



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - UNLP
Ingeniería Agronómica

El microbioma endófito del tomate [*Solanum lycopersicum* L.]: una fuente de bacterias para formular productos biológicos.

Trabajo final de carrera

Ana Clara Alanís

Legajo: 26498/2

Correo electrónico: anaclara47@hotmail.com

Director: **Silvina M. Y. López**

Co-Director: **Mario C. N. Saparrat**

30 de noviembre de 2023

Modalidad investigación

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate, es junto con el de pimiento el de mayor importancia considerando la superficie cultivada (7790 ha) y el valor de la producción. Argentina ocupa el 13° puesto como productor de tomate a nivel mundial, produce aproximadamente 664.009 toneladas que se destinan exclusivamente al mercado interno. Los patógenos enferman las plantas cuya producción es afectada en cantidad y calidad, lo que se traduce en pérdidas económicas (Romero et al., 2016). En el manejo convencional, los patógenos se controlan con moléculas de síntesis (agroquímicos) por lo que quedan residuos en las hortalizas y en el ambiente. Es importante mencionar que por el momento esta última es la herramienta más utilizada. La investigación sobre tecnologías ecológicas, como alternativa al manejo con fertilizantes y pesticidas basados en moléculas, ha recibido gran atención en los últimos años y se ha demostrado que los microorganismos (MO) son eficientes biocontroladores y/o promotores del crecimiento, amigables para el ambiente, contribuyendo además a la seguridad alimentaria y la salud humana. Estas nuevas tecnologías consisten en utilizar bio-insumos formulados con organismos aislados de la naturaleza, tanto de cultivos extensivos como intensivos.

En un escenario de agricultura sustentable, es importante utilizar como recurso biotecnológico a las bacterias que interactúan con la planta sean estas rizosféricas o endófitas (microbioma endófito o endobioma del tomate). El microbioma contiene bacterias que promueven el crecimiento vegetal por diversos mecanismos, que son antagonistas de los patógenos de las plantas y otras que activan en las plantas mecanismos que reducen el estrés ocasionado por factores bióticos o abióticos (Bulgarelli et al., 2013; Dicke, 2016; Xu et al., 2014). Uno de los aspectos claves del uso de estos MO como inoculantes es la colonización de los nuevos ambientes en los que se los busca implantar, que está relacionado con la habilidad de las bacterias introducidas con los inoculantes para interactuar con los organismos nativos (Xu et al., 2014; Aira et al., 2010; Santoyo et al., 2016), a lo que solemos llamar competitividad. Es decir que la eficiencia de un producto biológico está ligada a las condiciones ambientales en las que se aplica, al genoma del hospedante y a los organismos con los que éste interactúa. En este sentido, el endobioma está bajo el efecto homeostático que genera la planta, es decir no está expuesto a estreses debido a cambios ambientales, sin embargo, en ese espacio establece interacciones con otros microorganismos que colonizan el mismo ambiente (Santoyo et al., 2016; Surette et al., 2003). El desarrollo de

bioinoculantes en base a bacterias endófitas aisladas del endobioma es un campo que demanda estudios de investigación básica orientados a conocer e identificar las bacterias, las capacidades de cada una de ellas y cuáles de estas capacidades se expresan dentro de la planta cuando forman parte del endobioma e interactúan con la planta y el resto de los microorganismos.

En la actualidad los productores agrícolas en Argentina utilizan inoculantes microbianos, formulados con representantes de cuatro principales grupos taxonómicos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* (Santoyo et al., 2016; Rashid et al., 2012; Beneduzi et al., 2012). Los inoculantes comerciales están formulados en base a unas pocas cepas conocidas, sin embargo, se ha demostrado que las distintas prácticas de labranza, los competidores nativos, los genotipos de los cultivos y las distintas condiciones climáticas y ambientales condicionan la efectividad de los bio-tratamientos (Dennis et al., 2010; Galli-Terasawa et al., 2003; de Salomone & Döbereiner, 1996). Son varios los autores que señalan que se debe profundizar la selección de cepas locales y el desarrollo de formulaciones que se adapten a diferentes cultivos, diferentes zonas climáticas y tipos de suelo (Surette et al., 2003; Rashid et al., 2012; Galli-Terasawa et al., 2003). Por eso es importante no solo seleccionar cepas según su mecanismo probiótico, sino que es deseable la selección de comunidades microbianas o complejos microbianos por ambiente lo que facilita la colonización del ambiente. En relación a esto, cada cultivar seguramente contiene un microbioma propio y distinto del de otros cultivares (Ferreira et al., 2000). El desarrollo de bio-insumos entonces deberá considerar, no solo la aplicación sino también el establecimiento y mantenimiento de las bacterias en la planta, en presencia de la competencia ejercida por las poblaciones microbianas nativas.

Entre las bacterias del microbioma, las bacterias endófitas son aquellas que viven en el interior de la planta durante el ciclo de vida de la misma (Surette et al., 2003), contribuyendo a la sanidad y el crecimiento del hospedante (Romero et al., 2016; Santoyo et al., 2016; Truyens et al., 2015). En estas interacciones mutualistas, la planta huésped proporciona diversos nichos que albergan a los organismos endófitos que liberan metabolitos y señales. Estos probablemente modifican la absorción de nutrientes y el crecimiento de las plantas, la resistencia a patógenos, insectos y metales pesados, estreses osmóticos, contaminantes químicos y otros factores abióticos (Xia et al., 2015; Shi et al., 2013; Yanni et al., 2011). El manejo de enfermedades en base al control

biológico es el resultado de múltiples interacciones directas y/o indirectas con los patógenos (Hyakumachi et al., 2013; Ryan et al., 2008). Se ha postulado que los endosimbiontes probablemente compiten y/o inhiben a los agentes fitopatógenos a través de la producción de metabolitos antifúngicos y/o antibacterianos, la producción de sideróforos, la competencia por nutrientes, incluyendo además la inducción de la resistencia sistémica adquirida y/o inducida del huésped (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006, Prieto et al., 2011).

