



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento Ciencias Biológicas

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la

Facultad de Ciencias Exactas

Investigación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal  
en cultivos de interés agronómico mediante análisis metagenómico y  
microbiológico

Tesista: Ing. Agr. MSc. Efren Venancio Ramos C.

Director: Profesor. Dr. O. Mario Aguilar

Co-Directora: Profesora. Dra. Mónica M. Collavino

La Plata

2018

El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM–UNLP-CONICET-CCT La Plata), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Profesor Dr. O. Mario Aguilar y la co-dirección de la Profesora Dra. Mónica M. Collavino.

**Dedicatoria.**

A mis padres (Elsa y Hernando), mis hermanos (Diego y Yoana), a mi compañera de vida Zuly y a mi hijo Martín mi amor infinito. Porque mi familia es el motor que mueve mi vida, por su apoyo incondicional que se mantiene a través del tiempo y la distancias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las instituciones auspiciaron el desarrollo de este trabajo de la tesis. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada y los fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación. Al instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBMCONICET-UNLP) por la infraestructura, servicios, equipamientos necesarios y lugar de trabajo, a la Universidad nacional de la plata (UNLP).

Agradezco de manera especial al Profesor Dr. O. Mario Aguilar, por haberme dado la oportunidad de realizar éste trabajo bajo su tutoría, por compartir conmigo sus conocimientos, por sus críticas constructivas y el asesoramiento científico recibido durante todos estos años, por su confianza y su amistad. Muchas gracias señor

A la Profesora Dra. Mónica M. Collavino por su co-dirección por su ayuda y disposición en todo lo relacionado con la tesis.

A mis grandes amigos que formaron parte importante en el desarrollo de mi tesis: Prisila, Marcos, Soledad, Karen, Joaquin, Carla, Claudio, tesinistas y por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A Nico, Carolina, Ricardo, Julie, Paola, Fernando, Carlos, Cristian, Edeimis, Juan, Cristian, Yaceli, Elizabeth Alcivar y Guillermo gracias por el cariño el apoyo, la amistad incondicional, por haberse convertido en parte de mi familia en Argentina.

A Claudio, Paula y Silvana (CPA) por la predisposición y ayuda en la preparación del material para realizar los ensayos.

Gracias a familiares, amigos y demás conocidos que no menciono pero que formaron parte de este proceso de manera directa o indirecta con su apoyo intelectual o afectivo.



# ÍNDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO I .....   | 1  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| 1. Importancia de los cultivos extensivos e intensivos en Argentina.....                             | 2  |
| 1.1 Cultivo de cereales en Argentina .....   | 2  |
| 1.1.1 Cultivo de oleaginosas.....  | 3  |
| 1.2 Cultivos intensivos.....   | 4  |
| 1.2.1 Cultivo de hortalizas.....   | 4  |
| 1.3 Interacciones entre plantas y microorganismos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal..... | 5  |
| 1.3.1 Mecanismos de promoción directa.....   | 6  |
| 1.3.1.1 Fijadores de nitrógeno .....   | 6  |
| 1.3.1.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo .....   | 6  |
| 1.3.1.3 Microorganismos productores de fitohormonas .....  | 7  |
| 1.3.2 Mecanismos indirectos .....  | 8  |
| 1.3.2.1 Control biológico.....   | 8  |
| 1.4 Procesos de colonización en plantas.....   | 9  |
| 1.4.1 Colonización endofítica .....  | 11 |
| 1.5 Ecología microbiana: el estudio de la biodiversidad.....   | 14 |
| 1.5.1 Herramientas para el estudio de microorganismos.....   | 15 |
| 1.5.1.1 Métodos dependientes de cultivos.....  | 15 |
| 1.5.1.2 Metodologías de estudio de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....             | 16 |
| 1.5.1.3 Uso de marcadores cromogénicos.....  | 17 |
| 1.5.1.4 Uso de marcadores fluorescentes.....   | 18 |
| 1.5.2 Métodos de estudio independientes del cultivo .....  | 18 |
| 1.5.3 Métodos moleculares de huellas genéticas .....   | 20 |
| 1.5.3.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) .....                | 21 |
| 1.5.3.2 Clonación y secuenciación de ADN de muestras ambientales.....                                | 21 |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.5.3.3. Tecnología de pirosecuenciación aplicada al estudio de la diversidad microbiana... | 23        |
| 1.5.3.4. Ecología de comunidades: el estudio de la biodiversidad .....                      | 24        |
| 1.6 Respuesta a la inoculación con PGPR en ensayos a campo .....                            | 25        |
| <b>Objetivos .....</b>  | <b>28</b> |
| Objetivos específicos.....  | 28        |
| <b>CAPÍTULO II .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>Material Y Métodos.....</b>  | <b>30</b> |
| 2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y mutantes utilizados.....                                 | 31        |
| 2.1.1 Variedades de plantas usadas para los ensayos. ....                                   | 32        |
| 2.2 Ensayos en campo .....  | 32        |
| 2.2.1 Características del sitio experimental y época de siembra.....                        | 32        |
| 2.2.2 Diseño experimental .....   | 33        |
| 2.2.3 Preparación del suelo para la siembra, densidad de siembra y fertilización.....       | 34        |
| 2.2.4 Fertilización .....   | 34        |
| 2.2.5 Concentración del inoculo y momento de aplicación.....                                | 34        |
| 2.2.6 Variables evaluadas.....  | 35        |
| 2.3 Ensayos de pirosecuenciación del gen nifH .....   | 36        |
| 2.3.1 Descripción de ensayo con plantas de tomate y tiempos de muestreo .....               | 36        |
| 2.3.2 Descripción de ensayo en plantas de trigo .....                                       | 38        |
| 2.4 Métodos Moleculares .....   | 39        |
| 2.4.1. Desinfección superficial de tejidos de tomate y trigo.....                           | 39        |
| 2.4.2 Evaluación de la eficiencia de la desinfección de los tejidos .....                   | 39        |
| 2.4.3 Extracción de ADN de tejidos de tomate y trigo.....                                   | 40        |
| 2.4.4 Extracción de ADN de las cepas bacterianas.....                                       | 41        |
| 2.5 Técnica molecular .....   | 42        |
| 2.5.1 Amplificación del gen nifH .....  | 42        |
| 2.5.2 Purificación del pool nifH. ....  | 43        |

|   |    |
|---|----|
| 2.5.3 Digestión del ADN-nifH con endonucleasas.....   | 43 |
| 2.5.4 visualización de los productos de restricción nifH.....   | 43 |
| 2.7 Preparación de biblioteca nifH de endófitos de tomate, trigo y pirosecuenciación .....            | 44 |
| 2.7.1 Síntesis de Amplicones nifH para pirosecuenciación.....   | 44 |
| 2.9 Análisis Bioinformáticos.....   | 45 |
| 2.9.1 Análisis de perfiles RFLP-nifH.....   | 45 |
| 2.9.2 Procesamiento y asignación taxonómica de las secuencias nifH.....                               | 45 |
| 2.9.3 Estimación de la diversidad.....  | 47 |
| 2.9.3.1Análisis Multivariados.....  | 47 |
| 2.9.3.2 Métodos de Ordenación.....  | 48 |
| 2.9.3.3 Métodos de clasificación.....   | 49 |
| 2.10 Tecnicas Microbiologicas.....  | 49 |
| 2.10.1 Marcado de cepas con los genes reporteros GFP y GUS.....                                       | 49 |
| 2.10.2 Evaluación de la estabilidad del plásmido pFAJ1708 en las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24..... | 51 |
| 2.10.3 Cinética de crecimiento de las cepas marcadas con GFP, GUS y capacidad de solubilización.....  | 51 |
| 2. 11 Ensayos de fisiología microbiológica.....   | 52 |
| 2.11.1 Evaluación de producción de enzimas.....   | 52 |
| 2.11.2 Determinación de celulasas.....  | 53 |
| 2.11.3 Determinación de Amilasas.....   | 53 |
| 2.11.4 Determinación Lipasas.....   | 53 |
| 2.11.5 Determinación Proteasas.....   | 54 |
| 2.11.6 Determinación de Pectinasas.....   | 54 |
| 2. 11.7 Evaluación de formación de biofilm.....   | 54 |
| 2.11.7. 1 Caracterización cuantitativa del biofilm.....   | 55 |
| 2.11.7.2 Caracterización de la formación de biofilm por técnicas microscópicas.....                   | 56 |
| 2.11.8.1 Determinación de capacidad de fijación de nitrógeno.....                                     | 56 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.11.8.2 Determinación de actividad ACC desaminasa in vitro .....  | 57        |
| 2.11.8.3 Prueba de antagonismo in vitro .....  | 58        |
| 2.12 Estudio de interacción entre las cepas bacterianas E. sp. 2.14, E. sp. 1.24 y las plantas   | 59        |
| 2.12.1 Preparación del inóculo .....   | 59        |
| 2.12.2 Experimentos en plantas.....  | 59        |
| 2.12.3 Recuento de bacterias en extracto de tallo y raíz de tomate y trigo.....  | 60        |
| 2.12.4 Técnicas microscópicas para visualizar las bacterias inoculadas .....   | 61        |
| 2.12.4.1 Preparación de plantas para observación microscópica.....   | 61        |
| 2.12.4.2 Microscopía de campo claro .....  | 61        |
| 2.12.4.3 Microscopía de fluorescencia.....   | 62        |
| 2.12.4.3 Microscopía Confocal.....   | 62        |
| 2.12.5 Ensayos de colonización en suelo no estéril en condiciones controladas .....  | 63        |
| 2.12.6 Supervivencia de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en suelos de la localidad de Junín,<br>Ferré y Pergamino provincia de Buenos Aires ..... | 64        |
| 2.12.6.1 Ensayos de supervivencia.....   | 64        |
| 2.11 Ensayos de microcosmos en cámara de plantas.....  | 65        |
| 2.11.1 Ensayos de inoculación en tomate, trigo variedad y alfalfa .....  | 65        |
| 2.13.2 Evaluación de capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas en asociación con<br>tomate.....  | 66        |
| 2.13.3 Ensayos de evaluación de capacidad de solubilizar fósforo de las cepas en asociación<br>con tomate .....                                      | 66        |
| <b>Resultados .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>CAPÍTULO III .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>Caracterización de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24, en sus<br/>capacidades PGPR y rizocompetencia.....</b>                                    | <b>69</b> |
| <b>Objetivos .....</b>   | <b>70</b> |
| Objetivos específicos.....   | 70        |
| <b>3. Resultados y Discusión .....</b>   | <b>71</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1. Determinación de fijación biológica de nitrógeno.....   | 71        |
| 3.2 Determinación de actividad ACC desaminasa.....   | 76        |
| 3.3 Determinación de la actividad de enzimas líticas .....   | 77        |
| 3.4 Evaluación de antagonismo in vitro .....   | 79        |
| 3.5 Evaluación de las cepas en su capacidad de solubilizar fósforo asociadas con tomate ...  | 80        |
| 3.6 Formación de biofilm .....   | 84        |
| 3.6.1 Evaluación de la formación de biofilm por microscopía .....  | 86        |
| 3.7 Resumen de actividades PGPR de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 in vitro .....  | 89        |
| <b>3.8 Conclusiones .....</b>  | <b>90</b> |
| <b>CAPÍTULO IV .....</b>   | <b>93</b> |
| <b>Caracterización de la asociación de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 con tomate y trigo .....</b>                              | <b>93</b> |
| <b>Objetivos .....</b>   | <b>94</b> |
| Objetivos específicos.....   | 94        |
| <b>4. Resultados y Discusión .....</b>   | <b>95</b> |
| 4.1 Ensayos de interacción planta-microorganismo .....   | 95        |
| 4.2 Evaluación de la estabilidad del plásmido, crecimiento y capacidad de solubilización de fósforo en las cepas transformadas ..... | 95        |
| 4.2.1 Estabilidad del plásmido .....   | 95        |
| 4.2.2 Crecimiento de las cepas transformadas con plásmidos reporteros.....   | 96        |
| 4.2.3 Solubilización de fósforo .....  | 98        |
| 4.3 Estudios de interacción cepas-tomate/trigo.....  | 99        |
| 4.3.1 Recuento de bacterias E. sp. 2.14-GFP y E. sp. 1.24-GFP en extractos de tallo y raíz..   | 100       |
| 4.3.2 Observación microscópica de raíz y tallo inoculados con cepas marcadas con GFP y GUS.....                                      | 103       |
| 4.4 Colonización de raíces de trigo y tomate en suelo .....  | 110       |
| 4.5 Ensayos de sobrevivencia en suelo .....  | 112       |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.2 Curvas de crecimiento en medios mínimo M9 y rico LB.....                                | 112        |
| 4.5.3 Evaluación cualitativa in vitro de la capacidad para la solubilización de fósforo ..... | 112        |
| 4.5.4 Supervivencia de las cepas en suelo .....   | 113        |
| 4.6 Conclusiones.....   | 114        |
| <b>CAPÍTULO V .....</b>   | <b>118</b> |
| <b>Ensayos a campo de inoculación con promotoras de crecimiento</b>                           | <b>118</b> |
| <b>Objetivos: .....</b>   | <b>119</b> |
| <b>5. Resultados y Discusión .....</b>  | <b>120</b> |
| 5.1 Inoculación de tomate, trigo y alfalfa .....  | 120        |
| 5.1.1 Evaluación de la respuesta a la inoculación de tomate .....                             | 120        |
| 5.1.2 Evaluación de la respuesta en alfalfa .....   | 120        |
| 5.1.3 Evaluación de la respuesta en trigo .....   | 122        |
| 5.2 Ensayos a campo de inoculación de trigo, maíz y soja.....                                 | 124        |
| 5.2.1 Ensayos de inoculación de trigo.....  | 125        |
| Ferré .....   | 125        |
| Junín .....   | 126        |
| Pergamino .....   | 126        |
| 5.2.2 Ensayos de inoculación de maíz.....   | 130        |
| Ferré .....   | 130        |
| Junín .....   | 130        |
| Pergamino .....   | 130        |
| 5.2.3 Ensayos de inoculación de soja .....  | 131        |
| Ferré .....   | 131        |
| Junín .....   | 133        |
| Pergamino .....   | 133        |
| <b>5.3 Conclusiones .....</b>   | <b>137</b> |
| <b>CAPÍTULO VI .....</b>  | <b>139</b> |

|   |            |
|---|------------|
| CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD ENDÓFITA DE TRIGO<br>MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL ADN- <i>nifH</i> .....                          | 139        |
| Introducción.....   | 140        |
| Objetivos .....   | 141        |
| Objetivos específicos.....  | 141        |
| <b>6. Resultados y Discusión .....</b>  | <b>142</b> |
| 6.1 Consideraciones generales sobre la metodología experimental .....   | 142        |
| 6.2 Selección de cebadores para la reacción de PCR.....   | 142        |
| 6.2.1 Perfiles de RFLP- <i>nifH</i> del pool de amplicones de endófitos fijadores de nitrógeno....                            | 144        |
| 6.3 Análisis de la comunidad endófito de trigo mediante RFLP.....   | 145        |
| 6.4 Pirosecuenciación del gen <i>nifH</i> de la comunidad de endófitos de trigo .....   | 148        |
| 6.4.1 Abundancia y distribución de los OTUs.....  | 149        |
| 6.4.2 Estimación de la diversidad y de la riqueza de la comunidad fijadora de nitrógeno...                                    | 149        |
| 6.4.3 Patrón de diversidad beta de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de trigo .                                     | 152        |
| 6.4.4 Asignación taxonómica a las secuencias <i>nifH</i> de endófitos de trigo.....   | 155        |
| 6.4.4.1 Distribución de los subclusters <i>nifH</i> en las comunidades de los tratamientos la<br>comunidad de endófitos ..... | 156        |
| 6.4.4.2 Clasificación taxonómica de los OTUs más abundantes en trigo.....   | 159        |
| Subclusters 1J/1K .....   | 160        |
| Subcluster 3.....   | 160        |
| Subcluster 1B.....  | 161        |
| Subcluster 1E.....  | 162        |
| 6.5 Conclusiones.....   | 165        |
| <b>CAPÍTULO VII .....</b>   | <b>167</b> |
| CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD ENDÓFITA DE<br>TOMATE MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL ADN- <i>nifH</i> .....                         | 167        |
| Objetivos .....   | 168        |

|   |            |
|---|------------|
| Objetivos específicos.....  | 168        |
| <b>7 Resultados y Discusión .....</b>   | <b>169</b> |
| 7.1 Algunas consideraciones generales sobre la metodología experimental.....  | 169        |
| 7.2 Análisis comparativo de las poblaciones endófitas fijadoras nitrógeno mediante RFLP                                   | 170        |
| 7.3 Pirosecuenciación del gen nifH de endófitos de tomate.....  | 172        |
| 7.3.1 Abundancia y distribución de los OTUs.....  | 173        |
| 7.3.2 Estimación de la diversidad y la riqueza de la comunidad fijadora de nitrógeno.....                                 | 174        |
| 7.3.3 Patrón de diversidad beta de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de tomate<br>.....                         | 176        |
| 7.3.4 Asignación taxonómica de las secuencias nifH de endófitos de tomate. ....   | 178        |
| 7.3.5 Distribución de los subclusters nifH de la comunidad de endófitos en distintas etapas<br>de cultivo de tomate. .... | 179        |
| 7.3.6 Clasificación taxonómica de los OTUs más abundantes .....   | 181        |
| -Subcluster 1J/1K.....  | 182        |
| Subcluster 1G .....   | 183        |
| - Subcluster 1A .....   | 184        |
| -Subcluster 1E.....   | 185        |
| <b><i>Conclusiones generales</i> .....</b>  | <b>189</b> |
| <b>Material Suplementario.....</b>  | <b>200</b> |
| <b>Referencias Bibliográficas .....</b>   | <b>213</b> |



# **CAPÍTULO I**

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. Importancia de los cultivos extensivos e intensivos en Argentina**

La idea de agricultura extensiva se vincula a la explotación agrícola que no pretende maximizar el rendimiento del suelo mediante el uso de agroquímicos o de infraestructura, sino que apuesta por la utilización de los recursos que la naturaleza ofrece en la zona [1]. Este sistema de producción, al contrario del intensivo, implica un uso intenso de recursos (insumos, trabajadores, etc.) para incrementar el rendimiento por hectárea [2]. Entre los cultivos extensivos más destacados en la Argentina encontramos los cereales y la soja.

