido indefinidamente, ya que los nutrientes escasean y se producen metabolitos que en grandes concentraciones son tóxicos para las bacterias (Madigan et al., 2009).

Por otro lado la ausencia de expresión de las proteínas autofluorescentes en la cepa *Rhizobium* puede deberse principalmente a la producción de un mucilago espeso, que formaba agregados extensos, evitando la entrada del IPTG al interior de las células. Según Green y Sambrook (2012), todas las cepas de *Rhizobium* producen polisacaridos extracelulares solubles en agua, los cuales tienen como principal constituyente el ácido heteropolisacarido (80-90%). El resto de los constituyentes, para la mayoría de las cepas, son neutrales, de los cuales algunos son importantes para el proceso de colonización, particularmente para la formación de nódulos en las leguminosas (Garrity, et al, 2005). Por lo tanto, podría considerarse disminuir solo momentaneamente la producción de estos polisacaridos para inducir la expresión de la proteína autofluorescente, y posteriormente estimular la expresión de estos para no afectar el proceso de colonización.

Finalmente, en la inducción, una de las variables más importantes para obtener un alto nivel de expresión de la proteína autofluorescente es la temperatura a la cual a la cual la bacteria crece (Green & Sambrook, 2012). La temperatura puede afectar diferentes factores relacionados con la expresión proteica, entre ellos, la tasa de crecimiento celular, plegamiento intracelular de la proteína expresada, disponibilidad de grupos prostéticos, denaturación térmica de la proteína, actividad de proteasas u otras enzimas líticas endógenas, u otras variables (Green & Sambrook, 2012). Por lo anterior es recomendable realizar la inducción de la proteína y crecer las bacterias en un rango amplio de temperaturas, con el fin de optimizar este parámetro.

Este estudio también determinó que la cantidad de IPTG no es un factor determinante en la estabilidad de la proteína. La fluorescencia desaparece a los pocos minutos después de que se aplica la luz de fluorescencia sin importar a que concentración se encuentre este inductor. Además, se estableció que las bacterias transformadas con pmCherry tienen una mayor fotoestabilidad, que aquellas que fueron transformadas con pRSET-EmGFP. Según CShaner, Steinbach, & Tsien, (2005), todas las proteínas fluorescentes eventualmente pierden la fluorescencia tras la excitación extendida; sin embargo, existe una variación sustancial en la tasa de pérdida de la fluorescencia entre las diferentes proteínas. Particularmente, la proteína de fluorescencia pRSET-EmGFP tienen un fotoblanqueamiento o pérdida de la fluorescencia mayor que otras proteínas, a diferencia de las proteínas Red como mCherry, que poseen la mayor fotoestabilidad (CShaner, Steinbach, & Tsien, 2005).

Optimización de un sistema de crecimiento para plántulas de arroz y determinación de concentración óptima de inóculo bacteriano

Para el estudio de colonización de las bacterias endófitas en tejidos de arroz, es indispensable adaptar un montaje no destructivo y aséptico, que permita el desarrollo de las raíces y su visualización en el microscopio sin manipulación. Es por ello, que se adaptó un montaje adecuado y una metodología que permitiera trabajar en condiciones asépticas sin dañar los tejidos vegetales. De esta manera es posible observar la colonización en tiempo real e incluso la migración de las colonias bacterianas transformadas a través de los tejidos.

Algunos autores han realizado cortes histológicos de los diferentes tejidos de las plántulas de arroz, para establecer en donde se han establecido las bacterias endófitas marcadas. Chi et al. (2005), realizaron un corte sencillo en los tejidos radiculares del arroz usando un bisturí estéril y visualizaron directamente al microscopio sin ningún tipo de fijación. Por otro lado, Gyaneshwar et al. (2001), realizaron una fijación de 4 horas en paraformaldehído 4% con solución buffer fosfato. Posteriormente los tallos y raíces fijados fueron cortados en 80 µm de grosor por medio de un micrótopo. Elbeltagy et al. (2001), realizaron un procedimiento similar, mediante el cual produjo cortes de tallos y raíces de 1 a 2 mm, después de que son fijados en 4% glutaraldehído al vacío por 30 minutos. Sin embargo el sistema de crecimiento desarrollado en este proyecto, permite la visualización directa y en tiempo real de la colonización, con la mínima perturbación de los tejidos radiculares.