Vale la pena destacar nuevamente que la razón principal para el estudio y desarrollo de inoculantes bacterianos se basa en la necesidad de reducir el uso de agroquímicos en la agricultura y adoptar nuevas estrategias conducentes a realizar una agricultura sustentable. Esto demanda trabajar en el diseño de nuevos manejos productivos que sean sostenibles y cuiden el ambiente en general. Argentina no se encuentra fuera de esta demanda mundial, y es un momento de oportunidad para agregar valor a los bioinsumos.

HIPÓTESIS

El endobioma de las plantas contiene bacterias con actividad antagonista, que biocontrolan por distintos mecanismos a los hongos fitopatógenos.

OBJETIVOS

Dilucidar el rol que tienen las bacterias endófitas, identificadas previamente, como antagonistas de patógenos fúngicos y relacionarlo con la activación de los mecanismos de defensa de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Colección de bacterias endófitas cultivables de tejidos de tomate. Origen de la colección.

A partir de raíz, tallo, fruto y hoja de tomate (cv. Elpida) de plantas con y sin síntomas de enfermedad (Mancha gris de la hoja), y luego de la esterilización superficial, se procedió a aislar bacterias endófitas que componen la colección de 37 endófitos cultivables de tomate (24 de plantas sanas y 13 de plantas enfermas). Como parte de esta colección también se incluyen 21 endófitos de semillas que fueron aislados de dos cultivares comerciales de tomate (Elpida, Silverio). Todos los aislados de la colección han sido caracterizados fenotípicamente y se identificaron taxonómicamente. Se han evaluado la producción de ácido indolacético, sideróforos y la solubilización de fósforo (Kumar et al., 2012). La identificación primaria de las bacterias se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen *16S rDNA* (datos cargados en NCBI).

Luego de la evaluación de mecanismos antagónicos empleados por las bacterias contra *S. lycopersici* se seleccionaron **3 aislados** que inhibieron el crecimiento a partir de la producción de compuestos volátiles (VOCs). Estos aislados son: **E7** (semilla Elpida) *Bacillus* sp., **He** (Raíz de planta enferma) *Pseudomonas* sp., y **Fe** (Hoja de planta enferma) *Pantoea* sp. y fueron estudiados en este trabajo según las metodologías que se describen a continuación. Además de estos 3 aislados se incluyeron para realizar la última actividad descrita en el plan, dos mutantes de las cepas He y Fe denominadas He'3 y Fe'18, respectivamente; que expresan la proteína fluorescente verde (gfp – Green fluorescent protein), Figura 1.

El patógeno seleccionado para todas las evaluaciones de actividad antagónica bacteriana fue *Stemphylium lycopersici* (CIDEFI215) causante de la Mancha gris de la hoja de tomate, perteneciente al cepario del CIDEFI, los cuales son modelos de estudio del grupo de trabajo.

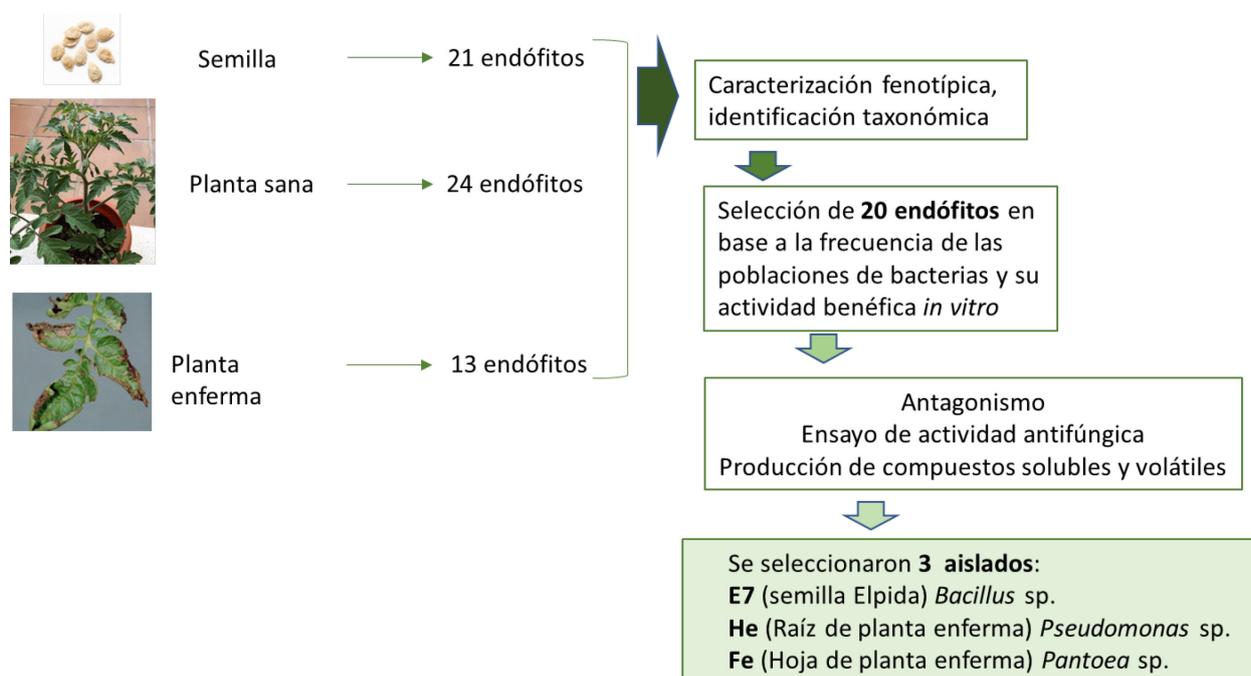


Figura 1: Esquema de los protocolos seguidos para la obtención de los endófitos de tomate para los estudios de biocontrol de enfermedades fúngicas.