### **1.1 Cultivo de cereales en Argentina**

Argentina tiene una superficie continental de alrededor de 2,8 millones de kilómetros cuadrados y cuenta con unos 34 millones de hectáreas con cultivos agrícolas. Los principales cultivos que ocupan esa superficie son: soja, trigo, maíz, girasol, sorgo y arroz. Para el cultivo de cereales la zona por excelencia es la pampa húmeda, con climas templados y una superficie total de alrededor de 210.000 km<sup>2</sup> concentra el 80% de la producción de cereales [3]. La mayor parte de la producción está en la provincia de Buenos Aires, seguida por Santa Fe y Córdoba. En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, las tierras cultivadas con trigo como cultivo de invierno se alternan con girasol, papas y pastoreo de ganado. En el noreste de la provincia de Buenos Aires, en los cultivos de primavera verano se rota el trigo con maíz, mijo y sorgo [4].

El trigo (*Triticum aestivum*) fue el cultivo fundador de la colonización agrícola de la región pampeana, siendo su historia en el país paralela a la de la agricultura argentina [5]. La expansión del cultivo se inicia en 1870, cuando las colonias agrícolas comenzaron a extenderse por las provincias de Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos [5]. La exportación de gran parte de su producción convirtió a la Argentina en “el granero del mundo” y contribuyó a ubicar al país en un lugar destacado en el contexto mundial. En la última década, la superficie total sembrada osciló entre 5 y 7 millones de hectáreas, ocupando principalmente las provincias de Buenos Aires y Santa Fe. El rendimiento por hectárea se ha mantenido entre los 1.900 y 2.600 kilos, mientras que la producción total al año 2017 fue estimada en 13,4 millones de toneladas [6].

En general, una parte de los granos se destina al consumo interno y el resto se exporta [7]. El cultivo de trigo es el más importante a nivel mundial, tanto si se lo considera desde la superficie sembrada y la producción como en su significado en la alimentación humana. Aunque en los últimos años es un cultivo que ha perdido competitividad frente a otros, en especial la soja, la Argentina está en los primeros lugares en cuanto a la producción y exportación de este cereal. El desafío actual para productores y técnicos es tratar de recuperar el lugar que tuvo, sobre todo teniendo en cuenta su importancia estratégica dentro de una rotación balanceada como requiere la intensificación de la agricultura en la actualidad. Desde los 70 a la actualidad el área del cultivo ha disminuido en un 49% mientras que la producción se incrementó en un 59% gracias a los avances tecnológicos que permitieron un incremento en los rendimientos.

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es uno de los más importantes a nivel mundial, con una producción estimada 2017/2018 de 1038 millones de toneladas [8], presenta distintos usos como ser alimentación animal, molienda húmeda, molienda seca, etanol, biogás y biomateriales entre otros [9]. El consumo de maíz viene incrementándose aceleradamente. El rápido crecimiento de la industria de etanol en Estados Unidos, la evolución de los países asiáticos, la recuperación de la industria aviar, los nuevos mercados y el aumento de la población son algunas de las razones que han llevado a que el consumo mundial de maíz crezca más de un 35% durante la última década [10]. En la República Argentina, el cultivo alcanzó los 35 millones de toneladas en la campaña 2017/2018 [11]. Esta producción se correspondió con una superficie cosechada de 987 mil hectáreas.

### **1.1.1 Cultivo de oleaginosas**

El denominado “complejo oleaginoso” es hoy el principal bloque exportador y uno de los pilares de la economía nacional. Las especies oleaginosas más importantes de la producción argentina son la soja (*Glycine max*), seguida por el girasol (*Helianthus annuus*), que continuamente mejoran su genética y protagonizan incrementos en la producción. También se producen, aunque en muy pequeña proporción, cártamo, colza y lino. Las principales provincias

productoras de oleaginosas son Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, que en conjunto representan el 84 % de la producción total nacional.

Argentina ocupa el tercer lugar como productor mundial de aceite de soja, detrás de China y Estados Unidos. A modo de ejemplo del crecimiento en una década, Argentina pasó de una producción de 31,5 millones de toneladas en 2003/2004 y 14,5 millones de hectáreas sembradas; a 53 y 55 millones de toneladas en el 2013/2014 y más de 20 millones de hectáreas sembradas. Según datos de la Bolsa de Cereales en el 2016/2017 se sembraron 20,6 millones de hectáreas con una producción de 56 millones de toneladas. De acuerdo con el estimado de la Bolsa de Comercio de Rosario la cosecha de soja con una superficie sembrada de 19,2 millones de hectáreas será de 56 millones de toneladas en la temporada 2016/2017, ligeramente superior a los 55,3 millones de toneladas en la temporada 2015/2016 con una mayor superficie sembrada de 20,2 millones de hectáreas.

## **1.2 Cultivos intensivos**

La agricultura intensiva es un método de producción agrícola en el cual se hace un uso intensivo de los medios de producción como la siembra. Consiste en sacar la mayor cantidad de productos por unidad de superficie aplicando fertilizantes, semillas seleccionadas, regadíos, maquinaria, entre otros [2]. Dentro de este sistema encontramos como cultivos característicos las hortalizas: tomate, pimiento, papa entre otros.

### **1.2.1 Cultivo de hortalizas**

El cultivo de hortalizas, según un análisis realizado por el INTA (2009-2012), abarca 500.000 hectáreas. El volumen de producción es 8-10 millones de toneladas (2009/2010), y si bien es muy inferior a cereales y oleaginosas (más de 90 millones de toneladas campaña 2016/2017) se destaca fundamentalmente por su elevado valor económico por unidad de peso y por su alta producción por unidad de superficie cultivada [12]. La horticultura argentina se caracteriza por su amplia distribución geográfica y por la diversidad de especies que produce. El mayor desarrollo de algunas zonas para la horticultura comercial se debe a su mayor cercanía con los centros de distribución y consumo. Así mismo tiene una importante intervención en las economías regionales por su demanda de mano de obra e insumos.

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es la segunda hortaliza de mayor importancia a nivel mundial después de la papa [13]. Lozano (2012) sostiene que la producción de hortalizas en la República Argentina tiene como uno de sus principales protagonistas el cultivo de tomate especialmente bajo el sistema de agricultura protegida. Según Argerich *et al.* (2011) la producción estimada de las hortalizas es de 10.500.000 toneladas, de cuales el 65% corresponde a nueve especies, entre ellas, el tomate [14]. Se estima que 17.800 hectáreas de cultivo se producen en todo el territorio nacional tanto para consumo en fresco, industria, mercado interno e internacional [15].

### **1.3 Interacciones entre plantas y microorganismos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

El término “rizobacteria” fue introducido por Kloepper y Schroth para referirse a aquellas comunidades bacterianas del suelo capaces de colonizar las raíces de las plantas [16]. Los mismos autores en 1981, ampliaron este concepto, incluyendo dentro de la denominación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (abreviado PGPRs por sus iniciales siglas en inglés) a todos aquellos microorganismos capaces de estimular el crecimiento de las plantas posterior a la colonización de sus raíces [17]. Actualmente, se reconoce que los microorganismos promotores de crecimiento vegetal no se restringen únicamente a las rizobacterias, sino que además incluyen a hongos (especialmente micorrizas), bacterias de vida libre y microorganismos endófitos.

Las bacterias PGPRs se encuentran asociadas a un amplio espectro de especies vegetales presentes en diferentes ambientes [18]. Basados en la interacción con la planta huésped los mecanismos de promoción se clasifican en directos e indirectos [17]–[19]. Es pertinente aclarar que en la mayoría de la bacterias PGPR no se restringen a un único mecanismo de acción, por lo que el efecto sobre la planta puede resultar de la combinación de la actividad de dos o más mecanismos [20].

Los mecanismos directos son los procesos que facilitan el acceso de nutrientes poco disponibles o modulan los niveles de hormonas que intervienen en el proceso de crecimiento [21]. Dentro de estos se encuentran la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, actividad

ACC desaminasa y producción de sideróforos. Los mecanismos indirectos son aquellos asociados a la sanidad de la planta ya sea mediante el control de los patógenos (biocontrolador) o la inducción de resistencia [22]–[26]. A continuación, se describe algunos de los mecanismos PGPR más conocidos.

### **1.3.1 Mecanismos de promoción directa**

#### **1.3.1.1 Fijadores de nitrógeno**

El gas dinitrógeno ( $N_2$ ) representa la forma de nitrógeno más abundante en la biosfera, pero no puede ser utilizada por la mayoría de los organismos, incluyendo las plantas. La fijación biológica del nitrógeno (BNF), es decir la reducción de  $N_2$  en amonio mediada por la enzima nitrogenasa, es un proceso exclusivo de organismos procariontes [27]. Esta actividad ayuda a suplir a la biosfera con compuestos nitrogenados y a la vez compensa las pérdidas generadas por efectos de la desnitrificación. Es una alternativa sustentable y económica que permite disminuir la fertilización química, y suplir la necesidades de nitrógeno de la planta [21], [27]–[29].

La comunidad fijadora de nitrógeno presenta una diversidad taxonómica y fisiológica importante, incluyendo especies en la mayoría de los géneros conocidos de arqueas y bacterias. Los diazótrofos se pueden clasificar según su estrategia de vida en microorganismos simbióticos (*Rhizobium* spp.), asociativos (*Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp. etc.) o de vida libre (*Klebsiella* spp. y *Rhodospirillum* spp.) [30].

El componente de fijadores de nitrógeno es la principal característica de muchos inóculos usados como biofertilizantes dentro de los cuales se destacan los basados en *Azospirillum* spp. [31], *Azotobacter* spp, *Burkholderia* spp. [32], *Rhizobium* spp [33] entre otros.

#### **1.3.1.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo**

El fósforo (P) es un factor limitante en la producción agrícola ya que es un macroelemento esencial para el crecimiento de las plantas. El mayor reservorio de este mineral se encuentra en formas no asimilables para la planta, representando las sales insolubles del 75 al 90% del fósforo total del suelo. Una proporción importante de los fosfatos solubles agregados es rápidamente fijado en forma de fosfatos de hierro, aluminio y calcio generando su

precipitación y adsorción por los coloides, lo que pone de relieve las limitaciones del uso de fertilizantes de origen químico [34].

Un número considerable de bacterias denominadas comúnmente PSB (Phosphorous Solubilizing Bacteria) poseen la capacidad de solubilizar las formas de P inorgánico mediante la producción de ácidos orgánicos y/o la producción de agentes quelantes. Estas bacterias se encuentran distribuidas en diferentes ecosistemas, aunque el tipo y naturaleza del microorganismo está condicionado al suelo y vegetación presentes [35]. Se ha investigado el uso de estas bacterias como inoculante en numerosas especies vegetales, demostrando que esta práctica permite incrementar simultáneamente la absorción de fósforo y el rendimiento de los cultivos [29]-[37].

### **1.3.1.3 Microorganismos productores de fitohormonas**

Se trata de hormonas vegetales que regulan parámetros como el crecimiento, la división celular o extensión de la raíz [44], [45]. Este es uno de los aspectos de las actividades promotoras del crecimiento que mayor interés suscitan desde el punto de vista agrícola. En la literatura se encuentra reportado que diversas especies bacterianas producen auxinas como producto de su metabolismo, incluyendo ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (IBA) o sus precursores [45]–[47]. Estas moléculas tienen una gran influencia en el crecimiento de las plantas, especialmente de la raíz y regulación de la germinación [48]–[51].

Las giberelinas son un amplio grupo de moléculas, de las cuales 4 tipos son sintetizados por bacterias PGPR (GA1, GA2, GA3 y GA20) [52]. Estas hormonas son transportadas desde las raíces a las partes aéreas de la planta, donde los efectos que ejercen son notables y más aún cuando las bacterias también tienen la capacidad de producir auxinas que estimulan el sistema radicular mejorando el suministro de nutrientes para facilitar el crecimiento en la parte aérea [53]. Las citoquininas promueven y mantienen la división celular de las plantas y están involucradas en varios procesos de diferenciación que incluyen la formación de los brotes o el crecimiento primario de la raíz, entre los microorganismos más conocidos por producir citoquininas se encuentran: *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus*, *Klebsiella*, *Xanthomonas* [54], [55]. El etileno es una hormona difusible que tiene un rol preponderante como

mediador y coordinador de las señales internas y externas que modulan la dinámica del crecimiento y los programas de desarrollo en las plantas [56]. Se ha demostrado que determinadas bacterias PGPR productoras de la enzima ACC desaminasa son capaces de llevar a cabo la descomposición del precursor del etileno, el ácido aminociclopropano carboxílico (ACC), aliviando o atenuando el estrés de las plantas en situaciones de salinidad, sequía, calor, frío, o por la presencia de metales pesados, etc.) [44], [57] .

### **1.3.2 Mecanismos indirectos**

#### **1.3.2.1 Control biológico.**

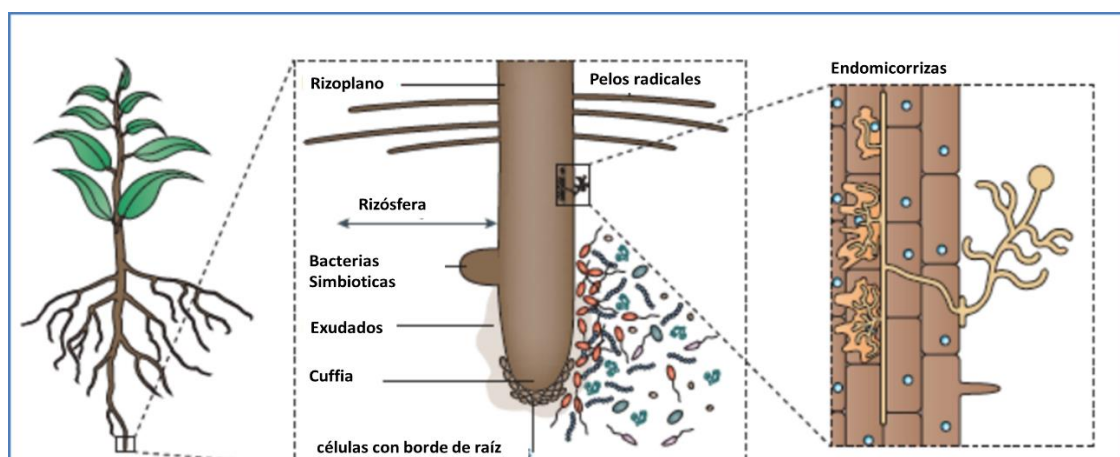
La forma de realizar esta tarea es variada, desde la producción de sustancias antibióticas, producción de los propios sideróforos, excreción de enzimas líticas, entre otros [58]. Los sideróforos producidos por las PGPR son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro para secuestrar este metal de su entorno. Este mismo mecanismo que emplean las bacterias PGPR para captar los metales, y comprometen el desarrollo de los fitopatógenos que pueden infectar la planta, ya que estos también requieren de los metales para su correcto crecimiento [59]. En cuanto a la antibiosis, los mecanismos por los que se consiguen se han ido describiendo a lo largo de las últimas décadas. Es sabido que las cascadas genéticas que regulan la síntesis de estos componentes están reguladas a su vez por condiciones ambientales, como pueden ser el pH, distintas fuentes de nutrientes, elementos traza, varios tipos de estímulos, incluso el genotipo de la planta huésped han resultado tener influencia en la regulación de la síntesis de estos compuestos [60].