Dentro de las ventajas de trabajar en condiciones asépticas es que se evita el riesgo de observar falsos positivos, que puedan surgir por transferencia horizontal del plásmido de las AFP a otras bacterias presentes en el medio. Por otro lado, se evita la pérdida de bacterias transformadas por competencia con microorganismos que sean resistentes a técnicas de esterilización.

También se determinó los medios de crecimiento en los cuales las plántulas pueden crecer de manera óptima, sin mostrar efectos detrimentales causados por el medio. Se observó un crecimiento apropiado de plántulas en el medio Kimura bajo los dos diferentes pHs. El pH del medio nutritivo es un factor crucial ya que determina la solubilidad de algunos nutrientes, principalmente potasio y calcio (Lara Herrera, 1999). Sin embargo, el tiempo de observación fue relativamente corto, por lo que no se alcanzó a evidenciar mayores cambios en el fenotipo de las plantas. Es importante recalcar que el sistema y medios de crecimiento adaptados en este proyecto permiten mantener las plántulas durante un lapso de tiempo corto (7 días después de germinación) similar a lo reportado en otros trabajos (Perrine, et al., 2007).

Así mismo, se estableció en cuales de estos medios nutritivos las bacterias transformadas crecieron en mayor o menor medida. Como se mencionó previamente, las condiciones nutricionales afectan el balance hormonal y estimulan la migración de bacterias hacia el interior de los tejidos, por lo que es un factor que garantiza en gran medida el éxito de la colonización. Con los resultados obtenidos en este proyecto se demostró que las bacterias no crecieron en el medio óptimo para plántulas de arroz, lo cual puede favorecer la migración de estas bacterias al interior de tejidos de arroz, o por el contrario evita que las bacterias logren adaptarse al medio y mueran antes de que se dé el proceso de colonización.

Es importante reiterar que no se podrá establecer el medio ideal para garantizar el proceso de colonización hasta que se inoculé las plántulas con las bacterias transformadas. Sin embargo, diferentes medios nutritivos han sido empleados para estudiar el proceso de colonización con otras bacterias endofitas. Chi y colaboradores, (2005) y Elbeltagy, et al., (2001) utilizan un medio semisólido con solución nutritiva (Half-strength Hoagland's No. 2 plant growth medium). Por otro lado, Perrine y colaboradores (2007) usaron el medio líquido Fahreus F10.

Respecto a la concentración de inóculo empleado, autores de investigaciones relacionadas han utilizado diferentes concentraciones. Chi et. al., (2005) utilizaron

5mL de inóculo bacteriano (10^8 cell/mL). Perrine, y colaboradores, (2007) emplearon una dilución 1:20 de inóculo bacteriano OD600 nm de 0.1. Elbeltagy, y otros, (2001) utilizaron una concentración de inóculo de 10^5 cell/seed. En este proyecto se utilizó una concentración de inóculo mínima que consistió en 5ul, y una concentración de inóculo mayor que consistió en 5mL. Con ninguna de estas concentraciones se vio un cambio significativo en el desarrollo vegetal.

