



## Obtención de cepas transconjugantes para estudios de la interacción bacteria-arroz

### Obtaining transconjugant strains for bacteria-rice interaction studies

① Ionel Hernández Forte<sup>1\*</sup>, ② María Caridad Nápoles García<sup>1</sup>,  
③ Federico Battistoni Urrutia<sup>2</sup>, ④ Elena Fabiano González<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), avenida Italia 3318, Montevideo, Uruguay. CP11600

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo fue obtener cepas transconjugantes para el estudio de la interacción planta-bacteria. La obtención de bacterias transconjugantes portadoras del plásmido pHC60 se realizó mediante apareamiento triparental con dos cepas de *Escherichia coli* y tres cepas aisladas de cultivares cubanos de arroz. Se realizó además un ensayo de inoculación con plantas de arroz cv. INCA LP-5 y bacterias transconjugantes. Se empleó microscopía confocal de fluorescencia para localizar las bacterias en los tejidos vegetales. Se obtuvieron tres cepas transconjugantes que contenían el gen *gfp*, pues produjeron colonias fluorescentes en luz ultravioleta, en medio de cultivo con tetraciclina y 5-nitrofurantoina. La dinámica de multiplicación de las cepas de tipo salvaje y transconjugantes no mostró diferencias a las 30 h de cultivo. Se visualizaron dos cepas transconjugantes de *Rhizobium* colonizando las raíces de plántulas de arroz a las 72 horas de la inoculación, una de ellas como posible endófito.

**Palabras clave:** *Rhizobium*, gramíneas, microscopía.

**ABSTRACT:** The objective of this work was to obtain transconjugant strains for the study of plant-bacteria interaction. The obtaining of transconjugant bacteria with the plasmid pHC60 was carry out by triparental mating with two *Escherichia coli* strains and two strains isolated from Cuban rice cultivars. Furthermore, an inoculation assay with rice plants cv. INCA LP-5 and transconjugant bacteria was carry out and confocal fluorescence microscopy were used to locate the bacteria in plant tissues. Two transconjugant strains containing *gfp* gene were obtained, since they produced fluorescent colonies in ultraviolet light, in culture medium with tetracycline and 5-nitrofurantoin. The multiplication dynamics of wild type and transconjugant strains don't showed differences in the end of bacteria growth in the medium. Two transconjugant strains were showed colonizing rice root, one of them as a putative endophyte.

**Key words:** *Rhizobium*, grass, microscopy.

## INTRODUCCIÓN

Se han desarrollado diferentes herramientas para estudiar en detalle la asociación bacteria-planta, como las ciencias "ómicas", las técnicas serológicas acopladas a la microscopía de barrido láser confocal y el método del

marcaje con genes que codifican para una proteína fluorescente (1-3). Estas herramientas han permitido explorar la interacción rizobio-arroz y comprender las diferencias entre esta asociación y la que establecen los rizobios con plantas leguminosas, sobre todo durante el proceso de infección y la distribución de bacterias dentro del tejido vegetal (4,5).

\*Autor para correspondencia. [ionel.hdez09@gmail.com](mailto:ionel.hdez09@gmail.com)

Recibido: 20/10/2022

Aceptado: 24/05/2024

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses

**Contribución de los autores:** **Conceptualización-** Federico Battistoni Urrutia, Elena Fabiano González, Ionel Hernández Forte.

**Investigación-** Ionel Hernández Forte. **Metodología-** Elena Fabiano González, Federico Battistoni Urrutia, Ionel Hernández Forte.

**Supervisión-** Elena Fabiano González, Federico Battistoni Urrutia, María Caridad Nápoles García. **Escritura del borrador inicial-** Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García.

**Escritura y edición final-** Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García.

**Curación de datos-** Ionel Hernández Forte

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Recientemente, se informó por primera vez en Cuba que *Rhizobium* es un “endófito verdadero” del arroz, lo cual se demostró mediante ensayos de inoculación con una cepa transconjugante que se visualizó mediante microscopía confocal (6). Aunque en este trabajo se observaron células transconjugantes que contenían el gen *gfp* que codifica una proteína verde fluorescente (cepa Rpd16pHC60 con el plásmido pHC60) colonizando los tejidos de la planta de arroz INCA LP-5, no se mostraron evidencias de la obtención de estas bacterias, ni tampoco a partir de otras cepas que han mostrado actividad promotora del crecimiento en plantas de arroz de este cultivar. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener cepas transconjugantes para estudios de la interacción planta-bacteria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las bacterias utilizadas en este trabajo y sus principales características se enumeran en la [Tabla 1](#).

