

**Informe Final
Beca BENTR13**

Apellido y nombres del Becario: Farina, Florencia

Apellido y nombres del Director: Valverde, Claudio Fabián

Apellido y nombres del Co-director: Agaras, Betina Cecilia

Institución: Universidad Nacional de Quilmes

Unidad Académica: Departamento de Ciencia y Tecnología

Proyecto acreditado en el que se inserta: Interacciones Biológicas, de las moléculas a las comunidades (PUNQ 1009/11)

Título del Plan de Trabajo: Generación de cepas recombinantes de *Pseudomonas* probióticas vegetales para el estudio de colonización radicular por microscopía de fluorescencia.

1. Labor desarrollada durante el año de ejecución de la beca

Las bacterias del género *Pseudomonas* son reconocidas por colonizar la rizósfera de diferentes especies de plantas, y poseer además un amplio rango de propiedades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal (PGPR). Algunas de estas actividades son la solubilización de fosfatos inorgánicos, la mineralización de fósforo orgánico, la producción de fitohormonas, y la síntesis de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares que están involucrados en el antagonismo hacia hongos patógenos (Haas and Défago, 2005). Gracias a la existencia de suelos naturalmente supresivos, existe una colonización preferencial de las raíces por determinadas especies bacterianas (Berg and Smalla 2009). Todas estas características influyen para que el género *Pseudomonas* sea considerado de especial interés para la producción de bioinsumos agrícolas, que ayuden a estimular el desarrollo de los cultivos y promover su salud.

Como parte de un consorcio público-privado dedicado al estudio de la biología del suelo en sistemas agrícolas bajo siembra directa (BIOSPAS), nuestro laboratorio cuenta con una colección de 22 aislamientos del género *Pseudomonas*, obtenidos de suelos agrícolas y de rizósferas de pasturas, soja y maíz. Si bien los aislamientos han sido caracterizados en cuanto a su potencial como controladores de enfermedades fúngicas de los cultivos de interés, la propuesta para el presente trabajo buscó complementar dicha caracterización con el objetivo de generar criterios adicionales de selección de candidatos para su posible utilización como agroinsumos.

El trabajo realizado se centró en llevar a cabo el marcaje genético con el sistema del transposición mini-Tn7 de 5 aislamientos de *Pseudomonas* por conjugación tetraparental, lo cual implica la inserción cromosomal en un sitio neutro, de un *cassette* de expresión que codifica una proteína fluorescente al UV y proteínas de resistencia a antibióticos (Lambertsen et al 2004). Estas cepas marcadas y caracterizadas fueron utilizadas para estudiar la interacción bacteria-planta a través de ensayos de colonización de raíces de soja, maíz y trigo en suelo natural en presencia de flora bacteriana indígena, y también en condiciones de esterilidad utilizando vermiculita.

2. Objetivos alcanzados

Se lograron marcar 5 aislamientos de *Pseudomonas* con transposones mini-Tn7 que contenían genes codificantes para proteínas fluorescentes (GFP o eYFP) y para resistencia a antibióticos (Km²⁵ o Gm¹⁰). La verificación de la correcta inserción se realizó por PCR con oligonucleótidos específicos y también por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Leica DMI6000B.

Asimismo, se corroboró que la inserción del transposón no ha afectado las propiedades PGPR y biocontrol de los aislamientos, a través del análisis cualitativo de solubilización de fosfatos, producción de ácido cianhídrico, actividad fosfolipasa, actividad exoproteasa y antagonismo de hongos fitopatógenos.

Finalmente, pudo estudiarse de forma preliminar la interacción bacteria-planta en raíces de trigo, soja y maíz, tanto en suelo natural como en vermiculita estéril.

3. Resultados obtenidos.

Marcaje genético

Para realizar el marcaje genético de los aislamientos de *Pseudomonas* spp., se utilizó el sistema de transposición mini-Tn7; procedimiento que ya ha sido utilizado exitosamente en nuestro laboratorio (Jousset et al 2006). Brevemente, implica la inserción cromosomal en un sitio neutro y específico del genoma, de un *cassette* de expresión que codifica para una proteína fluorescente al UV y para proteínas de resistencia a antibióticos (Koch et al, 2001; Lambertsen et al 2004). Se inserta en orientación única en un sitio localizado *downstream* de la región codificante para el gen *glmS* (Koch et al, 2001; Lambertsen et al 2004). Con dicha metodología lograron marcarse exitosamente 5 aislamientos bacterianos (SVBP6, SVBP3, SMMP3, RBAN4, RPBP2).