La producción de enzimas líticas por parte de las bacterias supone otro mecanismo de biocontrol. Algunas de estas enzimas son quitinasas, celulasas, lipasas o proteasas que tienen la capacidad de hidrolizar partes de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos [61]. Todos estos mecanismos los emplean las bacterias para poder competir por el rico nicho que supone la rizósfera de forma que ellas se vean favorecidas por su colonización. A su vez esta actividad de las bacterias favorece a las plantas protegiéndolas de la colonización por patógenos o incluso induciendo mecanismos de resistencia que empleará la planta por sí misma [62].



#### **1.4 Procesos de colonización en plantas**

Las interacciones planta-microorganismo son altamente complejas y dinámicas, las interacciones comienzan con la etapa de colonización microbiana la cual puede ocurrir en distintas superficies vegetales, como en la filósfera, la endosfera o la rizósfera. La filósfera comprende las partes aéreas de las plantas, siendo las hojas los órganos principales de interacción. Se ha estimado que las poblaciones bacterianas por centímetro cuadrado (cm<sup>2</sup>) de superficie de la hoja están en el orden de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> unidad formadora de colonias (UFC) [63]. La rizósfera es la zona de suelo que rodea a las raíces y es fuertemente influenciada por las mismas, este ambiente es considerado uno de los más dinámicos del planeta (Figura 1) [64]. Por otra parte, se considera a la endósfera como el sistema interno de la planta que incluye los espacios intercelulares y los sistemas de transporte. Los procesos de colonización endofítica y rizosférica, inician con la “migración” de las poblaciones bacterianas hacia las raíces en respuesta a la liberación de diferentes compuestos orgánicos de las plantas hacia el suelo, denominados comúnmente fotosintatos o exudados, los cuales contienen concentraciones importantes de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, orgánicos, fenólicos, azúcares y vitaminas que son utilizados por los microorganismos como fuente de nutrientes para su crecimiento [65], [66]. El “efecto rizosférico” implica la capacidad de los exudados, para actuar como quimioatrayentes de las comunidades microbianas del suelo [67]. Un ejemplo del efecto rizosférico se encuentra al comparar las densidades bacterianas: La densidad microbiana en la rizósfera alcanza concentraciones del orden de 10<sup>10</sup> o 10<sup>12</sup> UFC/g de suelo, mientras que las concentraciones bacterianas en regiones del suelo que están alejados del sistema radicular de las plantas presentan concentraciones menores a 10<sup>8</sup> UFC/g de suelo.

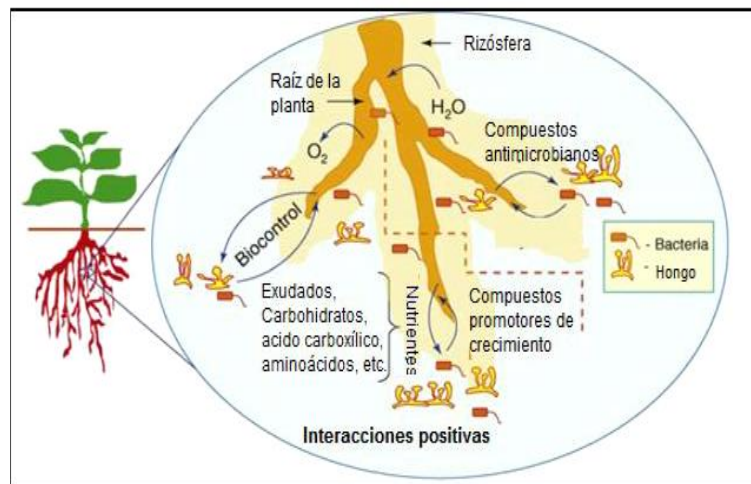


**Figura 1. Representación gráfica de las distintas zonas de interacción planta-microorganismo en la raíz.** Los microorganismos son “atraídos” hacia la rizósfera y la superficie de las raíces (rizoplano) en donde se da el proceso de colonización, generalmente estos procesos se originan en los extremos de las raíces donde se lleva a cabo la elongación radicular y en los puntos de emergencia de los pelos radiculares. Se observa dos ejemplos de asociaciones simbióticas radiculares, nódulos fijadores de nitrógeno y la asociación endomicorríca (recuadro derecho) [63], [68].

Una vez establecido el contacto con la superficie de la raíz, los microorganismos rizosféricos forman microcolonias, y dependiendo del tipo de microorganismo, permanecerán en la superficie o progresarán iniciando el proceso de colonización endofítica [63]. Existen numerosos reportes que demuestran que las bacterias responden a los exudados de las plantas a través de la expresión de diversos genes, tales como aquellos asociados con la síntesis de EPS y la formación de biofilm [69], [70]. En éste biofilm formado sobre las superficies vegetales, las comunidades microbianas se encuentran protegidas de factores adversos del medio ambiente [71]. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* es atraído por ácido L-málico secretado por *Arabidopsis thaliana*, y la formación de biofilm es activada por este compuesto en un proceso dependiente de los mismos genes que son requeridos para la formación de biofilm *in vitro* [72], [73]. La síntesis de EPS también es requerida para la formación de biofilm y para la colonización de la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un mutante deficiente para la producción de EPS no puede adherirse sobre la superficie ni colonizar endofíticamente raíces de arroz [70]. *Azospirillum brasilense*, una PGPR que normalmente coloniza y promueve el crecimiento de gramíneas como el trigo y el maíz, tiene la capacidad de colonizar el rizoplano formando biofilm [74], [75]. Timmusk *et al.* (2005)[76] han reportado la formación de biofilm en raíces de *Arabidopsis*

*thaliana* y cebada por parte de *Paenibacillus polymyxa*, demostrando mediante la utilización de una cepa marcada con la proteína *GFP* y técnicas microscópicas el patrón de colonización generado por ésta bacteria. En síntesis, se dispone de varias evidencias indicando un rol importante de los EPS y formación de biofilm en el proceso de las etapas tempranas de la interacción planta-rizobacterias.

Los microorganismos pueden encontrarse en zonas diferentes de la planta y establecer interacciones benéficas Figura 2, neutrales con sus plantas huésped. Las interacciones benéficas son de gran interés en el ámbito de la bioprospección, ya que constituyen en sí mismas los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal [77].



**Figura 2. Interacciones positivas en la rizósfera.** A cambio de los nutrientes liberados por las plantas en la rizósfera (zona amarilla), los microorganismos pueden suplirla con compuestos promotores de crecimiento vegetal. Adicionalmente, en este espacio se dan también procesos de biocontrol de patógenos, mediados entre otros mecanismos por liberación de compuestos antimicrobianos [78].

#### 1.4.1 Colonización endofítica.

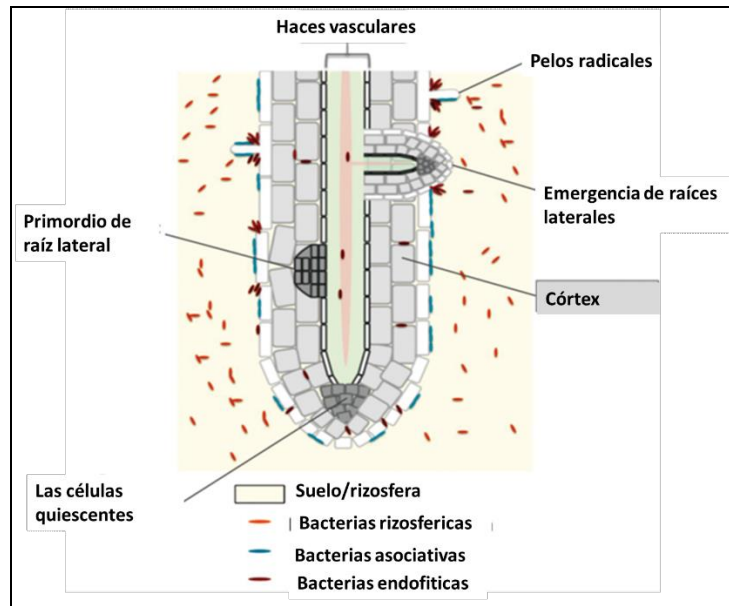
Las bacterias endófitas se definen como aquellas bacterias que se pueden aislar de los tejidos vegetales con desinfección superficial, y no causan daños visibles a la planta. Si bien esta definición no incluye bacterias endofíticas no cultivables, es una definición práctica basada en las limitaciones experimentales [79].

La mayor parte de los microorganismos endófitos provienen o son reclutados de la comunidad del ambiente rizosférico, por lo tanto, deben ser eficientes colonizadores de la rizósfera y/o rizoplano [64], [80]. Una colonización endofítica exitosa involucra a un huésped compatible. Se postula además que

los endófitos representan a miembros especializados de los colonizadores del rizoplasma: existe una selección por parte de la planta de las bacterias más adaptadas a la vida endófitica siendo éstas reclutadas de un gran pool de bacterias rizosféricas y que eventos estocásticos, ambientales y factores que dependen de las bacterias conducen a que éstas puedan colonizar los tejidos internos [81]. En general, no se conoce si las bacterias endófitas necesitan alcanzar un tejido u órgano específico para el desempeño adecuado de sus funciones. En cuanto a la localización en la planta, si bien generalmente el mayor número de bacterias endófitas se encuentra en las raíces, también se ha reportado colonización en tallos, semillas, hojas, frutos, tubérculos, órganos reproductivos y en el interior de nódulos [62], [63], [82], [83].

Se ha reportado que el ingreso de las bacterias endófitas desde el rizoplasma hacia el tejido cortical de la raíz puede implicar tanto mecanismos pasivos como activos [80] y diferentes vías de ingreso [63], [84], [67]. En la Figura 3 se muestran esquemáticamente la raíz y las zonas por donde puede ocurrir la internalización bacteriana. El ingreso pasivo puede tener lugar por grietas naturales presentes en las zonas de emergencia de las raíces laterales (a través de la lámina media de la epidermis), como así también por la base de los pelos radicales y en la zona de crecimiento del ápice de la raíz o las generadas por otros microorganismos deletéreos [30], [85], [86]. Varios trabajos reportan como sitio de entrada de las bacterias endófitas la colonización por los pelos radicales [87] [88]. El ambiente que rodea a los pelos radicales es propicio para la vida y reproducción de los microorganismos debido a la capacidad de absorción de nutrientes en esta zona de la raíz. Además de entrar por las raíces, otros sitios comúnmente usados por los endófitos para ingresar a las plantas son las estomas, las lenticelas, y las radículas.

Los mecanismos activos por los que las bacterias endófitas son capaces de ingresar a los tejidos de las plantas implican la expresión de enzimas líticas que degradan la pared celular vegetal para luego continuar la colonización en el interior de los tejidos vegetales [24].



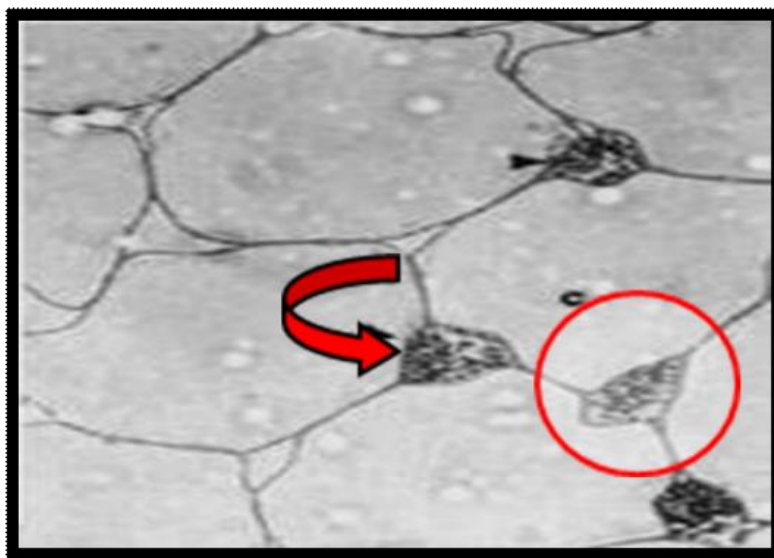
**Figura 3:** Esquema muestra los tipos de asociación de las bacterias en relación con su capacidad de colonizar las diferentes zonas de interacción (rizosférica, asociativa y endofítica) y los posibles puntos de ingreso a las raíces [85].

Estas enzimas tales como las pectinasas y celulasas favorecen la formación de grietas o lastimaduras en la rizodermis por donde ingresan los microorganismos, la actividad enzimática parece también mediar el pasaje a través de la endodermis permitiendo la penetración al periciclo y los vasos xilemáticos [80], [89]. La capacidad de degradar pectinas el mayor constituyente de la pared primaria de las células vegetales y de la lámina media, es una característica de muchas bacterias asociadas a plantas, incluyendo bacterias patógenas de las mismas. A diferencia de las bacterias endofíticas, los microorganismos patógenos producen lesiones graves en los tejidos de las plantas que colonizan.

También se sugiere que la producción de enzimas celulíticas facilitarían la digestión de la pared celular para que sea posible una diseminación vertical, como es el caso de *Azoarcus* sp. BH72 [90]. Esta bacteria no utilizaría las celulasas para crecer ya que no se registra crecimiento con carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono y energía (FCE) y se postula que su rol sería permitir la invasión de los tejidos en el proceso de colonización de la raíz. *Azoarcus* no secreta sus enzimas celulolíticas, sino que éstas están asociadas a la superficie celular y se postula que de esta manera podrían mediar una digestión más localizada de la pared celular de las plantas y menos agresiva en comparación con los organismos fitopatógenos. Hurek *et*

al (1994) reportaron que *Azoarcus sp.* tiene la capacidad de ingresar a los espacios intercelulares de raíces de gramíneas y, una vez allí, aumentar la densidad celular y moverse entre los tejidos vasculares centrales de las plantas hasta llegar a los tejidos aéreos, como lo son los tallos y las hojas [91] (Figura 4).

La mayor parte de estas celulasas parecen estar reguladas por mecanismos de inducción-represión dependiendo de la FCE del medio, no obstante, en algunas bacterias del rumen como *Pseudomonas aeruginosa* éstas se expresan constitutivamente [92]. Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a plantas la actividad celulolíticas se ha encontrado en *Frankia sp.*[22], *Rhizobium sp.* [93], y *Bacillus* [25]. Se ha reportado que *Azospirillum irakense*, aislado del interior de tejidos desinfectados superficialmente, fue capaz de crecer en un medio con pectina como única FCE. Estas enzimas fueron también encontradas en raíces de plantas de sorgo inoculadas con la PGPR endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* [94].



**Figura 4.** Corte transversal de una raíz de trigo mostrando los espacios intercelulares colonizados por bacterias endófitas [95].

### **1.5 Ecología microbiana: el estudio de la biodiversidad**

La ecología microbiana se enfoca en la estructura de las comunidades, cómo interactúan entre sí y con el ambiente, así como también las funciones que cumplen. Se interesa también por revelar las propiedades emergentes de un

ecosistema, aquellas capacidades que no se manifiestan en microorganismos aislados sino en el conjunto de un consorcio [96].

Las comunidades microbianas presentan atributos característicos, como la composición, diversidad o la dinámica en el tiempo, útiles para describir y comparar distintos hábitats. La composición de la comunidad, es decir los diferentes taxones o las poblaciones nativas que la componen, es el resultado de la selección del sistema, tanto en sus componentes bióticos como abióticos. En este contexto, uno de los desafíos actuales de la ecología microbiana es la identificación tanto de los microorganismos cultivables, basados en aislamientos y/o el análisis de las propiedades metabólicas de los mismos, como de los microorganismos no cultivables, basados en el análisis del metagenoma (ADN presente en una muestra ambiental) por medio de técnicas moleculares. A continuación, se describen algunas de las herramientas tanto dependientes como independientes de cultivo, usadas para el estudio de las comunidades microbianas en ambientes naturales.

### ***1.5.1 Herramientas para el estudio de microorganismos***

#### ***1.5.1.1 Métodos dependientes de cultivos***

Se han hecho continuos esfuerzos para aumentar la probabilidad de aislamiento de los microorganismos y alcanzar a disponer de cultivos puros en el laboratorio. En la literatura existe una extensa lista de medios de cultivo diseñados, que incluyen diferentes tipos de fuente de carbono, de vitaminas, de energía, entre otros, al igual que consideraciones sobre los factores fisicoquímicos que afectan el crecimiento, ejemplo temperatura, pH, requerimientos de oxígeno, salinidad, entre otros [97].

La aplicación de estas metodologías dependientes de cultivo es esencial para disponer de cultivos aislados y puros que permitan identificar las especies, determinar su caracterización genotípica, fenotípica y el estudio de procesos de asociación y colonización en la interacción planta-microorganismo. Algunas de las principales ventajas asociadas a esta metodología residen en su costo económico relativamente bajo y de que el investigador cuenta con el “material” microbiano para su uso en futuros estudios [21]. Mientras que la principal desventaja es la limitación de recuperar una fracción mínima de la diversidad presente en el ambiente, ya que se estima que cerca del 99% de una

comunidad microbiana presente en el ambiente no es realmente accesible por métodos tradicionales de aislamiento microbiológicos [98], [99].