Todas las cepas bacterianas pertenecen a la Colección de bacterias del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba. Tres de estas, *Rhizobium* sp. Rpd16, *Rhizobium* sp. Rpr11 y *Rhizobium* sp. 5P1 se estudiaron en investigaciones previas (6,7). La cepa *Pseudomonas* sp. S5-38 está menos estudiada y es posible endófito de semillas de arroz cv. INCA LP-5.

### Obtención de bacterias transconjugantes que contienen el plásmido pHC60

Mediante conjugación triparental con las cepas *E. coli* DH5  $\alpha$ (pRK2013) y *E. coli* DH5  $\alpha$ (pHC60) se obtuvieron bacterias portadoras del plásmido pHC60, de las cepas Rpr11, 5P1 y S5-38. Para ello se empleó la metodología descrita previamente con la cepa Rpd16 (6). La eficacia del proceso se comprobó mediante el cultivo de las cepas transconjugantes en el medio tripton-extracto de levadura (TY) con tetraciclina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y 5-nitrofurantoina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 h. Los cultivos se expusieron a luz UV para comprobar la fluorescencia.

Se realizaron además dinámicas de multiplicación para comprobar si la presencia del plásmido afectó el crecimiento de las cepas S5-38, Rpd16, Rpr11 y 5P1. Las cepas

se incubaron en un agitador termostático (HEIDOLPH-UNIMAX-2010, Schwabach, Alemania) a 150 rpm y  $30^\circ\text{C}$  durante 24 h. La DO ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) se midió cada 2 h, durante 30 h. Se utilizaron cinco réplicas de cada cepa.

### Interacción bacteria-planta de arroz

Se realizó un ensayo de inoculación para estudiar la interacción bacteria-arroz, según la metodología propuesta previamente (6). Solo se estudiaron los transconjugantes Rpd16pHC60 y Rpr11pHC60. Cien microlitros de inoculantes de estas cepas ( $10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) se utilizaron para inocular semillas de arroz cv. INCA LP-5 pregerminadas. Las plántulas se mantuvieron en solución de Hoagland y se incubaron en condiciones controladas durante 72 horas después de la inoculación (hpi). Las raíces se cortaron, inmovilizaron (agarosa 4%) y seccionaron y, posteriormente, se visualizó la colonización bacteriana de las raíces en un microscopio láser confocal (Zeiss, LSM 800 AiryScan, Jena-Alemania) (6).

### Análisis estadístico

Los valores de absorbancia provenientes de la dinámica de multiplicación se sometieron a la prueba de normalidad (prueba de Bartlett) y homogeneidad de varianza (prueba de Kolmogorov-Smirnov). Se aplicó un análisis de varianza de clasificación simple con las pruebas de comparación de medias Tukey HSD para  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa Statgraphic Plus versión 5.0 para el procesamiento estadístico de los datos y Microsoft Excel 2010 para su representación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previamente, se demostró que la cepa *Rhizobium* sp. Rpd16 es endófito de arroz, ya que se visualizó mediante microscopía confocal en los espacios intercelulares del parénquima de la raíz y la vaina de la hoja. Para ello, se obtuvo una cepa transconjugante que contenía el plásmido pHC60 (Rpd16pHC60) (6). De igual forma, en el presente trabajo se comprobó que el apareamiento triparental con cepas de *E. coli* permitió obtener cepas que contenían este plásmido, lo cual se confirmó cuando las cepas