Verificación del sitio de inserción del cassette

Con el fin de confirmar que los aislamientos contenían la inserción cromosomal en el sitio esperado, se realizaron PCRs con los oligonucleótidos Tn7R-109 y Tn7-GlmS, específicos para una secuencia del transposón en el sitio Tn7R y del gen *glmS*, respectivamente. Luego de poner a punto la técnica, lograron obtenerse fragmentos del tamaño esperado (200 pb aproximadamente) en los cinco aislamientos seleccionados para tal fin (Figura 1). Uno de los aislamientos marcados (SVBP6 #9) se ha secuenciado para corroborar su localización respecto del gen *glmS* (*data not shown*). Como controles se ha utilizado *P. protegens* CHA0 (control negativo) y *P. protegens* ARQ1 (control positivo; CHA0 con plásmido GFP-Km en sitio attTn7). Una vez secuenciada SVBP6 #9, se incluyó como control positivo (Ct+) para las otras corridas electroforéticas.

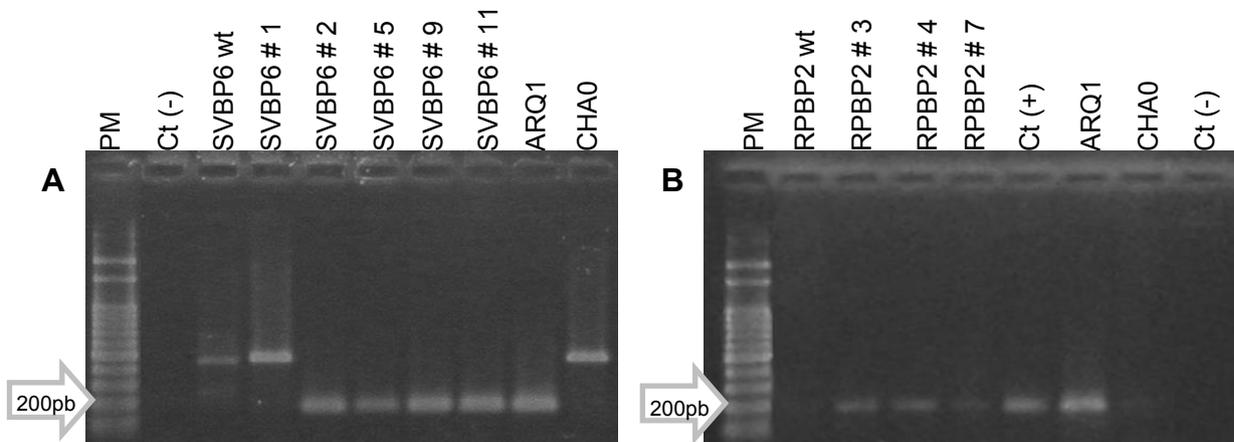


Figura 1 – Electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los ensayos de PCR de 2 de los aislamientos marcados con diferentes transposones mini-Tn7, con los oligonucleótidos específicos Tn7R 109 y Tn7-*glmS*. (A) Marcaje de SVBP6 con *eYFP*. (B) Marcaje de RPBP2 con *GFP*. Los clones marcados se indican con # seguido de un número. Las calles correspondientes al marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L, Argentina) se indican como PM.

Verificación de la expresión de la proteína fluorescente por microscopía

La observación al microscopio de los aislamientos marcados que habían dado resultados positivos en las reacciones de PCR sirvió para dar sustento a la correcta inserción del

transposón. Todos los aislamientos mostraron fluorescencia al exponerlos a luz ultravioleta con filtro para emisión de GFP. Algunas de las imágenes adquiridas se muestran en la Figura 2.

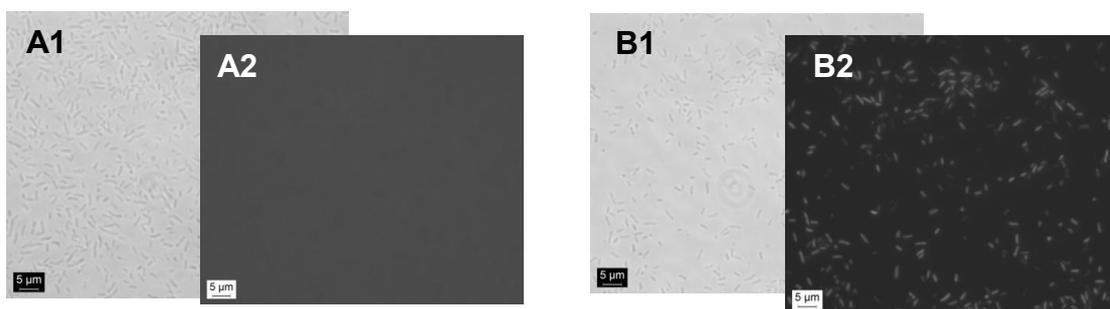


Figura 2 – Imágenes adquiridas por microscopía de fluorescencia. Se muestran ejemplos de los controles de SVBP6 observados con luz blanca (A1) y UV bajo filtro GFP (A2). También se presenta un ejemplo de los aislamientos marcados: SVBP6 92bajo luz blanca (B1) y UV (B2).