2. Evaluación de la actividad antagónica *in vivo*.

Las 3 cepas seleccionadas por su capacidad antagónica contra *S. lycopersici*, fueron evaluadas mediante la aplicación en plantas de tomate expuestas al patógeno. Se incluyeron en este ensayo las cepas mutantes que expresan gfp.

2.1. Ensayo de antagonismo en plantas de tomate

Las plántulas de tomate se trasplantaron en macetas de 2 litros utilizando como soporte tierra esterilizada previamente y fueron tratadas por aspersión en hoja con cada cultivo bacteriano en concentración 1.10^7 UFC/ml (Figura 2). Luego de 48 hs, se inocularon las plántulas mediante aspersión con una suspensión de 1000 conidios por ml en Tween 20 al 0,01%, y permanecieron envueltas con bolsas plásticas transparentes, durante 48 hs (Franco et al., 2017). El experimento consistió en 14 tratamientos, con 6 repeticiones cada uno. Los 5 tratamientos correspondientes a plantas inoculadas con bacterias, fueron asperjadas con E7, He, He'3, Fe y Fe'18; otros 5 tratamientos fueron plantas inoculadas con las mismas bacterias y con el patógeno. Se incluyeron 4 tratamientos controles de plantas sin inóculo bacteriano, dos grupos de plantas fueron asperjados con solución estéril de Tween 20 al 0,01 % (Testigo) y otros

dos grupos con una solución de ácido salicílico (300 ppm), y por último, uno de los grupos de plantas Testigo y de plantas con ácido salicílico, fueron luego tratados con el hongo patógeno. Las plántulas se mantuvieron a temperatura ambiente, de alrededor de 25 °C, durante 14 días. (Figura 3)



Figura 2: Plantines de tomate variedad Elpida.

Los síntomas se examinaron a partir de los 7 días post-inoculación (dpi) y la lesión promedio se determinó a partir de infecciones puntuales utilizando el software de análisis de imágenes para la cuantificación de la enfermedad de las plantas Assess 2.0. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA y las diferencias entre los tratamientos se contrastaron con la prueba de LSD ($P < 0,05$) mediante el software InfoStat versión 2015.

Los parámetros evaluados fueron Incidencia y Severidad de la enfermedad sobre los plantines de tomate. **Incidencia** es un estimador del porcentaje de plantas u órganos afectados, mientras que **Severidad** es un estimador del porcentaje afectado en los órganos (flores, hojas, frutos, bulbos).

