BIER21

**Marcado de *Azospirillum brasilense* Az39**

Díaz Herrera, S.M.1,2; Rossello, F. 1; Benavides, M.P.1,2; Zawoznik, M.Z.1 y Groppa, M.D.1,2

1- Cátedra de Química Biológica Vegetal – Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

2- IQUIFIB-CONICET

*Azospirillum* es una PGPR (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal) que se asocia a las raíces de una gran variedad de especies vegetales sin formar estructuras especializadas. Su efecto, principalmente en las raíces, conlleva un aumento de captación de agua y nutrientes, a través de un conjunto de mecanismos entre los que se encuentran la fijación biológica del nitrógeno, la producción de fitohormonas y de metabolitos nitrogenados de bajo peso molecular. Debido a su amplio estudio en ensayos a campo y el uso en formulaciones comerciales, es considerada un sistema modelo para el estudio de la interacción microorganismo-planta.

Con el objetivo de disponer de una herramienta para el estudio de la dinámica de colonización de raíces de *Arabidopsis thaliana,* se realizó el marcado de *A. brasilense* Az39 con la proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés) mediante una conjugación biparental transformada con un plásmido de expresión constitutiva. La selección de los transconjugantes se realizó a través de medio Nfb semisólido con kanamicina y luego en placas de LB con el mismo antibiótico. La inserción del plásmido se corroboró mediante PCR con dos pares de primers, uno complementario a secuencias del plásmido y otro complementario a secuencias del gen de gfp. Se observó la fluorescencia en transiluminador. Se encontró que los transconjugantes no expresan la fluorescencia en todos los medios de cultivo probados; el tipo de peptona utilizada en el LB, por ejemplo, resultó un factor clave para la expresión de la proteína.

Se comparó la formación de biopelícula de la cepa marcada vs. la cepa salvaje en placas de 96 pocillos por tinción con cristal violeta y la producción de ácido indol acético (AIA) con el método de Salkowski, haciendo crecer las cepas en medio malato mínimo. Tanto la formación de biopelícula como la producción de AIA fueron similares entre ambas cepas. Asimismo, la dinámica de multiplicación *in vitro,* el crecimiento en medio Nfb semisólido y la morfología de las colonias fueron semejantes.

Finalmente, se realizó un ensayo de inoculación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con la bacteria marcada para estudiar la colonización de las raíces. Luego de 6 días de inoculadas, las plantas se observaron con un transiluminador bajo luz UV evidenciándose la fluorescencia que las bacterias le confieren a las raíces de las plantas. La observación en microscopio de fluorescencia permitió observar una intensa colonización de la superficie radical y cierta cantidad de células fluorescentes dispuestas en hilera en el interior de dicho segmento, aparentemente colonizando un haz vascular.

Contar con esta cepa marcada, que ha demostrado ser capaz de colonizar profusamente las raíces de la planta modelo *A. thaliana*, permitirá avanzar en el conocimiento de la interacción establecida entre *A. brasilense* Az39 ----importante PGPR en Argentina---- y diversos cultivos de alto impacto económico para nuestro país.