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Principales características	Referencia
<i>Rhizobium</i> sp. Rpr11 (MT387213)	Cepa aislada de la rizosfera de arroz cv. INCA LP-5, caracterizada teniendo en cuenta atributos de promoción del crecimiento vegetal. Es promotora del crecimiento de arroz cv. INCA LP-5	(6)
<i>Pseudomonas</i> sp. S5-38 (MT808971)	Cepa aislada de semillas de arroz cv. INCA LP-5	Colección de Bacterias del Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias (INCA)
<i>Rhizobium</i> sp. 5P1 (MT759831)	Cepa aislada de rizosfera de arroz cv. INCA LP-7 promotora del crecimiento de arroz en condiciones controladas, invernadero y de campo.	(7)
<i>Rhizobium</i> sp. Rpd16pHC60	Cepa Rpd16 que contiene el plásmido pHC60	(6)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44ΔlacU169(Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i>	(8)
<i>Escherichia coli</i> pRK2013	Replicón ColE1 con genes RK2 tra. Se utiliza para movilizar plásmidos incP e incQ (Kmr)	(9)

\*Entre paréntesis se muestra el número de acceso de las secuencias consenso depositadas en el GenBank

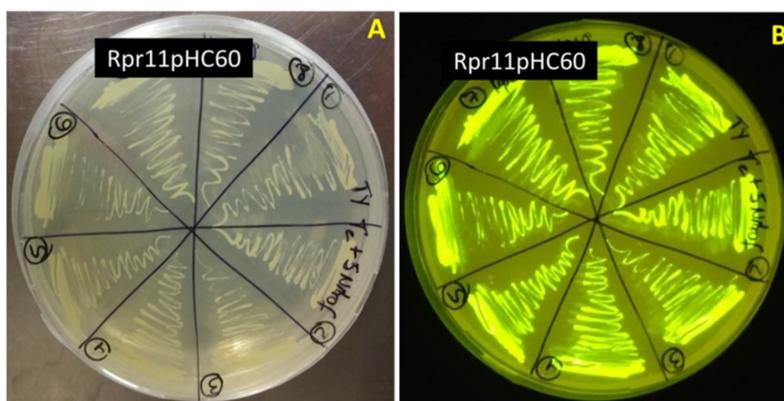
Rpr11pHC60, 5P1pHC60 y S5-38pHC60 crecidas en medio TY con tetraciclina y 5-nitrofurantoína, mostraron colonias fluorescentes en presencia de luz UV (Figura 1).

Las dinámicas de multiplicación mostraron algunas diferencias en el crecimiento de las cepas. Sin embargo, los valores de densidad óptica de las cuatro cepas de tipo salvaje y sus correspondientes transconjugantes fueron similares al final del experimento (Figura 2). El efecto del plásmido pHC60 en el crecimiento de las cepas transconjugantes podría no ser significativo.

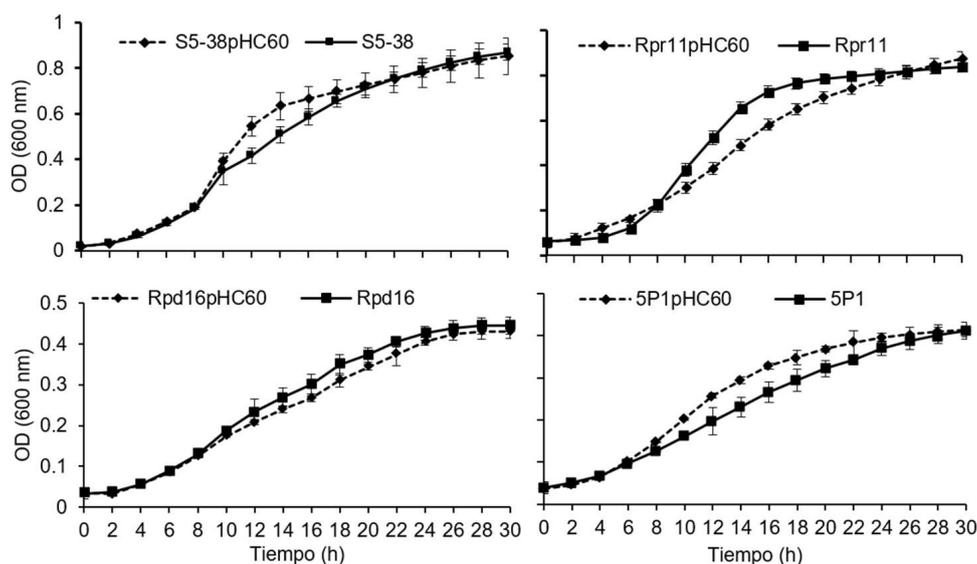
Los resultados mostraron además que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa Rpd16pHC60 y la cepa salvaje en todos los momentos de la evaluación. Este comportamiento también se informó cuando se estudió el marcaje con el gen *gfp* en la cepa diazotrófica y endófito *Paenibacillus polymyxa* (10). Probablemente, sea esta otra razón que explique por qué el plásmido pHC60 no