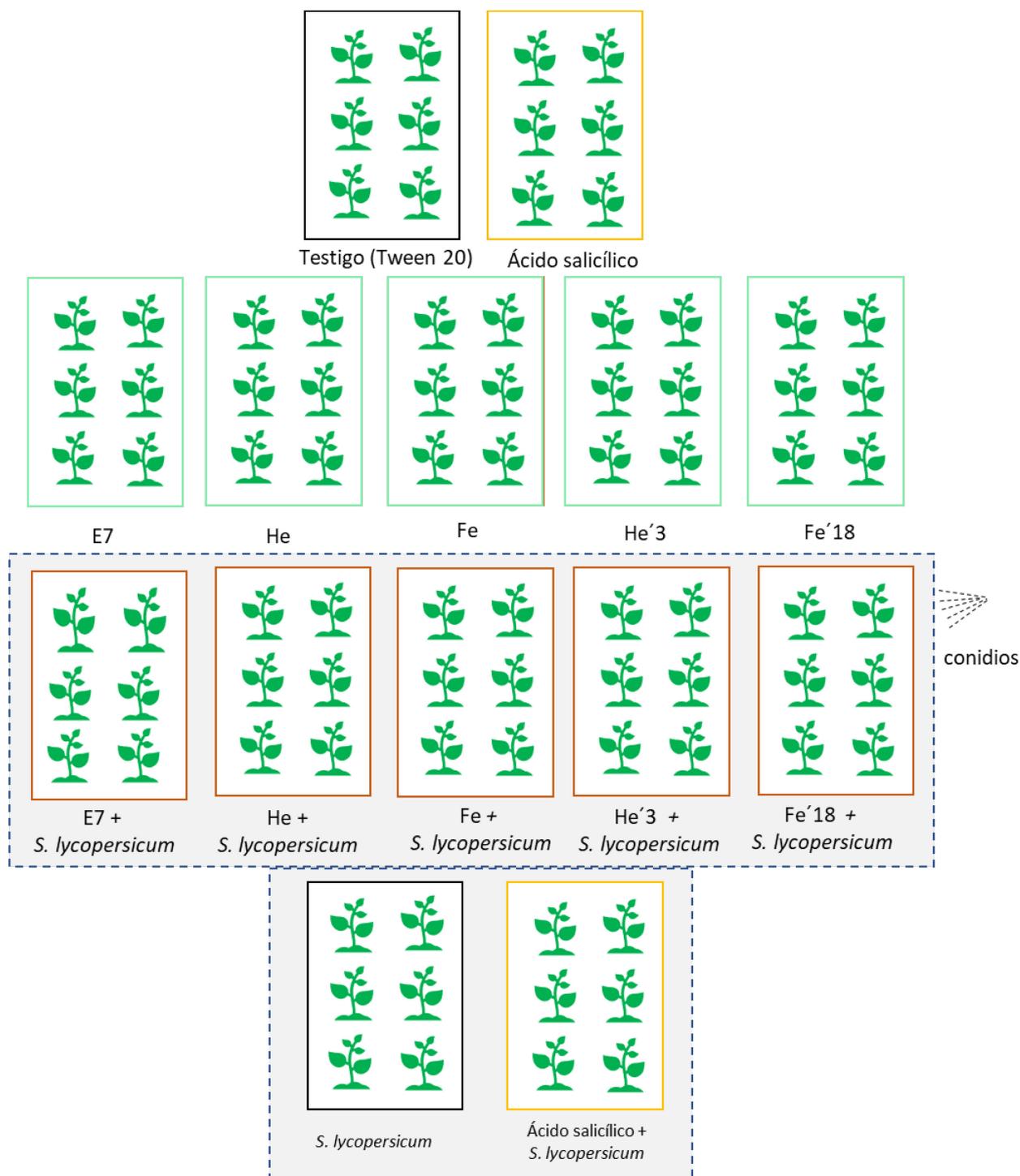


Figura 3: Esquema del ensayo con los 14 tratamientos para la evaluación antagonista *In vivo*.

3. . Identificación de VOCs sintetizados por bacterias endófitas con función antifúngica

Los perfiles VOCs de bacterias endófitas se analizaron usando un cromatógrafo de gases Shimadzu GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Japón) - espectrómetro de masas equipado con una columna capilar de sílice fundida Restek Rxi-5 ms (30.0m × 0.25 mm id × 0.25 µm, Bellefonte, PA, EE. UU.), a partir de una muestra para microextracción en fase sólida (SPME).

Las bacterias se cultivaron en medio TYB (BritaniaLab S.A) y se incubaron en un agitador rotatorio a 150 rev. mín⁻¹ a 28 °C en oscuridad durante 5 días hasta una concentración de 1 × 10⁴ UFC/mL. Una alícuota de 10 µL de cada cultivo se colocó en un vial de vidrio con 3,5 ml de medio TYB sólido, que se selló con una tapa con tabique de silicona. Los viales se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 5 días.

Se utilizó una fibra de SPME recubierta con polidimetilsiloxano/divinilbenceno de 65 µm para extraer los VOCs bacterianos del vial. Esta metodología es llamada microextracción en fase sólida (SPME), consiste en una técnica de preparación de muestras que no requiere disolvente. Actúa por el principio de adsorción/absorción y desorción. La fibra recubierta con una fase extractiva permite concentrar las sustancias de la muestra.

Luego de la inyección, los compuestos se desorbieron durante 2 minutos en un inyector split/splitless a 250 °C (Figura 4). La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante 2 min, luego se elevó a 200 °C a razón de 10 °C min⁻¹ y a 260 °C a razón de 25 °C min⁻¹ y luego se mantuvo a esta temperatura durante 5 min. El helio fue utilizado como gas portador a flujo constante de 1 ml min⁻¹. Los compuestos se identificaron combinando sus espectros de masas y sus índices de retención lineal (Figura 6), utilizando el software GCMS v. 2.72 (Shimadzu Corporation, Japón) con las bibliotecas de espectro de masas NIST 11 y Wiley 10 y utilizando el software MassFinder4 con una biblioteca especializada de terpenoides (Hochmuth Scientific Software, Hamburgo, Alemania). El fondo de los viales con medio TYB sin la bacteria se extrajo para analizar los volátiles del medio. Se analizaron tres réplicas biológicas para cada cepa.

4. Estudio de los mecanismos de ingreso y colonización de las plantas por parte de los endófitos.

4.1. Motilidad

Los ensayos se realizaron utilizando placas de 0,5 % agar TYB como describen Murray & Kazmierczak (2008). La inoculación se realizó con 20 µl de cultivo de una noche en el centro de la placa de Petri. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24-48 horas.

4.2. *Vías de ingreso y colonización*

Se utilizaron dos cepas mutantes, que expresan la proteína fluorescente verde, que se describieron previamente, He'3 y Fe'18. Se evaluó el ingreso de los endófitos a la planta inoculando la bacteria tanto en semillas como en plántulas en las mismas condiciones que se describieron en el ensayo en plantas. Luego se siguió el ingreso y colonización de los órganos (hoja, tallo, raíz, fruto) a diferentes tiempos, mediante observación en microscopio de campo oscuro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad antagonista *in vivo*.

- Ensayo de antagonismo en plantas de tomate. Evaluación de síntomas de la enfermedad

Mediante la utilización del programa de análisis de imágenes Assess 2.0, se cuantificó la severidad de los síntomas de enfermedad en cada tratamiento. Se midió el área foliar y el porcentaje afectado por el patógeno.

En la figura 6 se puede observar las lesiones típicas del patógeno *S. lycopersici* 215 y en la figura 7 se observan las lesiones evaluadas en el ensayo.



Figura 6: Hoja de tomate infectada con *Stemphylium lycopersici*. Se observan las manchas características, al principio de color pardo y a medida que crece y envejece el centro se vuelve gris parduzco y brillante.



Figura 7: Hoja de tomate infectada con *Stemphylium lycopersici*. Las imágenes corresponden a 5 de los tratamientos aplicados en el ensayo, plantas inoculadas solo con el hongo (215) y plantas tratadas previamente con salicílico, E7, He y Fe, respectivamente previo a la inoculación fúngica.

Las plantas inoculadas con el hongo presentaron una mayor área foliar dañada (severidad) que el control, en tanto que la aplicación de ácido salicílico, o las bacterias

Pseudomonas, *Pantoea* y *Bacillus*, lograron disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad. Por otro lado, en las plantas controles que no fueron inoculadas con el hongo patógeno no presentaron lesiones.