### ***1.5.1.2 Metodologías de estudio de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.***

Tanto para caracterizar la interacción PGPR-planta, así como persiguiendo el objetivo final de la aplicación de las PGPR como inoculantes en cultivos de importancia agronómica, surge la necesidad de estudiar la colonización y supervivencia de estas en las plantas inoculadas.

En el sistema suelo-planta la complejidad de interacciones es inmensa, por lo que sistemas menos complejos y más reproducibles, como los sistemas de crecimiento en condiciones asépticas, son muy utilizados para evaluar la capacidad de colonización de las PGPR y la influencia de factores bióticos o abióticos sobre ésta [100]. Estos sistemas consisten en la utilización de semillas desinfectadas (para eliminar la población microbiana nativa superficial), el crecimiento de las mismas en soporte estéril y en condiciones controladas de humedad, temperatura y fotoperíodo (cámara de cultivo), y la inoculación con el microorganismo en estudio [101], [102]. El crecimiento de las plantas en estas condiciones puede realizarse en sustratos sólidos, semi-sólidos o líquidos [103], [104]. La desinfección de las semillas puede realizarse mediante diversos protocolos [60], [105], y debido a que la población microbiana de las semillas es variable suele ser necesaria una puesta a punto de la desinfección para que ésta sea efectiva. Con estos estudios se pretende monitorear las bacterias PGPR inoculadas, caracterizar los patrones de colonización, localización y distribución bacteriana en la planta inoculada, cuantificar las poblaciones de la bacteria inoculada (del rizoplasma y endofítica) y su persistencia en el tiempo, entre otros [106]. Asimismo, se busca elucidar las bases moleculares de la interacción PGPR-planta, buscando rasgos bacterianos que puedan estar involucrados en la colonización, principalmente a través de la construcción de mutantes defectivos de genes potencialmente implicados en la colonización y posterior análisis de la habilidad de colonización estos mutantes en competición con la cepa salvaje.

Luego del crecimiento en condiciones asépticas es posible cuantificar la población de la bacteria inoculada tanto del rizoplasma como del interior de los



tejidos. Previa desinfección superficial de los tejidos, se realiza el macerado de los mismos y la siembra en un medio de cultivo adecuado para su recuento. Las comunidades del rizoplasma se calculan como la diferencia entre la población total del tejido sin desinfectar y la encontrada en los tejidos desinfectados (población endofítica) [106]. En este tipo de estudios, si bien llevados a cabo en condiciones asépticas, es posible encontrar que los controles de tejidos no inoculados presentan crecimiento de microorganismos, lo cual puede deberse a los endófitos presentes en la semilla. En estos casos, al igual que cuando se trata de estudios de competencia llevados a cabo en condiciones no asépticas, es posible recurrir a la utilización de marcadores, como la resistencia a antibióticos o la introducción de genes reporteros, para el monitoreo de las bacterias inoculadas. En los ensayos en condiciones asépticas se pueden encontrar en promedio a los 15 días post-inoculación (PI) alrededor de  $10^6$  y  $10^9$  UFC de bacterias inoculadas en el rizoplasma por gramo de peso fresco de tejido [88], [168]. Las bacterias pueden internalizarse en los tejidos radiculares y establecer poblaciones endofíticas que se encuentran a los 15 días PI en el rango de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g de peso fresco de tejido [107], [108].

### **1.5.1.3 Uso de marcadores cromogénicos**

Los ensayos utilizando marcadores cromogénicos fueron pioneros en los estudios de colonización, principalmente el uso de los genes reporteros *gusA* o *lacZ* que codifican para las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y  $\beta$ -galactosidasa, respectivamente [109]. Estos marcadores han sido ampliamente utilizados para estudiar la localización de bacterias en los tejidos vegetales [60], [103], [110] (Figura 5). La localización de las bacterias marcadas con estos genes en los tejidos de las plantas inoculadas a menudo conduce a la difusión del color a lugares que pueden no ser los sitios de colonización bacteriana [111]. No obstante, construcciones estables con estos marcadores se continúan empleando para estudiar la colonización superficial y los posibles sitios de entrada de los microorganismos en las plantas que colonizan, haciendo uso de microscopía de campo claro [101].

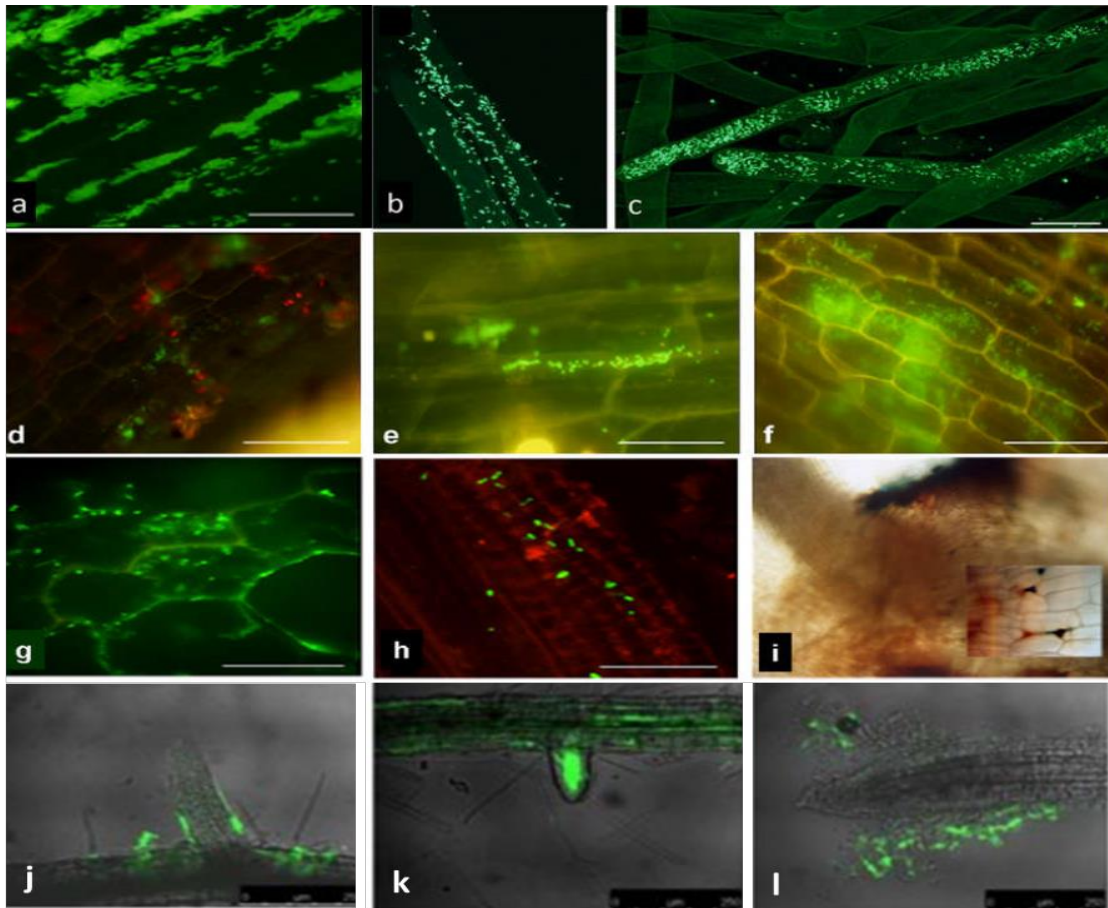
#### **1.5.1.4 Uso de marcadores fluorescentes.**

En la actualidad, el empleo de proteínas fluorescentes es una herramienta clave para el estudio de estos procesos (Figura 5). Una de ellas es la proteína verde fluorescente o GFP (de las siglas en inglés Green Fluorescent Protein), con la que las células bacterianas pueden ser identificadas por microscopía de fluorescencia [110]. Las bacterias marcadas con GFP pueden ser detectadas y enumeradas *in situ* y las muestras no necesitan ser manipuladas para fijarlas, lavarlas, hibridarlas o teñirlas [112]. En este tipo de estudios es necesario utilizar técnicas microscópicas que permitan la excitación de la proteína expresada y la detección de la emisión luz que ésta genera. Esta ampliamente distribuida la utilización de la microscopía de fluorescencia para realizar este tipo de observaciones [59], [106], [113].

Por otro lado, la microscopía de escaneo láser confocal también es muy utilizada en estos casos. Su principal ventaja es que permite obtener imágenes de mayor calidad mediante técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz que proviene de planos fuera de foco. El microscopio confocal permite capturar planos ópticos de la muestra de forma que luego se pueda hacer una reconstrucción tridimensional de la misma. Debido a las ventajas que presenta, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la interacción entre microorganismos y plantas, en particular para demostrar la colonización de tejidos internos por los microorganismos endófitos, sin necesidad de realizar cortes histológicos [59], [114].

#### **1.5.2 Métodos de estudio independientes del cultivo**

El desarrollo de técnicas para la extracción del ADN o ARN de la comunidad microbiana a partir de muestras ambientales y su análisis han hecho posible un mayor conocimiento de la diversidad microbiana. La mayoría de las técnicas moleculares usadas para estudios de diversidad microbiana consisten en el análisis del ADN resultante de la amplificación de una secuencia blanco. La secuencia más frecuentemente usada es la del gen 16S ARNr que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano.



**Figura 5. Uso de genes reporteros para el estudio de la localización de PGPRs en los tejidos vegetales.** Colonización del rizoplasma (A, D, E, F, G, H, k, j) y de los pelos radicales (B, C, I) por PGPR marcadas con el gen reportero GFP, y colonización de los espacios intercelulares por bacterias marcadas con el gen reportero GUS (I). Las figuras j, k, I tomadas con microscopia Confocal. Las figuras fueron tomadas de cuatro publicaciones y adaptadas para esta tesis [88], [112], [115], [116].

Este marcador ha sido extensamente usado dado que: (1) está presente en todos los microorganismos y tiene la misma función en todos ellos; (2) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; (3) su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia génica horizontal entre microorganismos; (4) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado para proporcionar suficiente información, y (5) el análisis de la secuencia permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos [117]. Por otro lado, el análisis de los genes funcionales ha permitido estudiar procesos metabólicos específicos en comunidades

microbianas, tales como la fijación de nitrógeno, la oxidación de metano, la nitrificación, etc.

La descripción de los microorganismos presentes en el ambiente experimentó un gran avance gracias a la información que proporcionan los análisis basados en secuencias ribosomales o funcionales, y ha permitido establecer firmas moleculares a varios niveles taxonómicos, las que son utilizadas como la base de una identificación bacteriana por comparación filogenética [118]. Esta aproximación se ha utilizado para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes tipos de ambientes [119]–[122].

### **1.5.3 Métodos moleculares de huellas genéticas**

A pesar de que es posible obtener información filogenética precisa de los microorganismos dominantes en un consorcio microbiano mediante el clonado y secuenciación convencional del gen ARNr 16S (se detalla en la siguiente sección), el esfuerzo y el tiempo que involucran estos estudios limita el número de muestras que es posible analizar. La limitación del número de muestras impide la evaluación exhaustiva de cambios en la estructura de la comunidad microbiana en relación con cambios en las condiciones fisicoquímicas y/o biológicas en el tiempo y espacio, lo cual es esencial cuando se pretende estudiar la funcionalidad de una comunidad.

Una alternativa para la investigación de comunidades bacterianas de muestras complejas ha sido el análisis del gen ARNr 16S con métodos moleculares de huellas genéticas como DGGE [123], [124] (del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) [125], TGGE (del inglés *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) [126], [127] SSCP (del inglés *Single-Strand Conformation Polymorphism*) [128], [129], que permiten el análisis simultáneo de múltiples muestras. Otra metodología que permite la caracterización de múltiples muestras es RFLP [130], [131] (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y más recientemente RAPD (del inglés *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) [132].

Estos métodos presentan buena reproducibilidad, son rápidos y de bajo costo, publicaciones recientes han demostrado su utilidad en investigaciones que requieran el seguimiento de comunidades en el tiempo o en ensayos con múltiples tratamientos experimentales [124]. Por otra parte, pueden presentar

limitaciones importantes como desvíos asociados a la amplificación por PCR y una baja resolución taxonómica, ya que grupos filogenéticos muy distintos pueden generar fragmentos de tamaño equivalente [107].

#### **1.5.3.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)**

La técnica de RFLP permite comparar la composición de una comunidad bacteriana mediante la detección de variaciones en la longitud de los fragmentos de restricción que se producen cuando el ADN se trata con endonucleasas de restricción o también llamadas enzimas de restricción. Las diferencias en el tamaño de los fragmentos son consecuencia de la variación de bases en el sitio de reconocimiento de determinadas enzimas en relación con la presencia o ausencia de determinados sitios de reconocimiento o puntos de corte. Brevemente, la técnica consiste en extraer el ADN de cepas bacterianas o directamente de una muestra ambiental (ADN metagenómico), amplificar el mismo mediante PCR con cebadores específicos para el gen de interés, ejemplo ARNr 16S, e incubar los productos amplificados con diferentes enzimas de restricción. Los productos de la digestión son separados mediante electroforesis en gel de agarosa, resultando en un patrón de bandas que caracteriza cada muestra (huella digital).

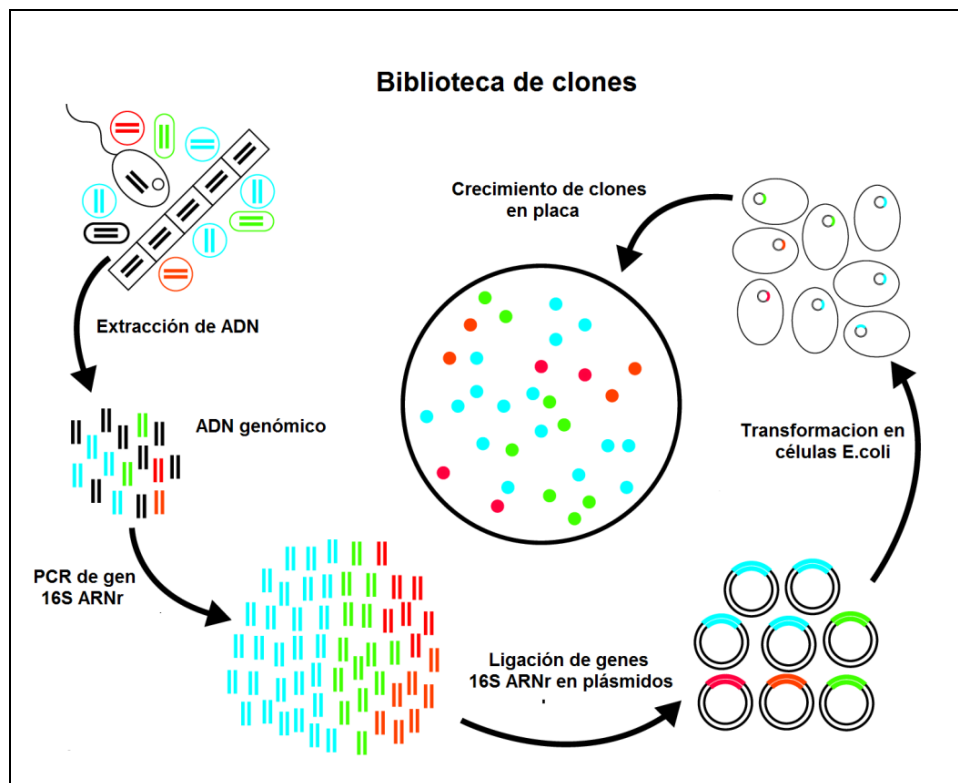
#### **1.5.3.2 Clonación y secuenciación de ADN de muestras ambientales**

Uno de los métodos moleculares más utilizados en estudios sobre la diversidad biológica de comunidades naturales es la clonación y secuenciación tradicional vía *Sanger* (o de primera generación) del gen ARNr 16S [133]. En términos generales, ésta técnica implica la extracción del ADN, la amplificación del gen ARNr 16S usando cebadores universales, la inserción de los amplicones en plásmidos, la posterior transformación de *E. coli* con los plásmidos recombinados y finalmente la secuenciación de los clones obtenidos (Figura 6). Los datos de secuencias pueden ser utilizados para la asignación taxonómica y establecimiento de relaciones filogenéticas.

Es una metodología relativamente simple y que requiere poco equipamiento, sin embargo, la desventaja principal reside en la limitación para examinar un número significativo de clones que representen la diversidad de las muestras ambientales. Se estima que para obtener una representación adecuada de la

diversidad presente en una muestra ambiental se deben realizar más de 10.000 reacciones de secuenciación independientes, lo que es equivalente a analizar más de 10.000 clones [134]. La necesidad de una metodología más rápida y económica, de alto rendimiento y altamente confiable ha impulsado el desarrollo de tecnologías de secuenciación masivas, denominadas segunda generación.

La característica principal de las tecnologías de segunda generación, dentro de las cuales encontramos a la pirosecuenciación, es su capacidad de generar millones de secuencias representativas de una comunidad microbiana sin la necesidad de establecer bibliotecas de clones. La aplicación de estas tecnologías ha permitido lograr un mejor entendimiento acerca de las propiedades estructurales y funcionales de las comunidades microbianas en diversos ambientes [108], [134], [135].