En este proyecto se establecieron algunas de las condiciones necesarias para estudiar el proceso de colonización por parte de bacterias del género *Rhizobium* y *Pantoea* marcadas con proteínas autofluorescentes en tejidos de las especies de arroz, *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*. Se transformaron las bacterias *Pantoea* SOG04 con pmCherry, *Rhizobium* SOG26 con pRSET-EmGFP y la cepa control *E. coli* DH5 α . Se determinó la concentración óptima de IPTG para la inducción de las proteínas autofluorescentes de estas bacterias transformadas. Se estandarizó el sistema de crecimiento para plántulas de arroz y se realizó una aproximación a los medios de crecimiento y concentración de inóculo que permitirán evaluar el proceso de colonización. Los objetivos cumplidos por este proyecto, son de suma importancia ya establecen la base para realizar diferentes estudios del proceso de colonización de bacterias endófitas, lo cual contribuye a largo plazo en la implementación de técnicas amigables con el medio ambiente e incluso disminuir el uso de fertilizantes químicos en cultivos de arroz

3.7 Conclusiones

1. Con los resultados de este estudio, se confirmó que el éxito de un protocolo de transformación depende de múltiples factores, y por ello, las técnicas de transformación deben ser optimizadas y estandarizadas para cada tipo de célula.
2. Se logró transformar con una alta eficiencia la bacteria *E. coli* DH5 α , siguiendo el protocolo modificado por Jojoa (2014), con una fuerza de pulso de 12.5 kV/cm, una duración de pulso de 5.0 ms, recuperadas por 48h a 30°C en medio S.O.C Comercial (Invitrogen).
3. Se logró transformar la bacteria *Pantoea* SOG04 con la modificación de la cantidad de plásmido a 300ng, fuerza de pulso de 12.5 kV/cm, una duración de pulso de 5.0 ms, recuperadas por 48h a 30°C.
4. Se logró transformar el *Rhizobium* SOG26 mediante la modificación del medio de crecimiento a YEMB, colectando las células en fase estacionaria, con una fuerza de pulso de 12.5 kV/cm y una duración de pulso de 5.0 ms.
5. Se confirmó la emisión de fluorescencia por parte de todas las bacterias transformadas, sin necesidad de inducción a excepción de la cepa *Rhizobium* SOG26.
6. Se determinó la concentración de IPTG óptima para cada cepa transformada, y se estableció que la expresión de estas proteínas es afectada tanto por la composición del medio de crecimiento, como por la temperatura.
7. Se demostró el descenso notable y rápido de la fluorescencia de las bacterias transformadas con AFPs después de ser excitadas por fluorescencia de 2 a 5 minutos, y se concluyó que este factor es dependiente de las características fisicoquímicas de la proteína, más que por el genotipo de la bacteria o concentración de IPTG.

3.8 Recomendaciones

- Se recomienda incluir un rango amplio de temperaturas de crecimiento en la optimización de las electrotransformaciones. Además, se recomienda medir la eficiencia de la transformación en número de transformantes/ μg de DNA, de tal modo que pueda establecerse una comparación cuantitativa entre los métodos.
- Para la inducción de *Rhizobium* sería recomendable tratar las células con compuestos orgánicos que modifican las propiedades de la membrana plasmática, de tal forma que la haga más permeable a inductores como el IPTG.
- Estandarizar el medio de crecimiento óptimo para plántulas de arroz que garantice una colonización exitosa de las bacterias transformadas.
- Determinar la concentración de inóculo óptima de bacterias transformadas que garantice una colonización exitosa.
- Observar la visualización de la fluorescencia durante más de 156 horas para la bacteria *E coli* transformada con pRSET-EmGFP y futuras bacterias que sean transformadas con este plásmido.
- Estandarizar los parámetros con los cuales se realizaran las fotografías de las raíces con las bacterias.