Los resultados de la Severidad de la enfermedad, se representa en la figura 8. Se puede observar que la inoculación de las bacterias He, Fe, E7 y los mutantes (He´3-Fe´18) tuvieron un efecto positivo disminuyendo la severidad de la enfermedad en las plantas de tomate. La aplicación del ácido salicílico también tuvo efecto beneficioso, aunque no alcanzó a tener diferencias significativas con las plantas control, inoculadas solo con *S. lycopersici* cepa 215.

Considerando la Incidencia, en el gráfico (Figura 9) se representa el porcentaje de plantas afectadas por el patógeno. Casi un 70% de las plantas inoculadas con el hongo presentaron síntomas, la bacteria con menor incidencia fue He´3 con 60%. Los tratamientos Fe, Fe´18, He y ácido salicílico, mostraron una incidencia del 50% y el tratamiento E7 fue el que presentó menor número de plantas dañadas (40%).

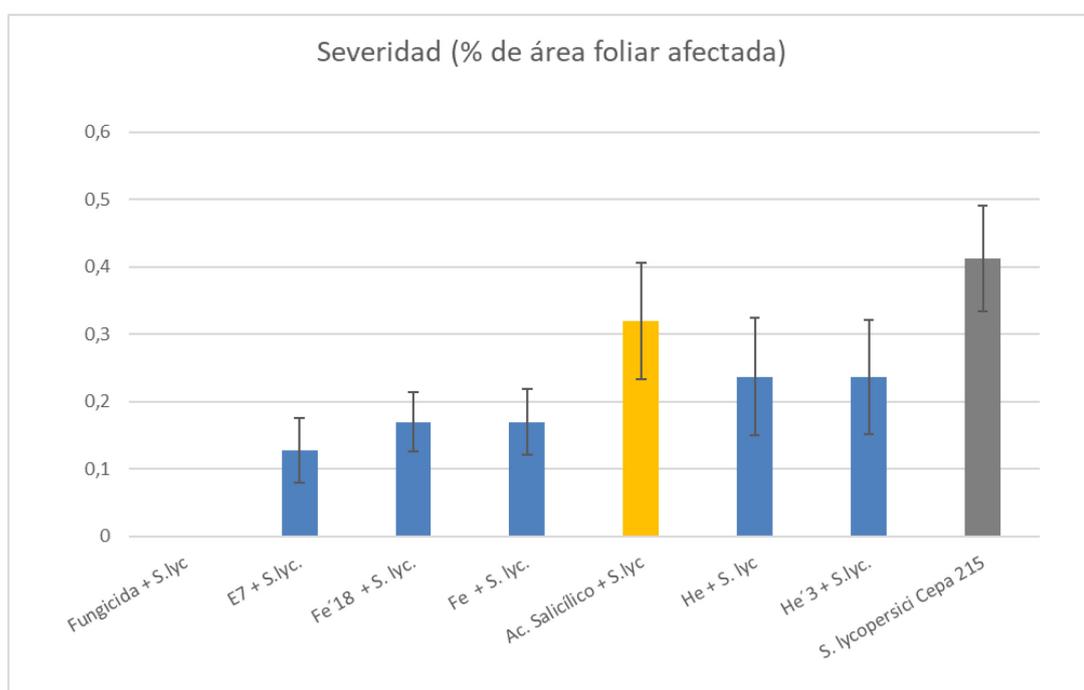


Figura 8: Representación del promedio de las 5 determinaciones del porcentaje de área foliar (severidad) en plantas de tomate afectada por el patógeno *S. lycopersici*, con aplicación de ácido salicílico, e inoculación de las bacterias *Pseudomonas* (He), *Pantoea* (Fe), y *Bacillus* (E7) y los mutantes Fe´18 y He´3.

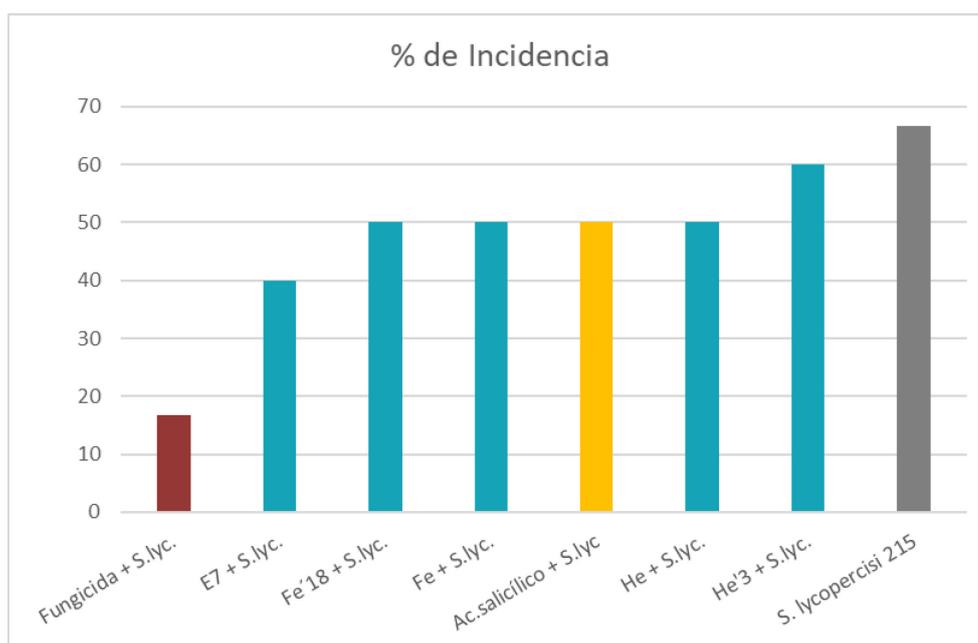


Figura 9: Incidencia, porcentaje de plantas enfermas con el patógeno

Análisis de VOCs con función antifúngica.