**Figura 6. Construcción de una biblioteca de clones.** Representación esquemática de las etapas implicadas en la construcción de clones a partir del ADN extraído de una muestra ambiental. Fuente: <http://img.docstoccdn.com/thumb/orig/86901294.png>

### **1.5.3.3. Tecnología de pirosecuenciación aplicada al estudio de la diversidad microbiana**

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN basado en la monitorización en tiempo real de la síntesis de ADN. Se basa en la detección de la señal luminosa generada por una reacción quimioluminiscente, en la cual es utilizado como sustrato el pirofosfato que se libera como resultado de la incorporación de un nucleótido a la cadena de ADN naciente. El primer equipo de secuenciación basado en esta tecnología fue el 454 GS FLX, comercializado por Roche. Esta plataforma de secuenciación puede generar hasta 1,3 millones de secuencias de un largo promedio de 400-600 pb en cada corrida de secuenciación, comparado con las 96 secuencias de una placa completa en el sistema de secuenciación *Sanger*. Por otro lado, mediante el uso del etiquetado (MID, del inglés *multiplex identifier*) de las muestras de ADN es posible secuenciar en pool múltiples muestras [136].

Para el análisis de las comunidades microbianas se han utilizado dos enfoques de secuenciación de alto rendimiento, la secuenciación en gran escala de un fragmento de gen (*amplicon sequencing*) y la secuenciación masiva al azar (*whole shotgun sequencing*).

La secuenciación mediante *amplicon sequencing*, enfoque utilizado en el presente trabajo, es un método simple pero que puede ser muy poderoso para ciertas aplicaciones. Se basa en la amplificación por PCR de un gen o secuencia de interés a partir de una muestra de ADN. Para ello se deben diseñar previamente oligonucleótidos (cebadores) degenerados a partir de regiones conservadas del gen que sean comunes a todos los organismos que se pretende analizar. El uso de esta técnica permite determinar la composición taxonómica de una comunidad microbiana. Además, el hecho de que todas las secuencias correspondan a exactamente la misma región de un gen permite que las secuencias sean alineadas entre sí. Esto a su vez puede ser utilizado para agrupar las secuencias por similitud e incluso realizar análisis filogenéticos. Finalmente, y sin la necesidad de darle una anotación a las secuencias, se pueden realizar análisis de ecología microbiana para evaluar las comunidades a nivel de propiedades intrínsecas como riqueza y diversidad (alfa diversidad) y comparaciones entre diferentes comunidades (beta diversidad). El gen más utilizado con este fin suele ser el de la subunidad

pequeña de ARN ribosomal, que en el caso de los organismos procariontes se denomina 16S rRNA. Este gen se encuentra conservado en todos los organismos vivos y debido a su tasa de mutación relativamente constante entre linajes puede ser utilizado como un indicador taxonómico y filogenético bastante robusto [135]–[138]. Para el estudio de procesos específicos encontramos otros biomarcadores funcionales como *nifH* que es ampliamente utilizado para el estudio de la fijación biológica de N<sub>2</sub> [122], [139].

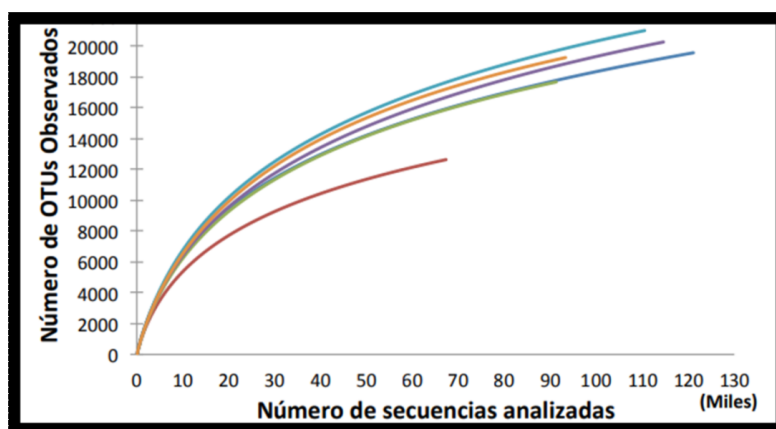
#### **1.5.3.4. Ecología de comunidades: el estudio de la biodiversidad**

La biodiversidad de un ambiente se estudia en el marco de la ecología de comunidades. Por definición una comunidad es el conjunto de especies que coexisten en un determinado lugar y tiempo [140]. Definir especies entre microorganismos no es tarea sencilla [141], por ello el análisis de comunidades microbianas hablaremos de unidades taxonómicas operativas (OTUs, en inglés *Operational taxonomic units*) [142].

Los análisis de comunidades microbianas suelen utilizar enfoques propios del campo de la ecología de comunidades. El objetivo que persigue este tipo de estudios es caracterizar la diversidad de las comunidades mediante el análisis de *alfa* diversidad determinando parámetros intrínsecos de una única comunidad como por ejemplo, la riqueza (Chao-1, cantidad OTUs), equitatividad (evalúa la distribución de la abundancias relativas de los OTUs encontrados) y la diversidad tiene en cuenta los dos anteriores, es decir, la cantidad de especies y como están distribuidas, siendo el estimador más popular el índice Shannon (H') [143]. Para que los valores de los índices de alfa diversidad sean comparables entre muestras, es necesario que el esfuerzo de muestreo (en este caso, la cantidad de secuencias generada o analizada) haya sido similar para cada una de las muestras. Una forma de visualizar los resultados de alfa diversidad, suelen utilizarse las curvas de rarefacción. Las mismas se construyen a partir de determinar el valor que adopta una determinada métrica ecológica a diferentes esfuerzos de muestreo o cantidad de secuencias (Figura 7). Este tipo de curvas de acumulación muestran un crecimiento exponencial al principio y tienden finalmente a un valor asintótico, el cual se alcanza cuando la diversidad de una comunidad ha sido completamente muestreada. Se considera que aun cuando el esfuerzo de



muestreo total haya sido desparejo entre diferentes muestras, las curvas de rarefacción pueden ser comparables considerando el punto en el cual exista suficiente cantidad de secuencias de cada muestra en la comparación.



**Figura 7:** Curvas de Rarefacción de la riqueza (cantidad de OTUs observados) alfa de la diversidad en una comunidad microbiana.

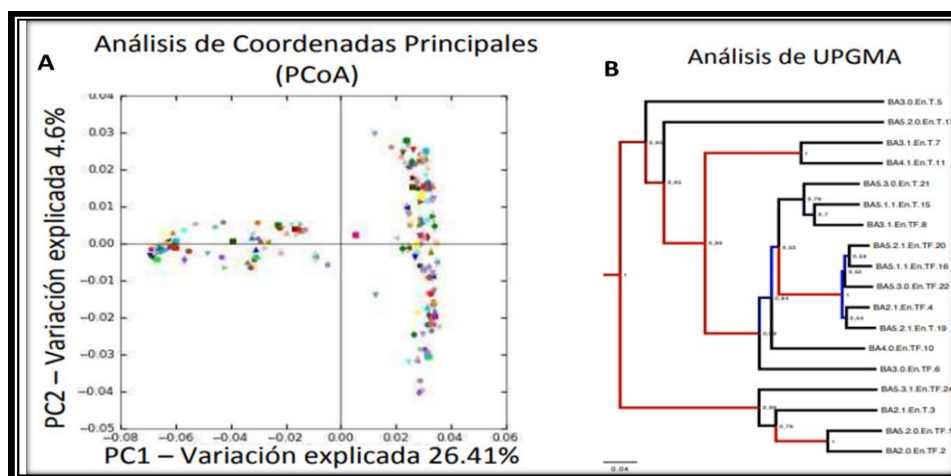
Una vez construidas las matrices de distancias, los datos pueden ser visualizados mediante diferentes métodos. Los más utilizados en ecología microbiana son el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de coordenadas principales (PCoA) y el análisis de conglomerados UPGMA.

Los dos primeros métodos de análisis multivariados permiten ordenar las muestras en un espacio multidimensional (del cual se suelen graficar únicamente las dimensiones que explican mayor parte de la variabilidad entre muestras). El análisis de PCA sólo permite graficar las distancias euclidianas entre muestras mientras que el PCoA puede ser utilizado para cualquier distancia ecológica (Figura 8-A). El método de UPGMA permite construir clusterizaciones jerárquicas entre muestras en base a las similitudes entre muestras apareadas. En base a esta clusterización se pueden construir dendrogramas que reflejan la relación entre muestras (Figura 8-B).

### **1.6 Respuesta a la inoculación con PGPR en ensayos a campo**

En la actualidad, persiste una considerable brecha entre los rendimientos obtenidos a campo y los alcanzados cuando se optimiza el sistema productivo, debido a diversos factores relacionados con la nutrición, manejo y protección del cultivo. Los tratamientos de las semillas con PGPR permiten cerrar una fracción de esta brecha productiva, siendo una de las herramientas con mayor

potencialidad para incrementar la producción de cultivos de importancia agronómica [144].



**Figura 8: Métodos de visualización de distancias entre muestras calculadas mediante métodos beta diversidad.** En el panel **A** se presenta un análisis multivariado de coordenadas principales (PCoA) y el panel **B** análisis de clusterización jerárquica de UPGMA.

El productor y asesor agronómico percibe a la tecnología como amigable, sustentable, inocua, pero con frecuencia duda sobre la magnitud y estabilidad de respuesta. La cuantificación y difusión de la información al respecto es un objetivo de aquellos que desean validar esta tecnología.

Uno de los desafíos en la aplicación de insumos biológicos es la selección de microorganismos con aportes validados a la producción de cultivos, con posibilidades de multiplicación en escala industrial y con una aplicación extensiva a diversos cultivos. Un número considerable de ensayos en distintos ambientes muestran que el uso de inoculantes provoca un incremento significativo de los rendimientos en laboratorio, pero cuando se desafían las bacterias PGPR a campo existe una gran variabilidad de la respuesta en ensayos. Algunos autores atribuyen estos resultados a las fuentes de variabilidad inherentes a las diversas características del ambiente, edáficas y del cultivo, así como también a las características propias del inoculante como son la competitividad y estado fisiológico de las células bacterianas, la formulación y su concentración. Perin *et al* (2006) [114] afirma que las respuestas obtenidas están condicionadas al cumplimiento de requisitos que debe cumplir un inoculante bacteriano, condiciones de propagación, producción de inoculante y la calidad del producto terminado.

Existen numerosos géneros bacterianos que muestran potencialidad para su uso como inoculantes para ser aplicados en semillas, no obstante los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas* son los inoculantes bacterianos más usados y aceptados [103]. *Azospirillum* es el PGPR más estudiado en gramíneas, reportándose las primeras experiencias hace más de treinta años [145].

La inoculación de leguminosas con rizobios específicos conduce en muchos casos a prescindir de la fertilización nitrogenada debido a la simbiosis mutualista entre ambos organismos, éste no es el caso de los inoculantes a base de PGPR aplicados como biofertilizantes. Existe una gran cantidad de estudios de inoculación PGPR bajo diferentes condiciones, sin fertilización de N o P, disminuyendo las dosis de los mismos o dejando la dosis recomendada, encontrándose diferentes respuestas según el microorganismo, el cultivo y las condiciones edafoclimáticas, pero que confluyen en que se puede lograr una práctica consistente en la disminución de la cantidad de fertilizantes pero no en un reemplazo [146], [147].

En la inoculación con *Azospirillum brasilense* ciertos ensayos indican que existe respuesta a la inoculación cuando el ambiente presenta limitaciones nutricionales [148], [149]; mientras que otros muestran que los aumentos en los rendimientos fueron más consistentes en ambientes con mejores condiciones de fertilidad [150], [151]. Creus (2016) sostiene que a pesar de ciertas inconsistencias observadas, los datos indican que en un 60-70% de los casos la inoculación con *Azospirillum* es exitosa produciendo un aumento del rendimiento que varía entre 5 y 35%, y que puede ser aún mayor en caso de suelos sin historia agrícola utilizando las buenas prácticas agrícolas o bajo estrés abiótico [152]. El meta análisis de los trabajos publicados en el período 1981-2009 acerca de la interacción *Azospirillum*-trigo indica que el rendimiento mostró un incremento medio de 9% y la materia seca aérea del 18%, y que estos valores fueron afectados positivamente en prácticas sin fertilización nitrogenada [153]. En el caso de la inoculación de trigo con *Pseudomonas*, los resultados más consistentes se encontraron cuando la inoculación fue acompañada con fertilización nitrogenada y fosforada, alcanzando incrementos en el rendimiento de hasta 8,4% en promedio. Por lo tanto, puede decirse que en los casos reportados hasta el momento en nuestro país se observó que la

inoculación de trigo con PGPR incrementó el rendimiento de los cultivos y que la respuesta de la inoculación a la fertilización fue variable [154].

En resumen, la inoculación es una tecnología de bajo costo que contribuye a mantener la productividad de los suelos en el marco de una agricultura sustentable. No obstante, la ausencia de PGPRs ubicuas y cosmopolitas que se pueda utilizar como inoculante para todo cultivo de importancia agrícola, refleja la complejidad de las interacciones y de los intercambios de señales moleculares que tienen lugar en los ecosistemas suelo-planta-organismo [155]. En los diferentes ambientes y para cada cultivo en particular, es necesario generar un mayor conocimiento de las interacciones planta-microorganismos, así como la implementación de prácticas de manejo que las potencien.

### **Objetivos**

- ✓ Caracterizar las cepas bacterianas *Enterobacter* sp. 2.14 y E. sp. 2.24 en su capacidad de colonización y promoción del crecimiento vegetativo en cultivos de interés agronómico.
- ✓ Evaluar los efectos de la fertilización química e inoculación con bacterias PGPR en la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de tomate y trigo aplicando técnicas metagenómicas.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar la capacidad de las cepas E.sp. 2.14 y E.sp. 1.24 para expresar funciones benéficas para la planta y características de la rizocompetencia.
- ✓ Caracterizar la asociación de las cepas. E. sp. 2.14, E. sp. 1.24 con trigo-tomate y evaluar la sobrevivencia de las cepas en diferentes suelos.
- Evaluar en ambiente controlado y a campo, el efecto de promoción de crecimiento de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en tomate, alfalfa, trigo, maíz y soja.

- Evaluar mediante técnicas metagenómicas, los efectos de la inoculación con bacterias PGPR en la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en plantas de trigo.
- Evaluar los efectos de la fertilización química en la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de tomate, aplicando técnicas metagenómicas.

# **CAPÍTULO II**

## **Material Y Métodos**

## 2.1 Cepas bacterianas, plásmidos y mutantes utilizados.

Las cepas bacterianas, plásmidos y mutantes utilizados en los ensayos de colonización y supervivencia en suelos se describen en la Tabla 1. Las cepas *Enterobacter sp.1.24* y *E.sp.2.14* fueron aisladas de rizosfera y raíz, respectivamente, de cultivos de yerba localizados en el nordeste de Argentina [46]. Las cepas salvajes y sus derivadas marcadas (cepa *E.sp.2.14-GFP*, *E.sp.2.14-GUS*, *E.sp.1.24-GFP* y *E.sp.1.24-GUS*) con proteína fluorescente (*GFP*) y la proteína  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*) fueron conservadas a -80 °C en medio LB con glicerol 20%.

