

El plan de trabajo se enmarca dentro de un proyecto de caracterización de microorganismos nativos capaces de antagonizar el desarrollo de hongos fitopatógenos de importancia local en cultivos extensivos, el cual es parte de un consorcio público-privado que estudia la biología del suelo en sistemas agrícolas bajo siembra directa (BIOSPAS).

En nuestro laboratorio se ha generado una colección de aislamientos del género *Pseudomonas*, obtenidos de suelos agrícolas y de rizósferas de pasturas, soja y maíz. En esta propuesta, se busca complementar la caracterización de estos aislamientos, generando criterios adicionales de selección de candidatos para su posible utilización como agroinsumos; en particular, se propone generar variantes genéticamente modificadas de los aislamientos que permitan el análisis de interacciones bacteria-planta y bacteria-bacteria mediante microscopía de fluorescencia y plaqueo diferencial.

Se dispone de una colección de 22 aislamientos del género *Pseudomonas* capaces de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos aislados de cultivos de la región pampeana. En principio, se utilizará un subconjunto de 5 (cinco) aislamientos elegidos en base a su identidad taxonómica, espectro de inhibición de hongos patógenos, y sus características microbiológicas diferenciales. Para realizar el marcaje genético de las pseudomonas seleccionadas, se seguirá un procedimiento establecido que se ha utilizado en nuestro laboratorio (Jousset et al 2006). Éste 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). De esta forma, los aislamientos marcados pueden ser visualizados por microscopía de fluorescencia en los sistemas radiculares de plantas creciendo en suelo natural en presencia de flora bacteriana indígena, y también pueden ser seleccionados en forma diferencial en medio de cultivo mediante su resistencia a antibióticos, dada por el cassette de inserción. El marcaje ocurre a través de la introducción simultánea (mediante conjugación tetraparental o electrotransformación) de un plásmido vehículo del cassette deseado y de un segundo plásmido que codifica las funciones de transposición específica del transposón Tn7 (Koch et al 2001). Las bacterias modificadas se seleccionan en medio de cultivo suplementado con los antibióticos indicados de acuerdo al vector vehículo utilizado. La confirmación de la marcación se realiza por microscopía de fluorescencia y por PCR con oligonucleótidos específicos (Lambertsen et al 2004). Al disponer de vectores vehículo con diferentes versiones de la proteína fluorescente y/o marcadores de resistencia a antibióticos (Lambertsen et al 2004), se buscará obtener marcaje diferencial en cada uno de los aislamientos para poder realizar estudios microscópicos de muestras que contengan combinaciones de ellos, y puedan ser individualizados mediante el color de su fluorescencia y/o su resistencia a antibióticos.

De esta forma, se espera que la candidata adquiera destreza en una serie de metodologías de microbiología clásica y genética bacteriana, y genere mediante métodos de transferencia de material genético entre bacterias, herramientas útiles para el estudio de la interacción bacteria-bacteria y bacteria-planta, lo que representa una contribución concreta al desarrollo del proyecto en el cual se enmarca esta propuesta de beca.