En la tabla 1 se detallan los perfiles de compuestos volátiles de cada uno de los aislados con sus correspondientes abundancias relativas. *Pantoea* Fe produjo mayoritariamente alcoholes. El 3-metil butanol fue el de mayor abundancia relativa. El aislado He de *Pseudomonas*, sintetizó además de algunos alcoholes y cetonas, grandes cantidades de x-undeceno. El *Bacillus* E7, produjo alcoholes (2,3-butanodiol y 3-metilbutanol), una cetona (acetoína) y ácidos (2-metilo y el 3-metilbutanoico) (Figura 10).

Tabla 1: Perfil de compuestos volátiles para cada una de las bacterias donde se detalla la abundancia relativa del compuesto en el volatiloma.

<i>Aislado</i>	Alcoholes	Cetonas	Esteres, carbohidratos saturados e insaturados, ácidos
<i>Bacillus sp.</i> E7	2,3-Butanediol (KI=790, 39.10 %) 3-Methyl Butanol (KI=741.50, 7.16 %)	3-Hydroxi-2-Butanone (Acetoino) (KI=721, 16.84 %) 3(2H)-Thiophenone, Dihydro-2-Methyl (KI=989, 11.96 %)	Ac. 2-Methyl Butanoic (KI=879, 8.70 %) Ac. 3-Methyl Butanoic (KI=865, 8.36 %) Ac. Isobutanoic (KI=775, 4.33 %)
<i>Pantoea sp.</i> Fe	3-Methyl Butanol (KI=741.50, 70.46 %) 2,3-Butanediol (KI=793, 7.84 %) Phenyl Ethyl Alcohol (KI=1117, 4.63 %) 2-Methyl Butanol (KI=745, 2.60 %) 2-Nonanol (KI=1101, 2.09 %)	3-Hydroxi-2-Butanone (Acetoino) (KI=720, 1.15 %) 2-Nonanone (KI=1092, 1.11 %)	Ac. Octanoic (KI=1172, 1.09 %) Ac. Decanoic (KI=1366, 0.85 %)
<i>Pseudomonas sp.</i> He	3-Methyl Butanol (KI=741.50, 5.63 %)	2-Undecanone (KI=1295, 7.50 %) x-Tridecen-2-One (KI=1474, 2.90 %)	x-Undecen (KI=1093, 66.10 %) Ac. 3-Methyl Butanoic (KI=868, 5.08 %)

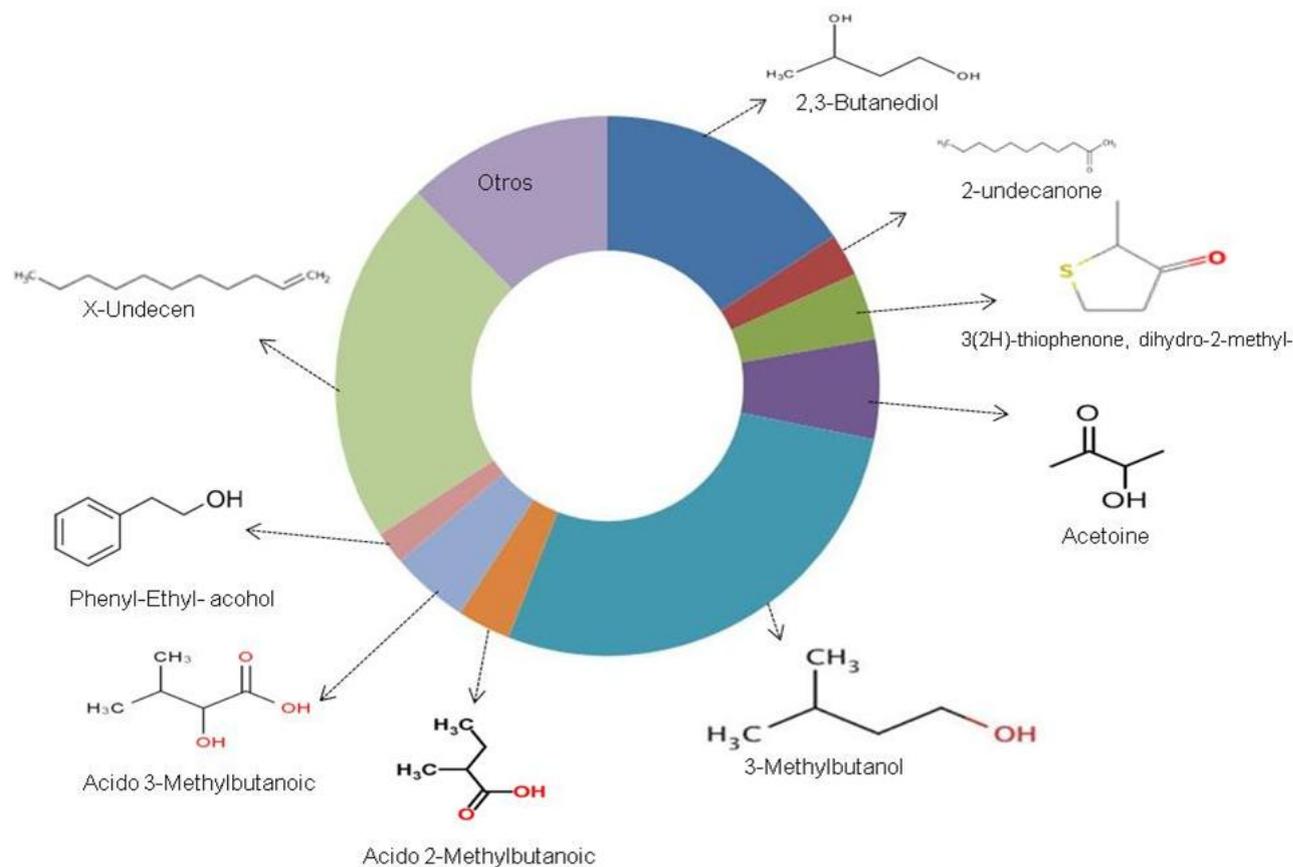


Figura 10: Abundancia relativa y estructura química de los compuestos volátiles sintetizados por las bacterias endófitas que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Motilidad

En el cuadro se describe la movilidad de cada cepa. Con cuatro cruces (++++) se indica que la bacteria se ha desplazado y ocupó toda la placa de Petri, con una cruz (+) las bacterias han colonizado sólo el lugar de siembra.