afectó la capacidad de la cepa Rpd16 para colonizar tejidos vegetales, como se informó en trabajos anteriores (6). Solo se observaron diferencias significativas a las 12-14 h entre las cepas S5-38 y S5-38pHC60, y a las 10-20 h entre Rpr11 y Rpr11pHC60, y entre 5P1 y 5P1pHC60. En esos momentos de la evaluación, las cepas transconjugantes S5-38pHC60 y 5P1pHC60 tenían mayor DO que sus correspondientes cepas salvajes.

Por otro lado, se conoce que en la interacción bacteria-planta se distinguen asociaciones con diferentes grados de complejidad, donde la rizosfera, filosfera y endosfera han sido los principales escenarios para el estudio de las particularidades de esta interacción. El conocimiento de los niveles de asociación entre bacterias y plantas es fundamental para comprender cómo el microorganismo coloniza la planta, lo cual es necesario para diseñar y validar inoculantes efectivos en campo (1,2).



**Figura 1.** Cepa transconjugante Rpr11 (Rpr11pHC60) que contiene el plásmido pHC60 en medio TY con tetraciclina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y 5-nitrofurantoína ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), expuesta a luz blanca (A) y luz UV (B)



Los puntos de datos y las barras representan las medias y los errores estándar de la media de cinco repeticiones en cada tiempo de muestreo (Tukey HSD  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ). DO: densidad óptica

**Figura 2.** Dinámica de multiplicación en medio TY de las cepas S5-38, Rpd16, Rpr11, 5P1 y sus transconjugantes portadores del plásmido pHC60

Con el fin de estudiar la interacción bacteria-planta, plántulas de arroz cv. INCA LP-5 se inocularon con las cepas Rpd16 pHC60 y Rpr11pHC60. La selección se basó a partir de estudios previos donde se sugieren que sus correspondientes cepas salvajes son promisorias para biofertilizar el cultivo de arroz (7).

Aunque ya existía evidencia sobre el comportamiento endofítico en arroz de la cepa Rpd16pHC60, se utilizó esta cepa en el presente estudio para profundizar en las formas de asociación con las plantas de arroz y como modelo de comparación con la cepa Rpr11. Se analizaron secciones transversales de raíces de arroz mediante microscopía confocal a 72 hpi. Los resultados mostraron células individuales de la cepa Rpd16pHC60 en los espacios intercelulares del parénquima cortical de la raíz (Figura 3a), similar a lo que previamente se informó (6). Sin embargo, también se visualizó la bacteria, unida a los pelos radicales. Este comportamiento no fue posible visualizarlo en trabajos anteriores con esta cepa (Figura 3b)

Por otra parte, la cepa Rpr11pHC60 se localizó colonizando los espacios intercelulares del parénquima de la raíz. Esta es una nueva evidencia que sugiere que otra cepa perteneciente al género *Rhizobium* se comporta como endófito de arroz cv. INCA LP-5. Sin embargo, es necesario estudiar más profundamente su interacción con el arroz para concluir que es un "endófito verdadero".

Trabajos anteriores abordan el estudio de las interacciones rizobio-pinaca (*Spinacia oleracea*) y rizobio-caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante el método del marcaje con genes que codifican para una proteína fluorescente (11,12). Estudios previos mostraron que la inoculación de plantas de arroz cv. INCA LP-5 con la cepa Rpr11 incrementó el contenido de potasio y masa seca de la raíz en condiciones de invernadero (7). Por lo tanto, el comportamiento endofítico de esta cepa constituye un atributo que también permitiría explicar su actividad promotora del crecimiento vegetal en la gramínea.