Estabilidad de la inserción

Debido a que la inserción del transposón es cromosomal, la probabilidad de que el mismo se escinda del lugar de inserción es muy baja a nula. De todas formas, se llevó a cabo un ensayo de estabilidad teniendo en cuenta que los *cassettes* codificaban para proteínas de resistencia a antibióticos. Repiques sucesivos en medio NYB sin presión de selección podrían llevar a la pérdida del inserto. Por eso, se analizaron las UFC/ml en medio NA con y sin antibiótico luego de repicar los aislamientos marcados diariamente en medio NYB sin antibiótico.

Las inserciones resultaron ser estables para todos los clones, mostrando porcentajes de estabilidad mayores al 87%. Un único aislamiento, RPBP2, mostró mayor inestabilidad frente a la inserción de dicho transposón, con 1-4% de estabilidad.

Caracterización fenotípica de las cepas marcadas

Por tratarse de una inserción cromosomal en un sitio neutro del genoma bacteriano, la misma no debería afectar el metabolismo de las bacterias marcadas, es decir, debería ser inocua. Con el fin de corroborarlo, se llevaron a cabo ensayos de caracterización de distintas propiedades PGPR y biocontrol, característicos de las bacterias del género *Pseudomonas*. Los resultados de las distintas cepas marcadas, en general, no mostraron variaciones al ser comparadas con los de las cepas salvajes.

Producción de ácido cianhídrico (HCN).

En presencia de HCN, un papel absorbente embebido en solución de ácido pícrico 0,5% en Na_2CO_3 2,5%, vira desde color amarillo hasta naranja (Egan, et al., 1998). En cuanto a la producción del compuesto volátil HCN, no se encontraron diferencias en el viraje de color entre las cepas salvajes y las marcadas (Tabla 1). Por lo tanto, puede sostenerse la idea que la inserción del transposón no ha afectado la producción del compuesto en cuestión.

Actividad fosfolipasa.

La actividad de las enzimas fosfolipasas contribuye al ciclo del fósforo en el suelo. En todos los casos, menos uno (RPBP2 #4, Tabla 1), la actividad fosfolipasa de los aislamientos marcados ha sido equivalente a la mostrada por las cepas salvajes. Coincidiendo con lo descripto para los aislamientos salvajes (Agaras, 2014), algunos mostraron halos opacos

(correspondientes a la expresión de fosfolipasa C) y otros, translúcidos (correspondientes a la expresión de fosfolipasa A) (Sacherer et al 1994).

Actividad exoproteasa.

Una de las estrategias de competencia que despliegan algunos microorganismos es la secreción de proteasas extracelulares específicas. En este caso, su detección se realizó incubando los aislamientos en un medio con leche como fuente de caseína. Todos los clones mostraron el mismo comportamiento que las cepas salvajes de las que provenían, excepto uno (RPBP2 #4) que evidenció la falta de actividad proteolítica extracelular (Tabla 1).

Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los principales nutrientes que limita el crecimiento de las plantas, pero una proporción importante de los fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes se inmoviliza rápidamente después de su aplicación y se vuelve inaccesible a las plantas. De esta forma, la solubilización de fosfatos es una forma posible de aumentar la disponibilidad de fósforo soluble en el suelo (Nautiyal, 1999). La capacidad de utilizar fosfatos insolubles como fuente de fósforo se determinó mediante un ensayo de crecimiento en un medio con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Resultados positivos se evidenciaron por la formación de un halo de solubilización alrededor de la colonia. Todos los clones ensayados mostraron el mismo comportamiento que las cepas salvajes de las que provenían.

Antagonismo de hongos fitopatógenos

Si bien se contaba con 11 hongos fitopatógenos, el estudio de la capacidad antagonista se centró en aquellos que mostraban elevado espectro de inhibición (Agaras, 2014); es por esto que no todos los aislamientos bacterianos se enfrentaron con todos los hongos. El ensayo consistió en estriar a ambos lados de una placa con agar papa glucosado, cada aislamiento y en el centro se colocó un taco de ágar conteniendo el micelio fúngico fresco. Las mismas se incubaron hasta que las placas control (conteniendo sólo el hongo) alcanzaron su crecimiento máximo. El nivel de inhibición logrado por los diferentes aislamientos marcados coincidió con lo descrito para las cepas salvajes (Agaras, 2014) en la mayoría de los casos. Sin embargo, algunos de ellos mostraron reducido su espectro de inhibición sobre ciertos hongos fitopatógenos (Tabla 1), lo cual podría deberse a una modificación en el metabolismo de la bacteria debida a la inserción del transposón.

En el caso específico de RPBP2 #4, se vio que ha sufrido la pérdida de varias propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Una hipótesis que podría desprenderse sería que dicho clon sea un mutante regulatorio de variante de fase respecto del aislamiento original. La inserción parecería ser correcta, ya que en el gel de agarosa donde se corrieron las amplificaciones por PCR se observan bandas iguales en los 3 clones analizados. Este fenómeno ha sido reportado para muchas *Pseudomonas* y otras bacterias (Browk et al, 2003).