**Tabla 1.** Descripción de cepas utilizadas para los ensayos de localización in situ.

| Cepa / plásmido         | descripción   | referencia |
|-------------------------|---|------------|
| E. sp E. sp. 1.24       | Cepa aislada de rizosfera de yerba mate. Asignación filogenética por ARNr 16s a <i>Enterobacter sp.</i> | [46]       |
| E. sp. 2.14             | Cepa aislada de raíz de yerba mate. Asignación filogenética por ARNr 16s a <i>Enterobacter sp.</i>      | [46]       |
| E. sp. 2.14-M           | Mutante resistente a rifampicina (Rif <sup>+</sup> )  | [156]      |
| E. sp. 1.24             | Mutante Rif <sup>+</sup>  | [156]      |
| E. coli DH5 $\alpha$    | <i>recA</i> , <i>lacU169</i> , F80d <i>lac ZDM15</i>  | [157]      |
| E. sp. 1.24- <i>GFP</i> | Cepa E. sp. 2.14 con pFAJ1708: <i>GFP</i> marcado y Tc <sup>r</sup>                                     | Esta tesis |
| E. sp. 2.14- <i>GFP</i> | Cepas E. sp. 1.24 con pFAJ1708: <i>GFP</i> marcado y Tc <sup>r</sup>                                    | Esta tesis |
| E. sp. 1.24- <i>GUS</i> | Cepas E. sp. 1.24 con pFAJ1708: <i>GUS</i> marcado y Tc <sup>r</sup>                                    | Esta tesis |
| E. sp. 2.14- <i>GUS</i> | Cepas E. sp. 2.14 con pFAJ1708: <i>GUS</i> marcado y Tc <sup>r</sup>                                    | Esta tesis |
| pFAJ1708: <i>GFP</i>    | derivado pFA J1708 contiene un promotor fusiona a él gen <i>GFP</i> , <i>GUS</i> y Tc <sup>r</sup>      | [158]      |

Tc<sup>r</sup>: Resistencia a tetraciclina (Tc); Rif<sup>+</sup>: resistente a rifampicina (Rif)

### 2.1.1 Variedades de plantas usadas para los ensayos.

Los cultivares utilizados en los diferentes ensayos realizados en la investigación se encuentran descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Cultivares utilizados en los diferentes ensayos

| Cultivar | Variedad/<br>Hibrido | ensayo  |
|----------|----------------------|---|
| Tomate   | H-Elpida             | RFLP- <i>nifH</i>   |
| Tomate   | H-Elpida             | pirosecuencia- <i>nifH</i>  |
| Trigo    | V-Klein Yarará       | RFLP- <i>nifH</i>   |
| Trigo    | V-Klein Yarará       | pirosecuencia- <i>nifH</i>  |
| Tomate   | V-Platense           | Promoción de crecimiento cámara plantas con cepas E. sp. 2.14-E. sp. 1.24                         |
| Tomate   | V-Platense           | Localización In vivo de cepas E. sp. 2.14-GFP, E. sp. 1.24-GUS, E. sp. 1.24-GFP y E. sp. 1.24-GUS |
| Trigo    | V-Klein Yarará       | Promoción de crecimiento cámara plantas con cepas E. sp. 2.14-E. sp. 1.24                         |
| Trigo    | V-Klein Yarará       | Localización In vivo de cepas E. sp. 2.14-GFP, E. sp. 1.24-GUS, E. sp. 1.24-GFP y E. sp. 1.24-GUS |
| Trigo    | V-Klein Yarará       | Promoción de crecimiento a campo con cepas E. sp. 2.14-E. sp. 1.24                                |
| Alfalfa  | V-Supermonarca       | Promoción de crecimiento cámara plantas con cepas E. sp. 2.14-E. sp. 1.24                         |
| Soja     | V-DM 4612            | Promoción de crecimiento a campo con cepas E. sp. 2.14-E. sp. 1.24                                |
| Maíz     | H-DK 747 VT 3P       | Promoción de crecimiento a campo con cepas E. sp. 2.14-E. sp. 1.24                                |

V: variedad H: híbrido

## 2.2 Ensayos en campo

### 2.2.1 Características del sitio experimental y época de siembra

Con el propósito de evaluar la inoculación de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.2.24 en cultivos de trigo, soja y Maíz y determinar los efectos en el rendimiento de grano por hectárea (kg/ha) y parámetros fisiológicos, se realizaron ensayos en campos de la localidad de Ferré (Escuelas Agrotécnica salesiana), Junín (campo experimental las Alisias) y en la localidad de Pergamino (campo experimental Rizobacter S.A), entre los años 2012 a 2017.



Los suelos de la estación experimental Rizobacter S.A (Pergamino) y escuela Agrotécnica salesiana (Ferré) se caracterizan por su aspecto oscuro, muy profundo y bien drenado, formado sobre sedimentos loésicos franco limosos gruesos. Se encuentra en un paisaje de lomas y pendientes (con gradiente de 0 a 1 %) de la Región Pampa Ondulada. Se clasifican como Argiudol Típico, Fina, illítica, térmico [159], [160]. Los suelos de la estación experimental Alisias (Junín) se caracterizan por ser profundos y oscuros, se encuentran en un paisaje ondulado, ocupando los sitios de lomas de la Subregión Pampa Arenosa, son suelos bien a algo excesivamente drenados, relativamente jóvenes con escaso desarrollo, habiendo evolucionado sobre un sedimento eólico franco arenoso, no alcalino, no salino con pendiente predominante de 0-1 % (hasta 3 % en pendientes muy cortas). Se clasifican como Hapludol Típico, Limosa gruesa; mixta, térmica [159], [160]. Las variedades que se utilizaron para estos ensayos se encuentran descritas en la Tabla 2 y la distribución para cada campaña de siembra en las diferentes localidades se presentan la Tabla 3 se presenta.

**Tabla 3.** Distribución de las campañas realizadas en trigo, soja y maíz.

| Localidad | Ensayo trigo |       |           | Ensayos soja |       |           | Ensayos maíz |       |           |
|-----------|--------------|-------|-----------|--------------|-------|-----------|--------------|-------|-----------|
|           | Ferré        | Junín | Pergamino | Ferré        | Junín | Pergamino | Ferré        | Junín | Pergamino |
| 2012/2013 | X            |       |           |              |       |           | X            |       |           |
| 2013/2014 | X            | X     | X         | X            | X     |           | X            | X     |           |
| 2014/2015 | X            | X     |           | X            | X     | X         | X            | X     |           |
| 2015/2016 | X            |       | X         | X            | X     |           | X            |       | X         |
| 2016/2017 |              | X     | X         | X            | X     |           |              | X     | X         |

### **2.2.2 Diseño experimental**

El diseño experimental que se utilizó en los ensayos fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. El ensayo de soja está compuesto por 8 tratamientos (Tabla 4) y los ensayos de trigo, maíz están compuestos de 5 tratamientos (Tabla 4).

Los datos obtenidos de las diferentes evaluaciones de cada año fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con el software Infostat versión 2014, sus medias se contrastaron con el test de Tukey utilizando una insignificancia del 1% ( $P \leq 0,01$ )

**Tabla 4.** Tratamientos utilizados para los ensayos en campo de inoculación de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en soja y trigo.

| Soja                            | Trigo                   | Maíz                    |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control                         | Control                 | Control                 |
| <b>Inoculación:</b>             |                         |                         |
| E. sp. 2.14                     | E. sp. 2.14             | E. sp. 2.14             |
| E. sp. 1.24                     | E. sp. 1.24             | E. sp. 1.24             |
| E. sp. 2.14-E. sp. 1.24         | E. sp. 2.14-E. sp. 1.24 | E. sp. 2.14-E. sp. 1.24 |
| E. sp. 2.14-Rizoliq             | Rizofos**               | Rizofos**               |
| E. sp. 1.24-Rizoliq             |                         |                         |
| E. sp. 2.14-E. sp. 1.24-Rizoliq |                         |                         |
| Rizoliq*                        |                         |                         |

\* Rizoliq es un inoculantes comercial en base de una cepa *Bradyrhizobium sp.*

\*\* Rizofos es un inoculantes comercial en base cepa *Pseudomonas fluorescens*

### **2.2.3 Preparación del suelo para la siembra, densidad de siembra y fertilización**

Se utilizó el sistema de siembra directa. La dimensión de las parcelas de los ensayos de soja fueron 6m<sup>2</sup> en hileras separadas a 52cm, la densidad de siembra fue de 22 semillas por metro. Las parcelas de trigo tienen dimensiones de 6m<sup>2</sup> en hileras separadas por 21 cm y una densidad de siembra de 90 semillas por metro y parcelas utilizadas para los ensayos de maíz fueron idénticas a las utilizadas en soja a excepción de la densidad de siembra que fue de 5 semillas por metro.

### **2.2.4 Fertilización**

Los ensayos de trigo se fertilizaron al momento de la siembra con 60 kg/ ha de la mezcla química P-38% y S-8%, mientras que para soja se aplicó fertilizante en la línea de siembra con 80kg/ha de Sausor que tiene una mezcla de P-13%, S-6% y Ca-16% y en maíz se fertilizó con 90 kg/ha de fosfato diamónico (DAP) sobre la línea de siembra y está compuesto con 18 % de Nitrógeno y 46% de Fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) además, se agregó 150 kg/ha de urea al voleo.

### **2.2.5 Concentración del inóculo y momento de aplicación.**

La preparación de los inóculos de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 se hicieron en medio TSA-líquido con agitación continua durante 24 hs a 28 °C, en el laboratorio R4 del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)

hasta fase exponencial tardía, posteriormente fueron transportados empresa RIZOBACTER S.A que se encuentra ubicada en la localidad de pergamino. Los inóculos fueron utilizados dentro de los 5 días posteriores a su preparación. Las semillas utilizadas para los ensayos se encontraban libres de curasemillas (fungicidas) a excepción de las semillas de maíz (Acceleron). Los tratamientos correspondientes a la inoculación de las cepas E. sp. 2.14, E. sp. 1.24, Rizofos y Rizoliq se inocularon en concentración aproximadamente de  $1 \times 10^8$  UFC/ml con dosis de 1000 mL / 100Kg de semilla y los tratamientos control se regaron con agua.

Posteriormente a la inoculación las semillas fueron sembradas a campo con la maquina Baumer neumática. Cabe aclarar que la inoculación de las semillas se realiza 1 hora antes de la siembra de las semillas para evitar pérdidas de viabilidad de las cepas.

### **2.2.6 Variables evaluadas**

Soja fueron: kilogramos de grano por hectárea, número de plantas por metro líneas, número de nódulos corona, número nódulos raíz principal, número nódulos raíz secundaria, número nódulos total, peso seco de nódulos corona, peso seco de nódulos raíz principal, peso seco de nódulos raíz secundaria y peso seco de nódulos total

Trigo se determinaron: kilogramos de granos por hectárea, número de plantas por metro cuadrado, número de espigas por metro cuadrado, número de macollo por metro cuadrado, peso fresco de los macollos, peso seco de los macollos, peso fresco de espiga y peso seco de la espiga.

Maíz se evaluó: kilogramos de granos por hectárea, número de plantas, número espigas, peso fresco parte aérea, peso fresco parte radicular, peso seco radicular y peso seco parte aéreo. Los cultivos antecesores del ensayo de soja fue maíz, en trigo cultivo antecesor fue soja y en los ensayos de soja su cultivo antes fue trigo.

Las metodología para determinar carbono organico oxidable, nitrogeno total, fosforo extraible, pH y nitratos de los análisis de suelo se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Metodologías utilizadas por el laboratorio para los análisis de suelos de ensayos a campo

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Carbono org. oxidable               | Determinación de carbono orgánico oxidable por mezcla oxidante fuerte, escala semi-micro. <b>IRAM-SAGyP 29571-2</b> |
| Nitrógeno total                     | Determinación de nitrógeno en suelo por el método Kjeldahl modificado, escala semi-micro. <b>IRAM-SAGyP 29572-1</b> |
| Fósforo extraíble                   | Método Bray Kurtz 1 modificado. (Extractante: FNH4 0,03 N + HC 0,025 N)- <b>IRAM-SAGyP 29570-1</b>                  |
| pH 1:2,5 (agua)                     | Determinación de pH- <b>IRAM-SAGyP 29574</b>  |
| Nitratos (a partir de muestra seca) | Determinación de nitratos por el método del ácido fenol disulfónico   |

### **2.3 Ensayos de pirosecuenciación del gen *nifH***

Estos ensayos se realizaron con el fin de analizar la estructura de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de plantas de tomate y trigo, y el efecto sobre la misma de los siguientes factores: la fertilización química, la inoculación de bacterias PGPRs, el sitio de cultivo y el estado fenológico de la planta. A continuación, se describen los ensayos de tomate y trigo.

#### **2.3.1 Descripción de ensayo con plantas de tomate y tiempos de muestreo**

El ensayo se llevó a cabo con plantines de tomate (**Híbrido Elpida**) provistos por la profesora Susana Martínez (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP). Las plantas se crecieron bajo el sistema de agricultura protegida para lo cual se utilizó el invernáculo de la Estación Experimental Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata, situada al oeste del casco urbano de la ciudad de la Plata. Los suelos de la estación experimental se clasifican en Argiudol típico, están ubicados en posición de loma con un drenaje moderadamente bien drenado. Su textura es franco limoso a franca en el horizonte A y arcillosa en el B corresponde a los suelos de la denominada Serie Bombeador [161].

El ensayo comprendió los siguientes tratamientos:

- **Plantas control (sin fertilización)** Las plantas control fueron regadas con agua, utilizando el sistema de riego por goteo (Figura 9).

- **Plantas fertilizadas:** fertilización se realizó con solución nutritiva (N 150ppm, P 80ppm, K 80ppm y elementos menores) y se fertilizaron por el sistema de riego por goteo (Figura 9), con una frecuencia 6 días, hasta el término del ensayo. En el transcurso de cultivo se realizaron los siguientes muestreos, los cuales abarcaron desde la etapa de plantin hasta la senescencia del cultivo:

1°. Etapa de plantin antes de su implantación en suelo.

2°. A los 60 días desde la implantación en suelo correspondientes a la etapa fenología de floracion.

3°. A los 90 días de la implantación del suelo correspondiente a la etapa fenologiacca de senecencias.

Los tratamientos fueron nombrados con las siguientes abreviaturas:

-Primer muestreo etapa de plantin antes de la implantación a suelo replica 1(1-ant\_1), y replica 2 (2-ant\_1). Cabe aclarar que en esta etapa los plantines se encuentran sin fertilización química

-Segundo muestreo a los 60 días dela implantación en suelo: control replica 1 (1-cont\_2,) replica 2 (2-cont\_2), tratamiento con fertilización de mismo muestreo replica 1(1-fert\_2), replica 2 (2-fert\_2)

-Tercer muestreo a los 90 días de la implantación: control replica 1 (1-cont\_3), replica 2 2-cont\_3, tratamiento con fertilización replica 1 (1-fert\_3) y replica 2 (2-fert\_3).

En cada muestreo se tomaron 6 plantas por tratamiento, las plantas fueron procesadas en conjunto (en pool). Posteriormente se llevaron a laboratorio donde fueron procesadas inmediatamente. Se cortó el material en pequeños trozos, para una mejor manipulación, y luego se procedió a la desinfección superficial y extracción del ADN total, como se explica en siguientes secciones.

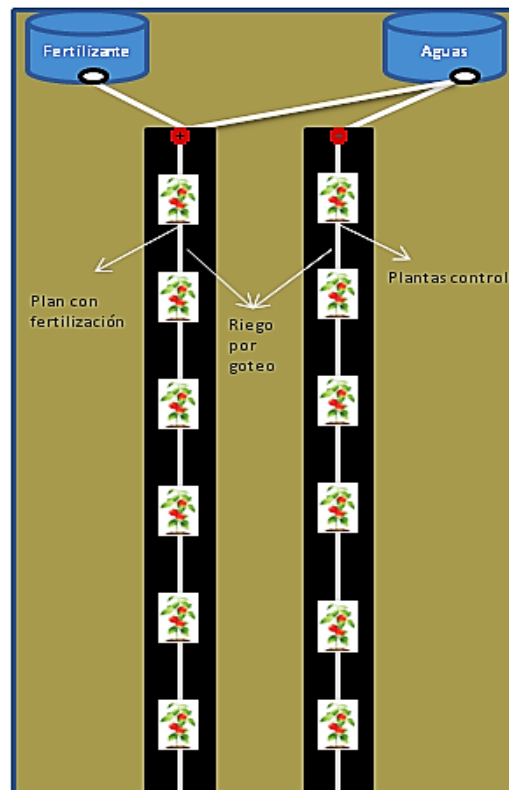


Figura 9: Esquemática del ensayo de tomate en condiciones de invernadero.

### 2.3.2 Descripción de ensayo en plantas de trigo

Los ensayos se llevaron a cabo en las localidades de Ferré (escuela Agrotécnica Salesiana) y Junín (campo experimental las Alisias) de la provincia de Buenos Aires, estas muestras provienen del ensayo a campo que se realizó en campaña de siembra 2013-2014, y consistió en los siguientes tratamientos:

- Tratamiento control (plantas sin inocular)
- Tratamientos con co-inoculación de las cepas E. sp. 2.14+E. sp. 1.24.

Para facilitar el nombramiento de los tratamientos en la dos localidades se utilizó la siguiente abreviatura: localidad Ferré control (FC), tratamiento con co-inoculación cepas (FI\_co), localidad de Junín control (JC) y tratamiento con co-inoculación de las cepas (JI\_co). En el transcurso del cultivo se realizó un único muestreo, correspondiente a la etapa fenológica llenado de grano a los 120 días posterior a la siembra. Se tomaron 8 plantas por tratamiento las cuales fueron procesadas en conjuntas (en pool) en una única muestra por tratamiento. Las plantas posteriormente al muestreo fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su desinfección superficial y extracción de ADN total.

## **2.4 Métodos Moleculares**

### **2.4.1. Desinfección superficial de tejidos de tomate y trigo**

Las plantas de tomate y trigo fueron desinfectadas con el siguiente protocolo el cual es una adaptación de protocolos descritos en la literatura [122], [162], [163]:

Primeramente, las muestras de tallo y raíz fueron lavadas con agua de la canilla con el fin de eliminar partículas del suelo adheridas a las raíces y partes de los tallos. Luego del lavado los tejidos fueron sumergidos en una solución de SDS al 0,2%, y agitación a una velocidad de 200 rpm por 15 minutos, para favorecer la separación de partículas pequeñas que no se eliminaron anteriormente. Las muestras fueron enjuagadas tres veces con abundante agua destilada estéril y agitación (200rpm) por 15 minutos.