Los endófitos Fe, su mutante Fe'18 y E7, mostraron la mayor movilidad y se desplazaron a través del agar blando ocupando la totalidad de la placa de Petri, en tanto la cepa He y su mutante He'3, cubrieron un 75% de la superficie de la placa.

Aislado	Movilidad
Fe	++++
Fe'18	++++
He	+++
He'3	+++
E7	++++

Vías de ingreso y colonización

Ambas bacterias se distribuyeron en la superficie de las semillas y los tejidos de las plántulas de tomate, sin embargo, conocer las formas de ingreso de las bacterias en los tejidos vegetales requiere estudios adicionales.

Los endófitos de tomate cumplen un rol clave en la defensa de la planta y tienen habilidad para distribuirse sobre la superficie epidérmica de la misma, demostrando además una importante capacidad colonizadora que podría relacionarse con su posterior efecto sobre los patógenos (Figura 11 y 12).

Las tres bacterias estudiadas colonizaron con éxito las raíces del tomate, se adhirieron a las semillas, las radículas, los tallos y los cotiledones y también entraron en los tejidos.

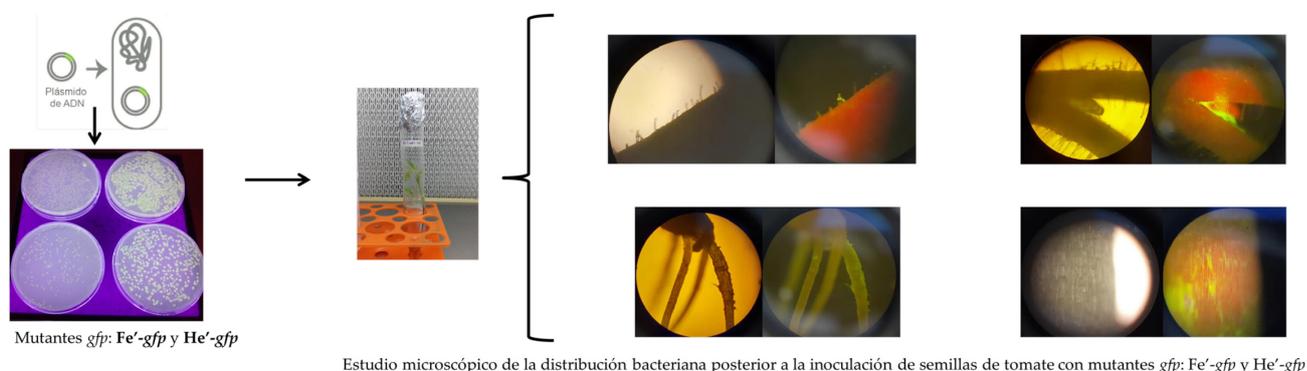


Figura 11: Estudio microscópico de la distribución bacteriana posterior a la inoculación de semillas de tomate con mutantes *gfp*: Fe'-*gfp* y He'-*gfp*