4. Referencias

- International Rice Research Institute. (s.f.). Advances in rice genetics. Supplement to Rice genetics IV. *Proceedings of the Fourth International Rice Genetics Symposium, 22- 27 October 2000, Los Baños, Philippines. Los Baños (Philippines)*, 642 p.
- Adams, P., & Kloepper, J. (2002). Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil*, 240: 181–189.
- Ahmad, I., Rubbab, T., Deeba, F., Naqvi, S., & Rubbab, T. (2014). Optimization of *E. coli* culture conditions for efficient DNA uptake by electroporation. *Turkish Journal of Biology*, 38.
- Álvarez Chavarría, B. (2000). *Centros de diversidad. La riqueza biológica de los cultivos tradicionales, herencia mundial amenazada por la contaminación genética*. Ciudad de México: Kinética buró creativo/Elsa Marín.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media. Fourth Edition*. Washington, D.C: CRC Press.
- Aune, T., & Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1301-1313.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de Maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endofitas-diazotrofas nativas*. Montevideo: Universidad de la Republica. Facultad de Ciencias.
- Brondani, C., Rangel, P., Brondani, R., & Ferreira, M. (2002). QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theor Appl Genet*(104), 1192-1203.
- Chen, R. F., Shen, R. F., Gu, P., Dong, X. Y., Du, C. W., & Ma, J. F. (2006). Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. *Annals of botany*, 98(2), 389-395.
- Chi, F., Shen, S.-H., Cheng, H.-P., Jing, Y.-X., Yanni, Y., & Dazzo, F. (2005). Ascending Migration Of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 7271-7278.

- Compant, S., Reiter, B., Sessitsc, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait, E. (2005). Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol*, 71(4): 1685–1693.
- Courtois, B. A.-H. (2013). Genome-wide association mapping of root traits in a japonica rice panel. *PloS one*, 8(11), e78037.
- CShaner, N., Steinbach, P., & Tsien, R. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, VOL.2 NO.12 .
- Cubero, J. (2008). Utilización de la proteína de fluorescencia verde (GFP) para estudios de supervivencia y expresión génica en bacterias de plantas. En V. Pallás, C. Escobar, P. Rodríguez, & J. Marcos, *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología* (págs. 269-283). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- de Bashan, L., Holguin, G., & R. Glick, B. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En R. Ferrera, & A. Alarcón, *Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta microorganismo* (págs. 170-224.). Editorial Trillas: Mexico.
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimon, P., . . . Brisse, S. (2009). Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea* agglomerans Strains by Multilocus Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47 no. 2 300-310.
- Díaz, Y. H., & López, A. A. (2014). Transformación Genética de Eucariotas. *Kuxulkab*, 18(35).
- Elbeltagy, A., Nishioka, N., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada , T., . . . Minasawa, K. (2001). Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 5285-5293.
- FAO. (1997). Los Fertilizantes, en cuanto a contaminantes del agua. En FAO, *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos*. (págs. ISBN 92-5-303875-6). Burlington, Canadá: Canada Centre for Inland Waters.
- FAO. (2002). *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030*. FAO.
- FAO. (2014). Recuperado el Abril de 2014, de Grasslands Species Profile: <http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/gbase/data/pf000274.htm>
- FAO, IFA. (2002). *Los Fertilizantes y su uso*. Roma: Cuarta Edición.

- Fedearroz. (2014). *Federación Nacional de Arroceros*. Recuperado el Abril de 2014, de <http://www.fedearroz.com.co/new/consumo.php>
- Fresco , L. (2003). Los fertilizantes y el futuro. *FAO*. Recuperado el Abril de 2014, de <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0306sp1.htm>
- Garg, B., Dogra, R. C., & Sharma, P. K. (1999). High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2802-2804.
- Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (Edits.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition.* . Springer-Verlag.
- Gilbert, S., & Epel, D. (2009). *Ecological Development Biology: Integrating Epigenetics, Medicine, and Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Glick, B. R., Brooks, H. E., & Pasternak, J. J. (1985). Transformation of *Azotobacter vinelandii* with plasmid DNA. *Journal of Bacteriology*, 162 (1):276.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Fourth Edition*. New York: Cold Spring Harbor.
- Gyaneshwar, P., James, E., Mathan, N., Reddy, P., Reinhold, B., & Ladha, J. (2001). Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183(8):2364-2645.
- IRRI. (1998). *Report of the Fifth External Programme and Management Review of International Rice Research Institute*. Obtenido de Rice in the world: <http://www.fao.org/wairdocs/tac/x5801e/x5801e08.htm>
- James, E. K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 197-209.
- James, E., & Olivares, F. (1998). Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1): 77-119.
- Jojoa, S. (2014). Transformación de bacterias endófitas con proteínas autofluorescentes como herramienta para el estudio de la dinámica de colonización de tejidos vegetales. *Santiago de Cali. Universidad Icesi.*, Tomado de (<http://hdl.handle.net/10906/76968>).
- Joshi, S., Gupta, V., Aggarwal, R., Ranjekar, P., & Brar , D. (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor Appl Genet*, 100: 1311-1320.