Posteriormente, el material vegetal fue transferido a erlenmeyers estériles que contenían una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Los erlenmeyers se colocaron en agitación (200 rpm) por 15 minutos. Posteriormente se eliminó la solución de hipoclorito de sodio, y se lavaron los tejidos con agua destilada estéril. Los tejidos se colocaron en nuevos erlenmeyer con alcohol al 70% y en agitación (200rpm) por 15 minutos. Se descartó el alcohol y las muestras fueron lavadas cuatro veces con abundante agua destilada estéril.

### **2.4.2 Evaluación de la eficiencia de la desinfección de los tejidos**

La eficiencia del protocolo de desinfección aplicado se evaluó mediante el siguiente procedimiento: Se tomaron alícuotas del último lavado, así como cinco trozos de cada tejido, raíz y tallo los cuales fueron sembrados en medio TSA e incubados a 28°C por 48 horas. Se consideró que el tejidos tienen una buena eficiencia de esterilización cuando no se observó crecimientos de bacterias en los tejidos y las alícuotas del ultimo lavado que se encontraban incubadas posteríos a las 48 horas (Figura 10).

Una vez evaluada la eficiencia de esterilización, los tejidos fueron pulverizados en un mortero con nitrógeno líquido, y se conservaron a -80°C.



**Figura 10. Evaluación de eficiencia de esterilización de tejidos superficiales de tomate y trigo.** En **A** y **B** tallo y raíz respetivamente incubadas en medio TSA a 28°C por 48 horas con tejidos de trigo. En **C** y **D** idéntico a A y B con tomate. Las fotografías fueron tomadas pasada las 48 horas de incubación.

### **2.4.3 Extracción de ADN de tejidos de tomate y trigo**

La extracción de ADN de plantas de tomate se realizó utilizando el protocolo descrito por Murray y Thompson (1980) [164] con modificaciones.

Se pesó 0.8 gr de tejido vegetal, el cual fue llevado a tubos falcón de 50ml, seguidamente se agregó 8 ml de solución de extracción (150 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 15 mM de EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl, 1% CTAB (peso/volumen) y 5% (volumen/ volumen) de  $\beta$ -mercaptoetanol) e incubó a 65°C en baño maría durante 30 minutos, se centrifugo a 7000 rpm, durante 15 minutos luego se transfirió la fase acuosa superior (sobrenadante) a un tubo falcón (50ml) además, se añadió medio volumen de fenol y se agito suavemente, posteriormente se centrifugo a 7000 rpm, durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió un nuevo tubo falcón (50ml) y se agregó medio volumen de fenol-cloroformo-alcohol-isoamilico, e incubo la mezcla con agitación (200 rpm), durante una hora, a temperatura ambiente, y se centrifugo a 7000 rpm, durante 20 min. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo falcón (15ml) y se incorporó unas solución 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2, frío



(-20°C) y 6/ 10 del volumen de isopropanol frío (-20°C), se incubó a -20°C durante 24 horas. Posterior a la incubación, se centrifugó a 12000 rpm, durante 30 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante teniendo cuidado de no perturbar el pellet de ADN que se forma al fondo del tubo. Luego se añadió 2 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 12000 rpm, durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Por último se agregó 200 µL de agua ultra pura (10µg/ml de RNAs) libre de DNAsas con la cual se resuspendió el pellet de ADN agitando suavemente y se conservó a -20°C.

Con respecto a los tejidos de trigo no se logró amplificar el gen *nifH* utilizando como molde el ADN extraído con el protocolo de Murray y Thompson, porque el arrastre de sustancias inhibitorias de la PCR. Por este motivo se utilizó como alternativa el kit comercial PURO Plant DNA (Embio-Tec) donde se introdujo dos modificaciones al protocolo del kit. Estas modificaciones consistieron en aumentar al doble del volumen la recomendación provista por el kit en las soluciones 1, 2 y 3 además, se agregó un paso en la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, con el fin de eliminar del ADN, las proteínas y sustancias orgánicas (taninos, ácidos húmicos y metabolitos secundarios de raíz) que inhiben las reacciones de PCR.

El ADN se eluyó en agua ultra pura y libre de DNAsas y se conservó a -20°C para su posterior utilización. La concentración de ADN de cada muestra se estimó utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (Tabla S 1)

#### **2.4.4 Extracción de ADN de las cepas bacterianas**

La extracción de ADN de las cepas bacterianas se realizó utilizando el método de resina (Chelex 100, Bio-Rad) descrito por Alippi y Aguilar (1998) [165]. Brevemente, se tomó de tres a cinco colonias aisladas recién crecidas las cuales fueron lavadas primeramente con 300 µl de NaCl 1M, se enjuagaron tres veces con 300 µl de agua bidestilada estéril y finalmente fueron resuspendidas en 150 µl de la suspensión acuosa (6% p/v) de resina (Chelex 100, BIO-RAD). La suspensión se incubó por 20 minutos a 56°C, por 8 minutos a 99°C y finalmente se conservó a 20 °C. Antes de usar como molde para la

amplificación se centrifugó 1 minuto para disponer de la muestra del sobrenadante.

## 2.5 Técnica molecular

### 2.5.1 Amplificación del gen *nifH*

Las reacciones de PCR se hicieron por triplicado y en forma independiente por cada replica y tratamiento.

La amplificación del gen *nifH* fue realizada utilizando el protocolo de PCR anidada descrito por Yeager *et al* (2004) [166]. Introdujimos una modificación menor que consistió en no diluir el producto de la primera amplificación para su uso como templado de la segunda PCR.

Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 6, los mismos amplifican un fragmento interno del gen *nifH* de 359 pares de bases (pb). Para la primera reacción de amplificación se utilizó el cebador directo 19F y el cebador reverso *nifH3* en una concentración final de 10  $\mu$ M. La mezcla de reacción en volumen final de 25  $\mu$ L fue: 200  $\mu$ M de dNTPs (Invitrogen), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.5% de DMSO (Dimetilsulfóxido) 1.25 U de Go Taq Polimerasa (Promega) y 20 ng de ADN metagenómico como molde.

**Tabla 6.** Secuencia de los cebadores *nifH* utilizados en la PCR anidada. Los 4 cebadores utilizados fueron degenerados (**Y**= C/T; **R**= A/G; **D**= A/G/T; **N**= A/C/G/T; **W**=A/T; y **I**= inosina).

|                 | secuencia               | Nombre        | Posición <sup>a</sup> | Deg. <sup>b</sup> | Ref. <sup>c</sup> |
|-----------------|-------------------------|---------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> | GCIWTYTAY GGI AAR GGIGG | 19F           | 19-38                 | 128               | [167]             |
| PCR             | ATR TTRTTNGCNGCRTA      | <i>nifH3</i>  | 494-478               | 128               | [168]             |
| 2 <sup>da</sup> | GAYCCNAAR GCNGACTC      | <i>nifH11</i> | 118-134               | 64                | [169]             |
| PCR             | ADWGCC ATCATY TCRCC     | <i>nifH22</i> | 460-476               | 24                | [169]             |

a. La posición relativa a *A. vinelandii nifH* (GenBank ACCN # M20568)

b. La degeneración se da como el número de oligonucleótidos que comprende el cebador

c. Referencias bibliográficas donde se describen los cebadores.

Para la segunda PCR, se utilizó el cebador directo *nifH11* y el cebador reverso *nifH22*. La composición y volumen de la mezcla de reacción fueron idénticos a la descrita anteriormente, excepto que contenía 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. En ambas reacciones de PCR se utilizaron parámetros de ciclados similares (Tabla 7),

excepto la temperatura de hibridación 55 °C y 32 ciclos de reacción en la segunda PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GenePro BIOER. El análisis del resultado de la PCR se efectuó en geles de agarosa 1% (p/v) preparados con buffer TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio. La electroforesis fue realizada aplicando 100 V durante 15 min (MiniRun GE-100) y luego los geles fueron visualizados en un transiluminador.

**Tabla 7.** PCR del gen *nifH*. Condiciones de ciclado utilizadas para amplificar un fragmento del gen *nifH*.

| <b>Condiciones de ciclado</b> |  |               |
|-------------------------------|--|---------------|
|                               | <b>Temperatura (°C)</b>                          | <b>Tiempo</b> |
| Desnaturalización inicial     | 95   | 5 min.        |
| Desnaturalización             | 95   | 45 seg.       |
| Hibridación                   | 48(1 <sup>ra</sup> PCR / 56(2 <sup>da</sup> PCR) | 1 min.        |
| Extensión                     | 72   | 1 min.        |
| Extensión final               | 72   | 10 min.       |

### **2.5.2 Purificación del pool *nifH*.**

Los fragmentos resultantes de la amplificación fueron sembrados para su purificación en un gel de agarosa del 1%, con un volumen de 80 µl de cada tratamiento y muestreo, cortando la banda correspondiente al tamaño *nifH* (359 pb). Posteriormente los tacos de agarosa que contienen los ácidos nucleicos se purificaron con el kit comercial Accuprep (BIONEER) y se eluyó en un volumen final de 30 µl.

### **2.5.3 Digestión del ADN-*nifH* con endonucleasas**

Para identificar polimorfismos en la secuencia de gen *nifH*, se realizaron digestiones con las endonucleasas MspI y HaeIII (con secuencia de reconocimiento de corte de 4 pb). El volumen de reacción fue de 20 µl conteniendo buffer 1X, endonucleasa MspI y HaeIII (Promega) 2.5U, BSA (Promega) 1X, 200 ng de ADN. La mezcla de reacción fue incubada a 37°C durante 12 horas.

### **2.5.4 visualización de los productos de restricción *nifH***

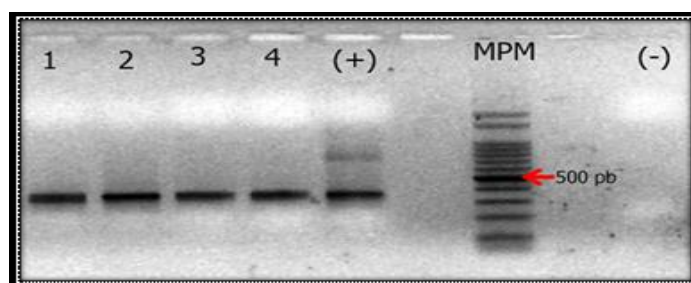
El producto de la mezclas de reacción fue sembrado en un gel de agarosa del 2% (p/v) preparados con buffer TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio. La electroforesis fue realizada aplicando 50 V durante 2 horas (MiniRun GE-100).

Posteriormente los geles fueron visualizados en un transiluminador y se tomó fotografías del gel con el equipo UVISAVE HD5 (Cambridge).

## **2.7 Preparación de biblioteca *nifH* de endófitos de tomate, trigo y pirosecuenciación**

### **2.7.1 Síntesis de Amplicones *nifH* para pirosecuenciación**

Con el propósito de aumentar la sensibilidad de detección de secuencias *nifH* de la comunidad endofítica y por experiencia previa en nuestro laboratorio se utilizó PCR anidada propuesta Yeager *et al* (2004) [166]. Brevemente, en la primera PCR se utilizó como molde 2  $\mu$ l de DNA de tejidos desinfectados y los cebadores utilizados en la primer PCR 19F [170] y *nifH3* [168]. En la segunda PCR se tomaron 2  $\mu$ l de la primera PCR y los cebadores utilizados *nifH11* y *nifH22*. Las condiciones de reacción y ciclado de las PCR fue idéntico a los descrito anteriormente. Para disminuir el posible sesgo que podría tener lugar en la PCR anidada, se realizaron por triplicado las amplificaciones de PCR para cada muestra y tratamiento. Después de la segunda PCR, los amplicones de las tres repeticiones de una misma muestra y tratamiento fueron combinados en un único pool de amplicones. La muestra de ADN-amplicones (80  $\mu$ l) fue sembrada en un gel de agarosa del 1% y se cortó las bandas correspondientes al fragmento *nifH* (359 pb). Los tacos de agarosa que contienen el fragmento *nifH* se purificó con el kit comercial NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) y el ADN se eluyó en un volumen final de 30  $\mu$ l (Figura 11) y se cuantificó en NanoDrop. Los amplicones fueron enviados a secuenciar por la tecnología GS FLX 454 en el laboratorio MR. DNA



**Figura 11. Análisis electroforético de DNA-*nifH* amplificado de muestras de trigo y tomate.** Las calles 1-2 son los productos de amplificación representativas del gen *nifH* de las muestras de trigo y las calle 3-4 idéntico a 1-2 con muestras de tomate. Se sembraron 5  $\mu$ l del producto del producto de reacción de PCR. (+) Indica el control positivo DNA de *Azospirillum vinelandii* (-) control negativo. La flecha señala la banda de 500pb del estándar de tamaño molecular (MPM) de 100pb (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

## **2.9 Análisis Bioinformáticos**

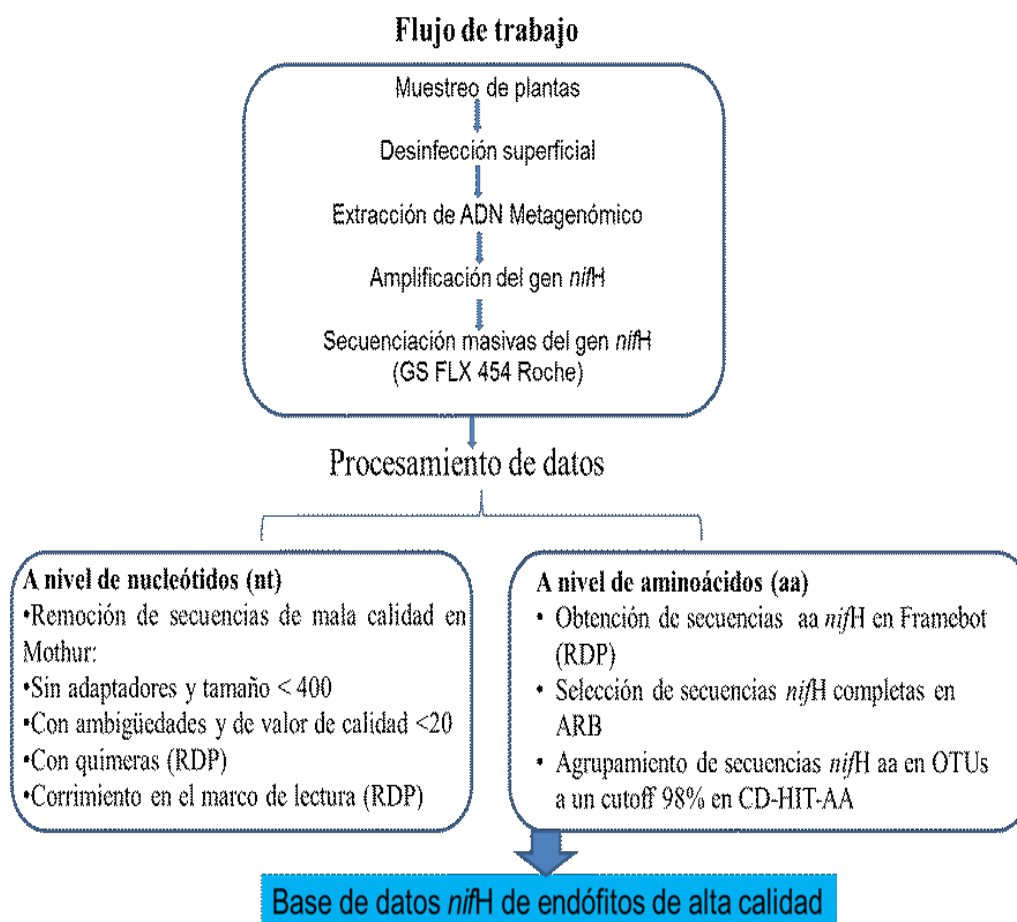
### **2.9.1 Análisis de perfiles RFLP-*nifH***

Las imágenes del gel fueron analizadas con el software PyElph [171]. El programa transforma las imágenes de los RFLP a matrices binarias, presencias 1 cuando hay banda producto de la digestión de las endonucleasas y ausencias 0 cuando no hay banda, estas matrices se realizan comprando diferentes muestras (Tabla S2 y S3). Las matrices son analizadas con el software Past el cual genera dendrograma de similitud con el test de Bray-Curtis.

### **2.9.2 Procesamiento y asignación taxonómica de las secuencias *nifH***

En el flujo de trabajo es una representación gráfica de las diferentes etapas que comprende desde el muestreo de las plantas hasta la obtención de una base de datos de secuencias *nifH* de endófitos de trigo y tomate de alta calidad (Figura 12).