Tabla 1 – Resultados de los ensayos de caracterización fenotípica de los aislamientos marcados genéticamente

Cepa	Ensayo														
	Solubilización de fosfatos	Producción HCN	Actividad exoproteasa	Actividad fosfolipasa	Antagonismo ¹										
					118	119	120	122	125	126	128	130	131	134	139
SVBP6 wt	+	+	+	+	3	2	3	4	3	n.e.	2	5	3	4	n.e.
SVBP6 #2	+	+	+	+	3	2	3	4	3	n.e.	2	5	3	4	n.e.
SVBP6 #9	+	+	+	+	3	2	3	4	3	ne	2	5	3	4	ne
RPBP2 wt	+	-	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	4	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	2	3	n.e.
RPBP2 #3	+	-	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	4	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	3	3	n.e.
RPBP2 #4	+	-	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	0	1	n.e.
RPBP2 #7	+	-	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	4	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	3	3	n.e.
SMMP3 wt	+	+	+	+	4	4	4	4	3	3	3	3	2	3	3
SMMP3 #3	+	+	+	+	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3
SMMP3 #6	+	+	+	+	5	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3
SVBP3 wt	-	+	+	+	4	4	4	4	3	3	3	3	3	4	3
SVBP3 #1	-	+	+	+	4	4	4	4	3	3	3	3	3	4	3
SVBP3 #2	-	+	+	+	4	4	4	4	3	3	3	3	3	4	3
SVBP3 #3	-	+	+	+	4	4	4	4	3	3	3	3	3	4	3
RBAN4 wt	+	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	3	n.e.	n.e.	n.e.	2	2	3	n.e.
RBAN4 #1	+	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	3	n.e.	n.e.	n.e.	3	2	4	n.e.
RBAN4 #2	+	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	3	n.e.	n.e.	n.e.	2	2	3	n.e.
RBAN4 #3	+	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	3	n.e.	n.e.	n.e.	3	2	4	n.e.

¹La capacidad antagonista se ha resumido con valores arbitrarios, que van desde 0 (incapacidad de inhibir el crecimiento del hongo) hasta 5 (antagonismo total, sin crecimiento del hongo).
n.e.= no ensayado

Colonización radicular

Colonización en plantas de trigo, soja y maíz, crecidas en suelo y vermiculita.

Como ensayo preliminar para evaluar la capacidad de colonización radicular de plantas de trigo (*Triticum aestivum*, variedad Yará, Klein S.A.), soja (*Glycine max*, Don Mario DM4970) y maíz (*Zea mays*, híbrido experimental C3 Sursem) por parte de uno de los aislamientos marcados (SVBP6, clones #2 y #9), se hicieron ensayos en potes de 330 cc (n = 5 por aislamiento) conteniendo $\frac{3}{4}$ partes de vermiculita estéril o suelo de la reserva natural Sta. Catalina (Marrero, 2013). La inoculación se realizó con suspensiones bacterianas en solución salina (SS) equivalentes a 3 unidades de DO₆₀₀: 50 g de semillas se agitaron manualmente con 350 μ l de suspensión bacteriana, por 1 minuto. Se sembraron 5 semillas por pote y se dejaron crecer por un lapso de 15 días a 24-26 °C en invernadero, con riego por subirrigación con solución de Jensen estéril (los potes con vermiculita) o agua destilada estéril (los potes con suelo natural), cada 2 días (Vincent et al, 1970). Como control negativo se inocularon las semillas sólo con SS.

Completado el período de incubación, se pesaron aproximadamente 2 g de raíces de cada tratamiento y se agregaron 20 ml de SS. Se llevaron a shaker por 15 minutos a 250 rpm y 1 minuto en sonicador para despegar las bacterias adheridas pertenecientes a la rizósfera. Diluciones del sobrenadante se sembraron, por triplicado, en placas con medio Gould's S1 suplementado con Cm²⁰, CHX¹⁰⁰, y Km²⁵ o Gm¹⁰, según correspondiera a la resistencia contenida en el transposón. Pasado el tiempo de incubación, se contabilizaron las UFC/g de raíz húmeda (Tabla 2). Paralelamente, para analizar el patrón de colonización, se tomaron algunas raíces sobrantes, se colocaron sobre placas de Gould's S1 suplementado con Cm, CHX y Km o Gm, según correspondiera, y luego fueron analizadas utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B, con filtro GFP. Estas observaciones no se realizaron sobre las raíces recién cosechadas ya que las mismas mostraban autofluorescencia de color verde cuando eran expuestas al filtro GFP, por lo que se dificultaba la observación directa de las posibles microcolonias establecidas en la superficie radicular. En cambio, luego de incubarlas durante 24hs en medio S1 selectivo con los antibióticos correspondientes, lograron magnificarse las microcolonias constituidas en las raíces.