- Labrín Sotomayor, N. (2007). *Estudio de la resistencia de variedades de arroz (Oryza sativa L.) venezolanas al virus de la hoja blanca*. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Landaverde Figueroa, N. (2012). Evaluación de diferentes dosis de mezclas de herbicidas preemergentes (Pendimethalin y Butachlor) y el efecto alelopático de exudados radiculares de malezas en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*) bajo condiciones de riego, en el distrito de riego ... *Universidad de El Salvador*, San Salvador.
- Lara Herrera, A. (1999). Manejo de la solución nutritiva en la producción de Tomate en hidroponía. *Terra*, vol 17 (3).
- Larrainzar , E., O'Gara, F., & Morrissey, J. (2005). Applications of Autofluorescent Proteins for In SITU Studies in Microbial Ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59:257–77.
- Macleán, C.A.W. (2008). *Efecto promotor del crecimiento vegetal de dos cepas de Pantoea agglomerans (Ewing y Fife, 1972) sobre ballica inglesa (Lolium perenne L.) Cv. Nui. Valdivia*
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación.
- Mahmood , T., Zar, T., & Saqlan Naqvi, S. (2008). Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 145-148.
- Perez, A., & Chamorro, L. (2013). Bacterias endofitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Rev. Colombiana cienc. Anim.*, 5(2):439-462.
- Perrine, F., Prayitno, J., Rolfe , B., Weinman, J., & Hocart, C. (2007). Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *Journal of experimental Botany*, Vol 58 No 12 pp 3343-3350.
- Rivero, Y. S., García, A. H., & Calzada, R. F. (2012). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Dpto. Biología Molecular, Dirección de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas*.
- Roy, M. L., & Srivastava, R. C. (2013). Effect of integrated use of chemical fertilizer and bioinoculents on growth, nitrate assimilation and yield of rice (*Oryza sativa L.*). *Indian Journal of Agricultural Research*, 47(5), 419-424.

- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- The World Bank Group. (2014). *World Development Indicators: Agricultural inputs*. Obtenido de <http://wdi.worldbank.org/table/3.2>
- Vincze, E., & Bowra, S. (2006). Transformation of Rhizobia with Broad-Host-Range Plasmids by using a freeze-thaw method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2290-2293.
- Wu, N., Matand, K., Kebede, B., Acquaah, G., & Williams, S. (2010). Enhancing DNA electrotransformation efficiency in Escherichia coli DH10B electrocompetent cells. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (5), 21-22.
- Yanni, Y. G., & Dazzo, F. B. (2010). Enhancement of rice production using endophytic strains of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. *Plant Soil*, 336:129–142.