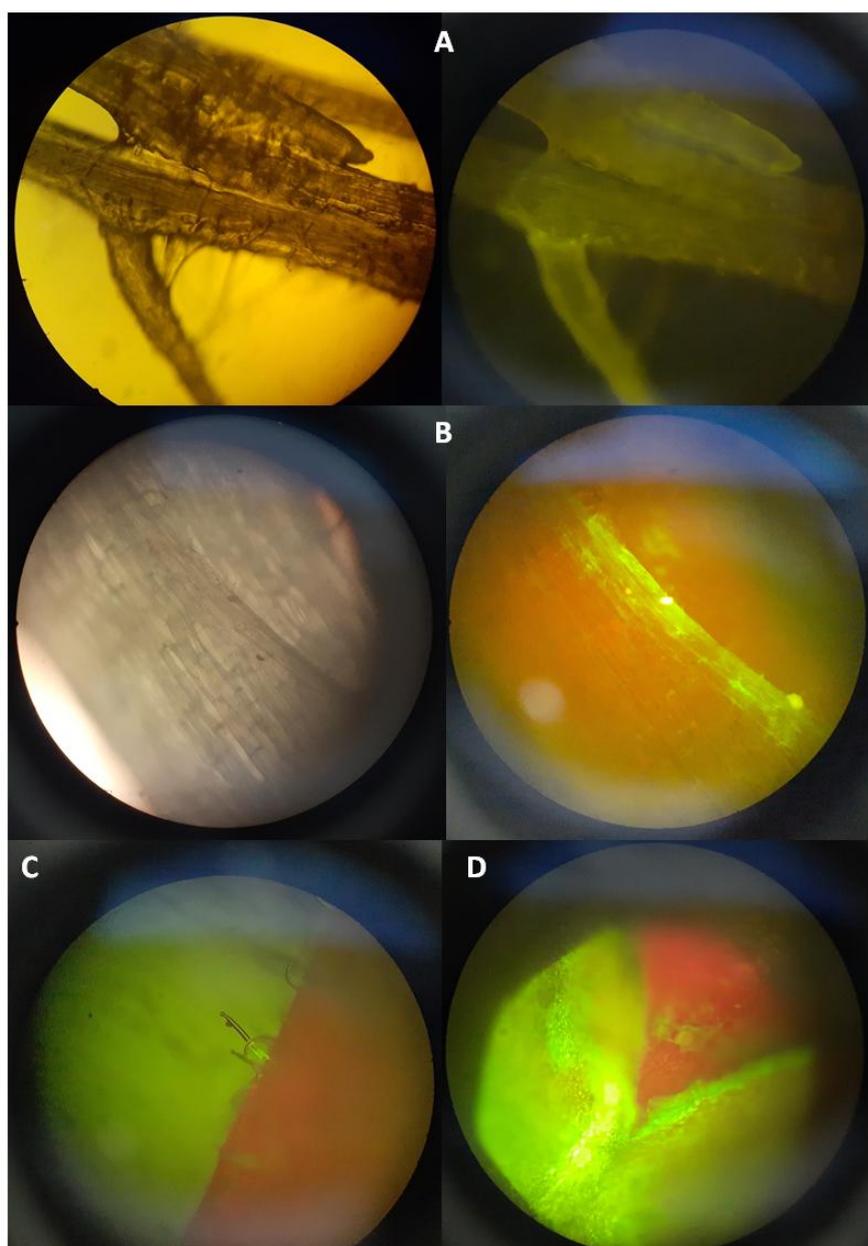


Figura 12: Estudio microscópico de la distribución bacteriana posterior a la inoculación de semillas de tomate con mutantes *gfp*: *Fe'-gfp* y *He'-gfp*. En la figura A se observan raíces con y sin lámpara, igual que en B donde se muestra la superficie del tallo. En C se ve el contraste del tejido sin fluorescencia de color rojo y las microvellosidades colonizadas por bacterias GFP. En la imagen D se muestra la apertura de los cotiledones.

CONCLUSIONES

- Bacterias endófitas del microbioma del tomate protegen a las plantas a través de la síntesis de compuestos antimicrobianos.
- Aislados bacterianos específicos, *Bacillus* sp. E7, *Pseudomonas* sp. He y *Pantoea* sp. Fe y los mutantes He'3 y Fe'18, disminuyen la severidad que *S. lycopersici* cepa 215 genera en hojas de plantines de tomate variedad Elpida.
- Todos los aislados estudiados sintetizan compuestos orgánicos volátiles (VOC) que tienen actividad antifúngica.
- Mientras que *Pantoea* sp. aislado Fe sintetiza varios alcoholes, *Pseudomonas* aislado He y *Bacillus* aislado E7 también liberan cetonas volátiles, que pueden contribuir a su rol como antagonistas del fitopatógeno estudiado.
- Las tres bacterias estudiadas colonizan las raíces del tomate, siendo capaces de adherirse a las semillas, ingresar a las radículas y a los cotiledones, e identificarse en tallos y sus tejidos.
- La comprensión de los primeros eventos de entrada de bacterias en las plantas de tomate requiere experimentos adicionales.
- La inoculación de las plantas de tomate con los endófitos bacterianos podría aumentar la resistencia de las plantas frente a la enfermedad fúngica producida por hongos, en particular por *Stemphylium lycopersici*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Bååth, E. & Domínguez, J.** 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42(12): 2276-2281.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L.M.** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology* 35(4): 1044-1051.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L. & Schulze-Lefert, P.** 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology* 64: 807-838.
- de Salomone, I.G. & Döbereiner, J.** 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and fertility of soils* 21(3): 193-196.
- Dennis, P.G., Miller, A.J. & Hirsch, P.R.** 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?. *FEMS microbiology ecology* 72(3): 313-327.
- Dicke, M.** 2016. Plant phenotypic plasticity in the phytobiome: a volatile issue. *Current Opinion in Plant Biology* 32: 17-23.
- Ferreira, M.C., Andrade, D.D.S., Chueire, L.M.D.O., Takemura, S.M. & Hungria, M.** 2000. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology and Biochemistry* 32(5): 627-637.
- Franco, M.E.E., Troncozo, M.I., López, S.M.Y., Lucentini, G., Medina, R., Saparrat, M.C.N., Ronco, L.B. & Balatti, P.A.** 2017. A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. *European journal of plant pathology* 149(4): 983-1000.
- Galli-Terasawa, L.V., Glienke-Blanco, C. & Hungria, M.** 2003. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(9): 933-939.
- Hyakumachi, M., Nishimura, M., Arakawa, T., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S. & Takahashi, H.** 2012. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. *Microbes and environments* ME12162.
- Kumar, P., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K.** 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological research* 167(8): 493-499.

- Murray, T.S. & Kazmierczak, B.I.** 2006. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188(19): 6995-7004.
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M.M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J.B. & Mercado-Blanco, J.** 2011. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial ecology* 62(2): 435-445.
- Rashid, S., Charles, T.C. & Glick, B.R.** 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology* 61: 217-224.
- Romero, F.M., Marina, M. & Pieckenstain, F.L.** 2016. Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in microbiology* 167(3): 222-233.
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions* 19(8): 827-837.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters* 278(1): 1-9.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. & Glick, B.R.** 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research* 183: 92-99.
- Shi, Y., Zhang, X. & Lou, K.** 2013. Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. *Journal of insect science* 13(1): 151.
- Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R. & Nowak, J.** 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil* 253(2): 381-390.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A. & Vangronsveld, J.** 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports* 7(1): 40-50.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D. & Williams, M.A.** 2015. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in plant science* 6: 490.
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S. & Shen, L.** 2014. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(3): 835-845.
- Yanni, Y.G., Dazzo, F.B. & Zidan, M.I.** 2011. Beneficial endophytic rhizobia as biofertilizer inoculants for rice and the spatial ecology of this bacteria-plant association. In *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems* 265-294. Springer, Berlin, Heidelberg.