## CONCLUSIONES

El empleo de cepas transconjugantes y la microscopía confocal para estudios de interacción planta-bacteria es una herramienta efectiva y novedosa. Aquí, se obtuvieron tres cepas transconjugantes que contenían el plásmido pHC60 y una de ellas es posible endófito de arroz cv. INCA LP-5. El hecho de que las cepas salvajes que se emplearon provengan de diferentes cultivares de arroz y niveles de asociación con la planta podría brindar un mayor conocimiento sobre la particularidad de su interacción con la planta de arroz.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sarhan MS, Hamza MA, Youssef HH, Patz S, Becker M, ElSawey H, et al. Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media-A review. *Journal of Advanced Research*. 2019;19(19):15-27. doi: [10.1016/j.jare.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002)
2. Hartmann A, Fischer D, Kinzel L, Chowdhury SP, Hofmann A, Baldani JI, et al. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges-A review. *Journal of Advanced Research*. 2019;19:3-13. doi: [10.1016/j.jare.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.007)
3. Geddes, BA, Paramasivan P, Joffrin A, Thompson AL, Christensen K, Jorin B, et al. Engineering transkingdom signalling in plants to control gene expression in rhizosphere bacteria. *Nature communications*. 2019;10(1):1-11. doi: [10.1038/s41467-019-10882-x](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10882-x)
4. Chen X, Miché L, Sachs S, Wang Q, Buschart A, Yang HY, et al. Rice responds to endophytic colonization which is independent of the common symbiotic signaling pathway. *New Phytologist*. 2015;208(2):531-543. doi: [10.1111/nph.13458](https://doi.org/10.1111/nph.13458)
5. Wu Q, Peng X, Yang M, Zhang W, Dazzo FB, Uphoff N, et al. Rhizobia promote the growth of rice shoots by targeting cell signaling, division and



(a, b) Plántulas inoculadas con la cepa Rpd16pHC60. Las células transconjugantes se muestran en color verde, rojo: autofluorescencia del tejido vegetal. (c) Sección transversal de la raíz de plántulas inoculadas con la cepa Rpr11pHC60. Las células transconjugantes se muestran en rojo. Flechas amarillas: presencia de las cepas transconjugantes

**Figura 3.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia que muestran secciones de tejido radical de plántulas de arroz de 72 h de edad, cultivar INCA LP-5.

- expansion. *Plant Molecular Biology* 2018;97(6):507-523. doi: [10.1007/s11103-018-0756-3](https://doi.org/10.1007/s11103-018-0756-3)
6. Hernández I, Taulé C, Pérez-Pérez R, Battistoni F, Fabiano E, Rivero D, et al. Endophytic rhizobia promote the growth of Cuban rice cultivar. *Symbiosis*. 2021a; 85(2):1-16. doi: [10.1007/s13199-021-00803-2](https://doi.org/10.1007/s13199-021-00803-2)
  7. Hernández I, Pérez-Pérez R, Nápoles MC, Maqueira LA, Rojan O. Rhizospheric rhizobia with potential as biofertilizers from Cuban rice cultivars. *Agronomía Colombiana*. 2021b; 39(1),26-37. doi: [10.15446/agron.colomb.v39n1.88907](https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n1.88907)
  8. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 1983;166(4):557-580. doi: [10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
  9. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinsky D. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of National Academy of Sciences* 1980;77(12):7347-7351. doi: [10.1073/pnas.77.12.7347](https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7347)
  10. Padda KP, Puri A, Zeng Q, Chanway CP, Wu X. Effect of GFP-tagging on nitrogen fixation and plant growth promotion of an endophytic diazotrophic strain of *Paenibacillus polymyxa*. *Botany*. 2017; 95(9):933-942. doi: [10.1139/cjb-2017-0056](https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0056)
  11. Jiménez-Gómez A, Flores-Félix JD, García-Fraile P, Mateos PF, Menéndez E, Velázquez E, et al. Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-10. doi: [10.1038/s41598-017-18632-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18632-z)
  12. Ferreira NS, Matos GF, Meneses CH, Reis VM, Rouws JR, Schwab S, et al. Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development. *Plant and Soil*. 2020; 451(1):221-238. doi: [10.1007/s11104-019-04388-0](https://doi.org/10.1007/s11104-019-04388-0)