5. Anexos

Anexo1.1 Cebadores para la amplificación de los genes de AFPs y condiciones estandarizadas para PCR.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)	Tm (°C)	GC%	Producto esperado (bp)
mCherry 2013F	AAGGGCGAGGAGGAT AACAT	20	58,19	50,00	699
mCherry 5514R	CTTGTACAGCTCGTC CATGC	20	59,00	55,00	
EmGFP F	ACGTAAACGGCCACA AGTTC	20	59,06	50,00	187
EmGFP R	AAGTCGTGCTGCTTC ATGTG	20	59,13	50,00	

(Jojoa, 2014)

Anexo1.2 Condiciones estandarizadas para PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 Inicio	97	10:00
2 Desnaturalización Inicial	96	5:00
3 Desnaturalización	94	00:30
4 Alineamiento	55.8/61.2*	00:30
5 Elongación	72	00:45
30 ciclos de repetición de pasos 3 a 5		
6 Elongación final	72	10:00

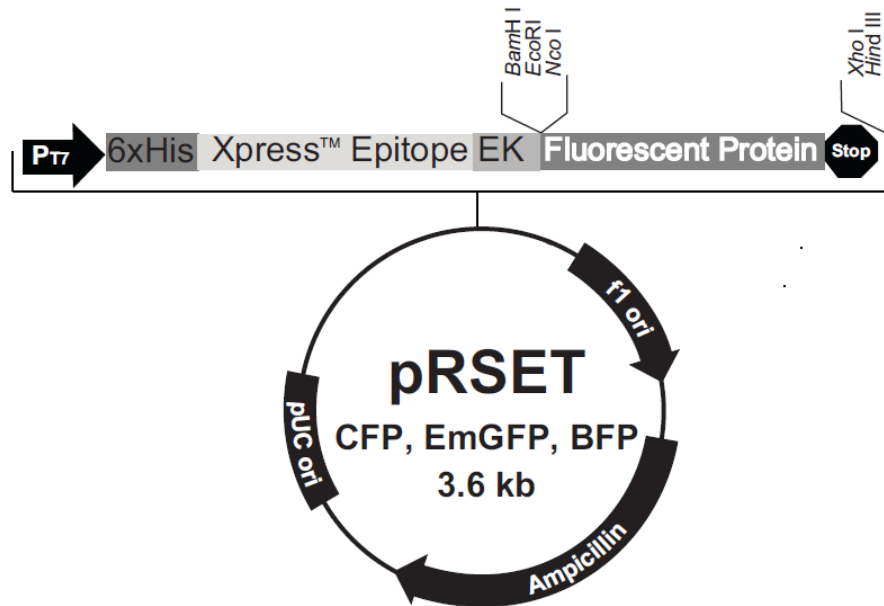
*Temperatura de Alineamiento 55.8°C para los cebadores EmGFP y 61.2°C para los cebadores mCherry

Anexo1.3 Coctel para PCR.

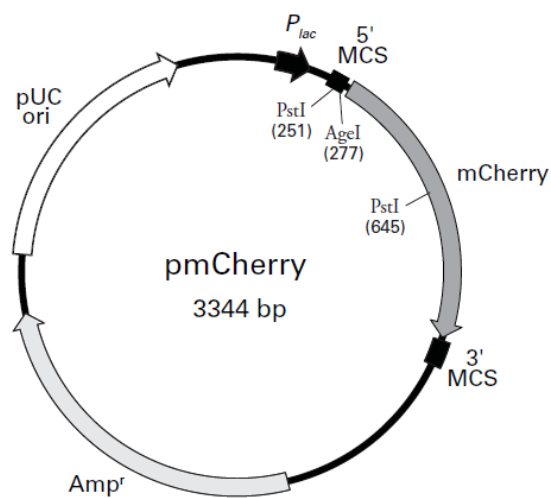
Reactivo	Concentración por reacción (uL)
Buffer	2
Cloruro de Magnesio (MgCl)	3.5
Desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPS)	0.5
Cebador Forward	1
Cebador Reverse	1
Taq Polimerasa	0.3
Agua	10.7
ADN	1
Volumen Final	20

Anexo 2. Mapas de los plásmidos empleados en la transformación. (A) pRSET-EmGFP (Invitrogen). (B) pmCherry (Clontech)