El análisis de la flora autóctona competitiva presente en suelo natural mostró mínimo crecimiento al sembrar muestras directas en medio S1 selectivo para *Pseudomonas*, junto con los antibióticos Gm/Km, Cm y CHX. Los recuentos evidenciaron 30,0 \pm 5,7 UFC/g de suelo resistentes a Gm Cm CHX y 60,0 \pm 11,5 UFC/g de suelo resistentes a Km Cm CHX.

Como era de esperarse, los recuentos en vermiculita superaron a los de suelo. Este último es un ambiente con mayor carga microbiana natural, por lo que las bacterias deben competir por la colonización de las raíces y, por lo tanto, los recuentos fueron menores que para vermiculita. Los controles no mostraron fluorescencia, evidenciando colonización radicular por parte de microorganismos del suelo o del ambiente mismo donde se dejaron crecer las plántulas. En contraste, todas las raíces provenientes de semillas inoculadas con las *Pseudomonas* marcadas mostraron fluorescencia al UV con filtro GFP.

Tabla 2 – Recuentos obtenidos de los ensayos de colonización en trigo, soja y maíz crecidas en vermiculita estéril y suelo natural.

Vermiculita			Suelo		
Ensayo ²	Promedio UFC/g raíz	DS	Ensayo ⁹	Promedio UFC/g raíz	DS
Control soja	1,47E+04	2,31E+03	Control soja	1,49E+04	1,98E+03
SVBP6 #2 soja	2,95E+06	3,28E+05	SVBP6 #2 soja	9,57E+03	4,78E+03
SVBP6 #9 soja	1,84E+06	6,13E+05	SVBP6 #9 soja	0,00E+00	0,00E+00
Control maíz	3,08E+05	2,05E+04	Control maíz	8,74E+03	6,79E+02
SVBP6 #2 maíz	2,84E+05	9,84E+04	SVBP6 #2 maíz	2,51E+04	1,11E+04
SVBP6 #9 maíz	5,71E+06	2,08E+06	SVBP6 #9 maíz	9,28E+03	3,75E+03
Control trigo	4,16E+04	7,15E+03	Control trigo	2,98E+04	2,25E+03
SVBP6#2 trigo	4,21E+06	1,24E+06	SVBP6 #2 trigo	1,38E+04	2,02E+03
SVBP6#9 trigo	9,23E+06	3,41E+06	SVBP6#9 trigo	2,05E+04	5,72E+02

² Control soja, Control maíz y Control trigo corresponden a semillas inoculadas con SS en lugar de suspensiones bacterianas.

Colonización de los aislamientos marcados en plantas de trigo crecidas en vermiculita

Debido a algunas inconsistencias encontradas y la complejidad que acarrea estudiar colonización en suelo natural por microscopía, para evaluar los demás aislamientos se decidió reducir el ensayo a una sola especie de cultivo y en una única condición de crecimiento menos compleja: trigo creciendo en vermiculita estéril.

Se siguió el mismo procedimiento empleado anteriormente pero con una leve modificación. Las semillas se inocularon siguiendo un procedimiento descrito por Rizobacter S.A., donde 50 g de semillas se agitaron manualmente con 400 µl de suspensión bacteriana y 100 µl de protector bacteriano PremaxR[®] utilizado en inoculantes comerciales (Rizobacter Argentina S.A.), por 1 minuto. Como control negativo también se sumaron semillas inoculadas con SS + PremaxR[®].

Los resultados de los experimentos de colonización radicular en plantas de trigo para los cinco aislamientos marcados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 - Recuento 15 días post inoculación.

Ensayo	Promedio UFC/g raíz	Desvío Std.
SVBP3 #3	3,63E+07	2,00E+07
SMMP3#3	8,75E+07	2,73E+07
SVBP6 #9	5,25E+07	1,42E+07
RBAN4 #2	1,38E+07	1,53E+06
RPBP2 #3	8,05E+06	3,49E+06
Ct premax	1,77E+03	2,79E+02
Ct SS	1,29E+04	1,32E+03

Todos los aislamientos mostraron un rango de colonización desde $8,05 \times 10^6$ hasta $8,75 \times 10^7$ UFC/g de raíz, siendo las cargas rizosféricas significativamente mayores que en los controles (Premax y SS) (Tabla 3). Los recuentos obtenidos en los grupos de plantas control (Tabla 3 - Ct premax y Ct SS) revelan la presencia de microorganismos exógenos capaces de crecer en

medio selectivo S1, posiblemente de origen endofítico o ambiental (durante el ensayo en el invernáculo) aunque puede observarse que los recuentos obtenidos fueron mucho menores que en el caso de los grupos de plantas inoculadas con los aislamientos marcados. Esto puede deberse a su menor competitividad respecto a las cepas inoculadas y a su menor abundancia relativa en relación a las cepas inoculadas.