A. pRSET-EmGFP



B. pmCherry



5.1 Medios de crecimiento

Medio específico para rizobios sin agar

Componentes	g/L
Extracto de levadura	10
K ₂ HPO ₄	0.5
FeCl ₃ *6H ₂ O	0.002
MgSO ₄	0.2
NaCl	0.2

*pH 6.8, (Atlas, 2010)

Caldo YEMB (Yeast Mannitol Media)

Componentes	g/L
Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0.5
Extracto de levadura	0.4
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1

*pH 6.8, (Atlas, 2010)

Medio LB

Componentes	g/L
Bactopectona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

*pH 6.8, (Atlas, 2010)

SOB/SOC

Componentes	g/900mL
Bactotryptona	18
Extracto de levadura	4.5
NaCl	9
KCl 1M Concentracion final 2.5mM	2.25

*pH 6.8, (Green & Sambrook, 2012)

Medio específico para *Pantoea*

Componentes	g/L
Bactopectona	5

Extracto de levadura	3
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.9

*pH 6.8 ,(Eliana T, sin publicar)

Medio de crecimiento para *Azotobacter vinelandii*

Componentes	g/L
MgSO ₄	0.2
CaSO ₄	0.1
Extracto de levadura	0.5
Sacarosa	20
K ₂ HPO ₄	0.8
KHPO ₄	0.2l

*pH 6.8, (Glick, Brooks, & Pasternak, 1985)

Medio nutritivo para plantas de arroz

Half-strength Kimura B nutrient solution (modified from Kimura B macronutrients and Arnon micronutrients). Contiene los siguientes macronutrientes (mM): (NH₄)₂SO₄ (0.18), MgSO₄.7H₂O (0.27), KNO₃ (0.09), CaNO₃.4H₂O (0.18), KH₂PO₄ (0.09), y los micronutrientes (mM): Na₂EDTA-Fe(II) (20), MnCl₂.4H₂O (9), H₃BO₃ (46), Na₂MoO₄.4H₂O (9), ZnSO₄.7H₂O (0.7) y CuSO₄.5H₂O (0.3). pH ajustado a 4.5. (Chen, y otros, 2006)

5.2 Protocolos utilizados

Protocolo esterilización de semillas

Para la esterilización de las semillas, estas fueron escascarificadas y posteriormente pasadas por agua destilada estéril durante 3 minutos. Luego las semillas se tratan con nistatina 1% durante 10 minutos, solución desinfectante (Hipoclorito de sodio al 3%, NaCl 30g/L, NaOH 1.5g/L) por 5 minutos y finalmente se tratan con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 30 minutos. Las semillas son transferidas asépticamente a tarros de mayonesa (previamente autoclavados) con 5mL de agua y ampicilina (50ug/mL), e incubadas en oscuridad a 28°C

Protocolo Inducción de expresión de AFPs en *E. coli*

1. Inocular 20 mL de LB con ampicilina (40ug/ml) con una colonia fresca (48 horas de incubación) e incubar a 33°C y 186 rpm durante 24h
2. Inocular 20 mL de LB con ampicilina (50ug/ml) con 200uL del cultivo previo. Incubar a 33°C y 186 rpm durante 24 h
3. Centrifugar el cultivo a (4°C, 10000 rpm durante 5 min) descartar sobrenadante y resuspender en 40mL de agua destilada estéril.
4. Repetir centrifugación y descartar sobrenadante. Resuspender en 5mL de agua destilada estéril
5. Diluir hasta alcanzar una absorbancia de 0,688 a OD600
6. Inocular 20 mL de medio LB** con 200uL del inóculo previo e incubar a 33°C y 186 rpm en oscuridad.

*Para *Rhizobium* SOG26 transformada con pmGFP, se utilizó medio YEMB y LB en todos los pasos.

** LB/YEMB con diferentes concentraciones de IPTG y Ampicilina