Se analizó al microscopio de fluorescencia la colonización en distintas porciones de las raíces. Las imágenes mostraron un patrón continuo de microcolonias a lo largo de toda la extensión de la raíz analizada. En los controles puede observarse la presencia de microorganismos exógenos ya que no muestran fluorescencia al exponerlos a luz UV con filtro GFP (Figura 3).

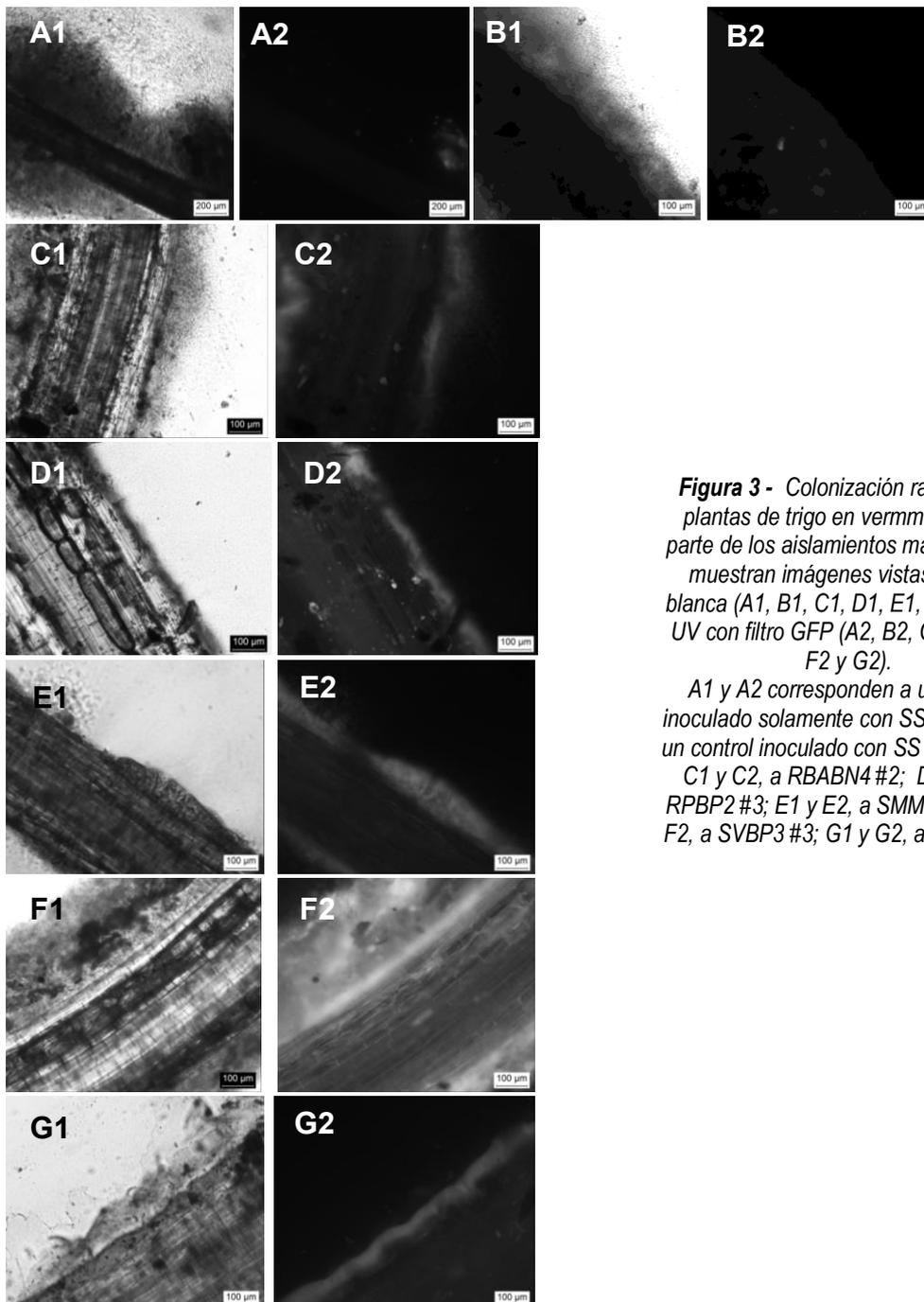


Figura 3 - Colonización radicular de plantas de trigo en vermiculita por parte de los aislamientos marcados. Se muestran imágenes vistas bajo luz blanca (A1, B1, C1, D1, E1, F1 y G1) y UV con filtro GFP (A2, B2, C2, D2, E2, F2 y G2).

A1 y A2 corresponden a un control inoculado solamente con SS; B1 y B2, a un control inoculado con SS y Premax®; C1 y C2, a RBABN4 #2; D1 y D2, a RPBP2 #3; E1 y E2, a SMMP3 #3; F1 y F2, a SVBP3 #3; G1 y G2, a SVBP6 #9.

4. Bibliografía consultada

1. Guzmán, A., et al., *Selection and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with cotton crop (Gossypium hirsutum)*. Revista Colombiana de Biotecnología, 2012. **15**: p. 182-190.
2. Coyne, M., *Soil Microbiology: an exploratory approach*. 1999, Delmar Publishers.
3. C. J. Bécquer, H.A.D.P., *Estudio de la interacción de Trichoderma harzianum con bacterias dinitro fijadoras de vida libre*. Pastos y Forrajes, 2001. **24**(1): p. 35-39.
4. Berg, G., et al., *Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to Verticillium wilt*. Canadian Journal of Microbiology, 2000. **46**: p. 1128-1137.
5. Berg, G. and K. Smalla, *Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere*. FEMS Microbiology Ecology, 2009. **68**: p. 1-13.
6. Bulgarelli, D., et al., *Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants*. Annu. Rev. Plant Biol., 2013. **64**: p. 807-838.
7. Lugtenberg, B. and F. Kamilova, *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria*. Annu. Rev. Microbiol., 2009. **63**: p. 541-556.
8. Haas, D. and G. Défago, *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(4): p. 307-319.
9. Agaras, B., *Pseudomonas nativas de suelos agrícolas bajo siembra directa. Dinámica de poblaciones y caracterización de aislamientos antagonistas*. Capítulo 5, 2014, Universidad Nacional de Quilmes.
10. Agaras, B., L.G. Wall, and C. Valverde, *Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina*. Applied Soil Ecology, 2012. **61**: p. 305-319.
11. de-Bashan, L.E., et al., *Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales*, in *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*, R. Ferrera-Cerrato and A. Alarcón, Editors. 2007, Trillas, Mexico City, Mexico. p. 170-224
12. Pernasetti, S. and G.D. Barbaro, *Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal como biofertilizantes*. Biología en agronomía, 2012. **2**(2): p. 119-128.
13. Bloembergen, G. and B. Lugtenberg, *Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria*. Current Opinion in Plant Biology, 2001. **4**: p. 343-350.
14. Agaras, B. and C. Valverde, *Pseudomonads in agricultural soils and rhizosphere. From molecules to communities*, in *Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura sustentable*, I.E.G.d. Salamone, et al., Editors. 2012, Asociación Argentina de Microbiología. p. 163-180.
15. Lugtenberg, B. and L. Dekkers, *What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent?* Environmental Microbiology, 1999. **1**: p. 9-13.
16. Drogue, B., et al., *Which specificity in cooperation between phyto stimulating rhizobacteria and plants?* Research in Microbiology, 2012. **123**: p. 500-510.
17. Oku, S., et al., *Identification of Chemotaxis Sensory Proteins for Amino Acids in Pseudomonas fluorescens Pf0-1 and Their Involvement in Chemotaxis to Tomato Root Exudate and Root Colonization*. Microbes Environ, 2012. **27**(4): p. 462-469.
18. Nautiyal, C.S., *An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms*. FEMS Microbiology Letters, 1999. **170**: p. 265-270.
19. Kloepper, J., et al., *Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria*. Nature, 1980. **286**: p. 885-886.
20. Holt, J.G., *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed, 1994, Lippincott Williams & Wilkins.
21. Valverde, C. and G. Ferraris, *Las Pseudomonas: un grupo heterogéneo con diversos mecanismos promotores del desarrollo vegetal*, in *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz*, M. Puente, J. García, and A. Peticari, Editors. 2009, Ediciones INTA, Buenos Aires. p. 22-43.
22. Couillerot, O., et al., *The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol Pseudomonas fluorescens F113 on Azospirillum brasilense phytostimulators*. Microbiology, 2011. **157**: p. 1694-1705.
23. Troxler, J., et al., *Persistence of a biocontrol Pseudomonas inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles*. Soil Biology & Biochemistry, 2012. **44**: p. 122-129.

24. Programa de Servicios Agrícolas Provinciales, M.d.A., Ganadería y Pesca. *Sistema Integrado de Información Agropecuaria*. 2013; Available from: http://www.siaa.gov.ar/sst_pcias/estima/.
25. Dumón, A.D., et al., *Comportamiento de diferentes cultivares de trigo a Wheat streak mosaic virus (WSMV) y High Plains virus (HPV) mediante infección artificial con el vector Aceria tosichella Keifer, bajo condiciones de campo*, in *RIA*, 2013. Artículos. p. 1-10.
26. Galantini, J.A., *Ciencia y experiencia para una siembra directa sustentable en los ambientes frágiles del S y SO Bonaerense*, 2014.
27. Paliwal, R.L. *Introducción al maíz y su importancia*. FAO. 2001; Available from: <http://www.fao.org/3/a-x7650s/x7650s00.htm>.
28. MAIZAR, *El maíz, primero en el mundo*. 2011.
29. FAO. *Perspectivas de cosechas y situación alimentaria*. 2013; Available from: <http://www.fao.org/docrep/017/al998s/al998s.pdf>.
30. INTA, *El INTA ante la preocupación por la sustentabilidad de largo plazo de la producción agropecuaria argentina*. . Sitio Argentino de Producción Animal, 2003.
31. Ventimiglia, L.A. and L.T. Baudrix, *Soja: Manejo para rendimiento y calidad*, 2014, INTA Pergamino. p. 1-4.
32. Fiqueni, M.F.G., et al., *Co-inoculación en soja: efectos sobre nodulación, crecimiento y rendimiento*, in *5to Congreso de la Soja del Mercosur*. 2011, Rosario, Argentina.
33. Intagro. *Mapa Areas de Cultivo*. 2004; Available from: <http://www.intagro.com/mapas>.
34. Dunne, C., et al., *Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of Pythium-mediated damping-off of sugar beet*. *Plant Pathology*, 1998. **47**: p. 299-307.
35. Benbrook, C.M., *World Food System Challenges and Opportunities: GMOs, Biodiversity, and Lessons from America's Heartland*. 1999.
36. Chin-A-Woeng, T., et al., *Description of the Colonization of a Gnotobiotic Tomato Rhizosphere by Pseudomonas fluorescens Biocontrol Strain WCS365, Using Scanning Electron Microscopy*. *The American Phytopathological Society*, 1997. **10**(1): p. 79-86.
37. Gould, W.D., et al., *New Selective Media for Enumeration and Recovery of Fluorescent Pseudomonads from Various Habitats*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985. **49**(1): p. 28-32.
38. Jousset, A., et al., *Secondary metabolites help biocontrol strain Pseudomonas fluorescens CHA0 to escape protozoan grazing*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006. **72**(11): p. 7083-7090.
39. Lambertsen, L., C. Sternberg, and S. Molin, *Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins*. *Environmental Microbiology*, 2004. **6**(7): p. 726-732.
40. Choi, K.-H. and H.P. Schweizer, *mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols*, 2006. **1**: p. 153-161.
41. Koch, B., L.E. Jensen, and O. Nybroe, *A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site*. *Journal of Microbiological Methods*, 2001. **45**: p. 187-195.
42. Agaras, B., P. Sobrero, and C. Valverde, *A CsrA/RsmA translational regulator gene encoded in the replication region of a Sinorhizobium meliloti cryptic plasmid complements Pseudomonas fluorescens rsmA/E mutants*. *Microbiology*, 2013. **159**: p. 230-242.
43. Craig, N.L., *Transposon Tn7*, in *Mobile DNA*. , D.E. Berg and M.M. Howe, Editors. 1989, Washington DC. American Society for Microbiology. p. 221-225.
44. Egan, S.V., *Simple picrate paper kit for determination of the cyanogenic potential of cassava flour*. . *J. Sci. Food Agric.* , 1998. **76**: p. 39-48.
45. Sacherer, P., G. Défago, and D. Haas, *Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene gacA in the biocontrol strain Pseudomonas fluorescens CHA0*. *FEMS Microbiology Letters*, 1994. **116**: p. 155-160.
46. Marrero, M., *Caracterización de Pseudomonas que colonizan la rizósfera de plantas de importancia económica*, in *Tesis de Maestría*. 2013, UNSAM.
47. Vincent, J., *A manual for practical study of root-nodule bacteria*, 1970, Backwell Scientific Publications: IBP Handbook. p. 164.
48. Broek, D.v.d., et al., *Biocontrol Traits of Pseudomonas spp. Are Regulated by Phase Variation*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003. **16**(11): p. 1003-1012.

5. Asistencia a reuniones científicas, talleres, etc. durante el período de beca.

- Il Workshop Latinoamericano sobre PGPR. 21-26 Septiembre 2014. La Falda, Córdoba, Argentina. Modalidad: Presentación flash & Póster. ISBN 978-987-33-6030-5. Pág. 80 y 143.
- Aplicaciones de HPLC. 21-22 Agosto 2014. Jenck S.A. Modalidad: Taller.
- Introducción a la Bioseguridad en Laboratorios. 7 Mayo 2014. Galeno ART. Modalidad: Taller.
- Taller sobre microorganismos destinados al biocontrol de plagas y enfermedades (TAMIBIO). 27 Septiembre 2013. Sociedad de Medicina Veterinaria. Modalidad: Taller

6. Avance académico durante el período de beca.

Durante el período de beca he completado mis estudios universitarios y rendido el Seminario de Investigación con mención de Tesis de Licenciatura y máxima calificación (10).

Florencia Farina
Firma y Aclaración del becario*



Claudio Valverde
Firma y Aclaración del Director

Betina Agaras
Firma y Aclaración del Co-director*

*Las firmas correspondientes se encuentran en la versión impresa enviada al Departamento de seguimiento de la actividad científica.