El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando las herramientas de la plataforma Mothur [172]. Se eliminaron de la base de datos a las lecturas que no cumplieran con los siguientes criterios: - tamaño entre 300 y 400 pb; - diferencia en la secuencia (mismatch) del barcode; - más de dos mismatches en región de la secuencia correspondiente a los cebadores; - homopolímeros de más de 8 pb y - un promedio de calidad de lectura menor o igual a 25. Se utilizó la plataforma RDP (Ribosomal Database Project) para eliminar las secuencias que presentaron quimeras mediante el método UCHIME. Los corrimientos en los marcos de lectura (frameshift) fueron detectados con el programa Framebot (RDP) usando el perfil Hidden Markov Model (HMM) Fer4\_NifH\_fs.hmm como referencia [139][173]. Mediante este programa también obtuvimos las secuencias aminoacídicas de *nifH* que fueron agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTUs) usando el programa CD-HIT con un 98% de similitud a nivel de aminoácidos [174]. Se adoptó este umbral de semejanza, considerando el grado alto de similitud de secuencia a nivel de especie que generalmente presentan los genes codificadores de proteínas [175].



**Figura 12. Esquema del flujo de trabajo para la obtención de la base de datos de secuencias ADN-*nifH* a partir de ADN de tejidos desinfectados de trigo. Se muestran las principales etapas experimentales y del análisis bioinformática.**

Para reducir aún más los potenciales errores asociados a la pirosecuenciación, seleccionamos para los futuros análisis a aquellos OTUs con representación de al menos dos secuencias en la base de datos curada. La abundancia relativa de las secuencias de los OTUs se normalizó mediante el denominado método sub.sampling descrito en Mothur [176] previo a los análisis comparativos. Los OTUs compartidos y no compartidos entre los distintos tratamientos y se visualizaron con diagramas de Venn, construidos en el entorno Mothur [176]. Calculamos la distribución porcentual de la abundancia relativa de un determinado OTU como la relación entre el número de secuencias respecto al número total de secuencias en trigo fue de los 1911 OTUs y en tomate fue con los 1724 OTUs.

Se alinearon las secuencias representativas de cada OTUs utilizando como referencia el perfil Hidden Markov Model (HMM) Fer4\_NifH\_fs.hmm en el entorno ARB [142]. Los alineamientos fueron examinados manualmente,

excluyendo las secuencias que presentaron regiones con un alineamiento ambiguo en los conocidos dominios altamente conservados del gen. Finalmente, la asignación taxonómica y las relaciones filogenéticas de los OTUs fueron realizadas mediante la construcción de árboles filogenéticos con la secuencia aminoacídica representativa de cada OTU e incluyendo también a secuencias *nifH* de la base de referencia de Zehr et al., (2014) [177]. Se aplicó el análisis de Neighbour-joining (con corrección de Kimura) usando el programa ARB.

### **2.9.3 Estimación de la diversidad**

La diversidad de la comunidad endófito diazotrófica ( $\alpha$  diversidad) y cada tratamiento fue evaluada mediante las curvas de rarefacción utilizando el método de re-muestreo sin reemplazo comprendido en el entorno Mothur. Los índices de riqueza Chao-1 y de diversidad Shannon-Wiener ( $H'$ ) se calcularon a partir de la matriz de los OTUs con abundancia normalizada usando el programa de libre acceso PAST3 [178]. Para el análisis comparativo de la composición entre muestras ( $\beta$  diversidad) se aplicó la medida de disimilitud Bray-Curtis que tiene en cuenta tanto la ausencia como la presencia de OTUs [143] usando el programa PAST3 [178]. La distancia weighted UniFrac mide la distancia filogenética entre par de OTUs como la fracción del largo de la rama del árbol que lleva al descendiente de una muestra o de la de otra, pero no de ambas [179].

La versión weighted del algoritmo tiene en cuenta, además, las abundancias de OTUs en el cálculo de las distancias y se analizó con el programa mothur [176]. Las matrices de diversidad *beta*, tanto basadas en UniFrac como en Bray Curtis, se utilizaron para el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con el programa PAST3 [180].

#### **2.9.3.1 Análisis Multivariados**

En el presente trabajo hemos seleccionado algunos de los métodos del análisis multivariado en los cuales nos permitieron realizar representaciones gráficas, cuantificar la asociación entre individuos y clasificar respecto a un conjunto de variables observadas, tanto cuantitativas como cualitativas.

A modo de resumen se presentan en la Tabla 7 los diferentes criterios utilizados en este trabajo para ordenación y clasificación, y dentro de los primeros agrupamos de acuerdo con el tipo de variable y medida de distancia asociada. Para llevar a cabo los métodos de análisis multivariado utilizamos el programa PAST3. A continuación se describen los sistemas de análisis y sus características y propiedades usados en el tratamiento de los datos de secuencias.

### **2.9.3.2 Métodos de Ordenación**

Para el análisis de ordenación se utilizó la medida de distancia de Bray-Curtis. Brevemente, en general el objetivo de un análisis de ordenamiento es representar en un número reducido de ejes ortogonales, los datos multivariado provenientes de múltiples variables de una misma muestra tales, como la abundancia de OTUs y la distancia ecológica entre comunidades [181]. En el gráfico de ordenamiento los puntos que representan a las muestras se ubican en forma tal que las distancias entre ellos representan la distancia ecológica entre las comunidades muestreadas [143].

Por otro lado, el análisis de componentes principales es adecuado para variables cuantitativas, cuando las variables son cualitativas resulta más apropiado aplicar un tipo de análisis diferente, tal como el de coordenadas principales [182]. El objetivo del análisis de coordenadas principales es llegar a una representación geométrica de los individuos a través de una medida de distancia que respete la estructura de similaridad definida por la matriz de similaridad  $S$ . El análisis de coordenadas principales no es más que un análisis de componentes principales aplicado a una tabla de datos compatibles con la distancia  $d_{ij}^2 = s_{ii} + s_{jj} - 2s_{ij}$ . Pero, aquí el sistema de ejes no representa direcciones dado el carácter cualitativo de las variables originales.

Mientras que la escalas multidimensionales MDS es un método de ordenación robusto que nos permite representar, la similitud entre pares de objetos en un espacio métrico de pocas dimensiones, con el mayor grado de confianza posible [183]. Se puede utilizar cualquier de los coeficientes conocidos de disimilitud o medida de distancia para construir la matriz a utilizar como "input" del análisis NMDS.



### 2.9.3.3 Métodos de clasificación

El análisis de conglomerado jerárquico presenta un enfoque algorítmico para identificar grupos discretos con diversos grados de (disimilitud en una base de datos representada por una matriz de disimilitud). En este trabajo se realizaron los análisis de conglomerado mediante el método de agrupamiento UPGMA aplicando la medida de distancia de Bray-Curtis. Brevemente, los grupos son jerárquicamente organizados a medida que el algoritmo de agrupación avanza y pueden ser representados con un dendrograma. Los dendrogramas indican cómo se asocian los individuos/parámetros objeto del análisis a medida que disminuye el grado de semejanza entre ellos. Estos árboles generalmente van acompañados por un eje que indica la distancia y/o similaridad a la que se han producido las diferentes uniones q denominado índice de jerarquía. En las publicaciones de Culmman *et al.*(2008) [184] y *Ramette (2007)* [183], se encuentra una revisión más amplia de los métodos del análisis multivariante que son utilizados en estudios de ecología microbiana (Tabla 8).

**Tabla 8.** Métodos de análisis multivariado

|                                 |  |                                    |  |
|---------------------------------|--|------------------------------------|--|
| <b>Métodos de Ordenación</b>    | Variables Cuantitativas                | Distancia Euclídea                 | Análisis de Componentes Principales (PCA)                                |
|                                 | Variables Cualitativas                 | Índices de Similaridad             | Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)                               |
|                                 | Variables Cualitativas                 | Índices de Disimilitud             | Análisis de Proximidades (NMDS o Escalas Multidimensionales No métricas) |
| <b>Métodos de Clasificación</b> | Variables Cuantitativas o Cualitativas | Índices de distancia o similaridad | Análisis de conglomerados (Clúster) Jerárquico                           |

## 2.10 Técnicas Microbiológicas

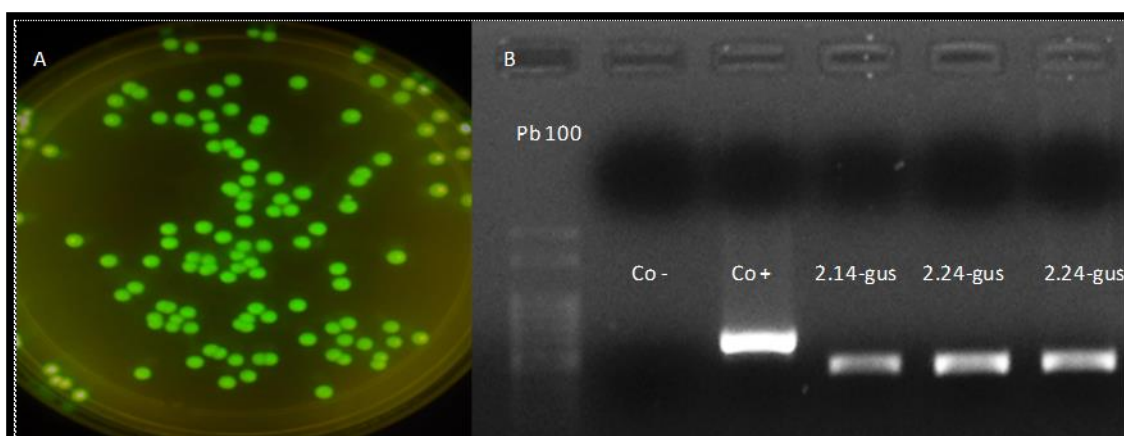
### 2.10.1 Marcado de cepas con los genes reporteros GFP y GUS

El plásmido *pFAJ1708-GFP* y *pFAJ1708-GUS* se obtuvieron de las cepas marcadas de *Burkholderia trópica* [158]. Las cepas se crecieron en medio LB suplemento con 15µg/ml de tetraciclina, se incubó a 28°C por 24 horas en agitación (200 rpm). Seguidamente las cepas se cosecharon y se les extrajo el

plásmido con el kit de miniprep zyppy, los plásmidos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se transformó la cepa *E. coli DH5 $\alpha$*  con el plásmido *pFAJ1708* que contienen los genes porteros *GFP* y *GUS*, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación (200 rpm) por 24 horas, luego se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol 20%. Las bacterias transformadas fueron replicadas en medio LB con tetraciclina ( $15\mu\text{g/ml}$ ), e incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas con agitación (200 rpm). Posteriormente, las bacterias fueron cosechadas con el fin de extraer y purificar el plásmido, utilizando el kit de miniprep zyppy plasmid miniprep (epigenetic).

Se prepararon bacterias electrocompetentes de las cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24* siguiendo el protocolo descrito por Tung *et al*(1995) [185]. Las bacterias electrocompetentes se transformaron por electroformación con el equipo BIO-RAD (2,5 kV, 25 mF,  $200\ \Omega$ , 4,5 ms) con el plásmido *pFAJ1708-GFP* y *pFAJ1708-GUS* de forma independiente. Las bacterias transformadas se crecieron en medio LB-agarizado con Tc  $15\mu\text{g/ml}$  donde fueron seleccionadas, las bacterias que contenían el plásmido *pFAJ1708*, ya que le confiere resistencia al antibiótico tetraciclina.

Las cepas transformadas con el plásmido *pFAJ1708-GFP* fueron expuestas a luz UV con el fin de observar la fluorescencia producto de la expresión del gen reportero GFP y las cepas transformadas con el plásmido *pFAJ1708-GUS* se realizaron coloni PCR con el propósito de amplificar el gen GUS para evitar falsos positivos (Figura 13).



**Figura 13. Cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24* marcadas con los genes reporteros *GFP* y *GUS*.** En **A** se muestra las cepas sometidas a luz UV y emitiendo fluorescencia producto de la expresión del gen GFP y en **B** se muestran la coloni PCR de las cepas transformadas con el gen reportero *GUS* y sus respectivos controles

### **2.10.2 Evaluación de la estabilidad del plásmido pFAJ1708 en las cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24***

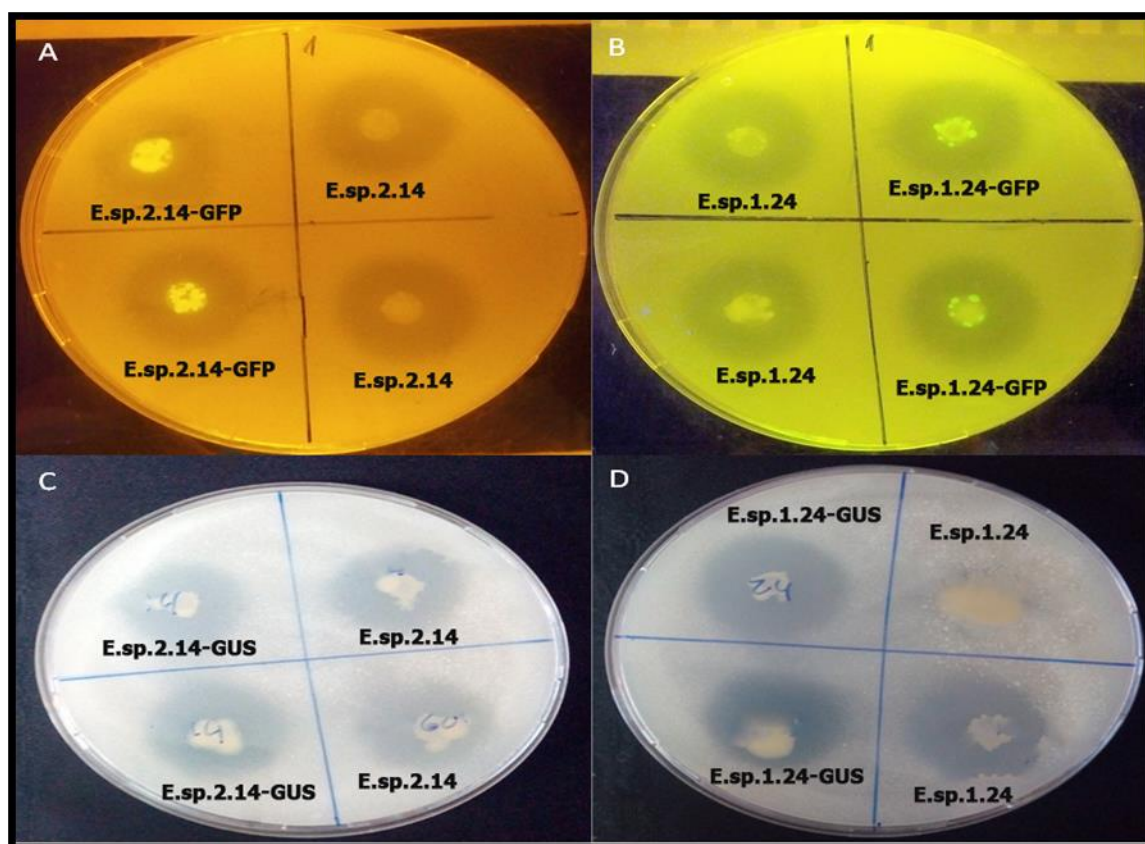
La estabilidad del plásmido en el curso de varias generaciones fue evaluada mediante la incubación de las cepas *E. sp. 2.14-GFP*, *E. sp. 2.14-GUS*, *E. sp. 1.24-GFP* y *E. sp. 1.24-GUS* en medio de cultivo LB en ausencia de presión de selección por aproximadamente 40 generaciones. El procedimiento se llevó a cabo a lo largo de 4 días en los cuales se dejaron crecer hasta punto de saturación (24 horas aproximadamente), a partir de una alícuota ( $DO_{600}$  0,2 unidades), se inocularon nuevos tubos que contenían LB fresco los cuales fueron incubados hasta alcanzar la fase de saturación. Este procedimiento se repitió 3 veces en los 4 días del ensayo. Se tomaron muestras de cada día y se plaquero en medio LB-agarizado con antibiótico y sin antibiótico donde se evaluó la relación entre el número de colonias sensibles y resistentes al antibiótico. Las colonias sensibles al antibiótico están relacionadas con la pérdida del plásmido. La fracción de las colonias resistente a lo largo de las generaciones se calculó como el cociente entre UFC en presencia de antibiótico en relación con las UFC sin presencia del antibiótico.

### **2.10.3 Cinética de crecimiento de las cepas marcadas con *GFP*, *GUS* y capacidad de solubilización.**

Considerando que la introducción del plásmido pFAJ1708 puede afectar características fisiológicas de las células bacterianas [186], [187], se evaluó el crecimiento y la capacidad solubilizar fosforo de las cepas marcada con *GFP* y *GUS*.

La cinética de crecimiento fue evaluada en medio mínimo M9 (contiene en un litro  $Na_3PO_4$  12 g,  $KH_2PO_4$  3 g,  $ClNa$  0,5 g,  $NH_4Cl$  1g, pH 7,4 y glucosa 0.2% v/v) [157] y en medio rico LB (un litro contiene 10g Triptona, 5g Extracto de levadura y 10g NaCl) [157]. Las bacterias fueron crecidas en medio líquido suplementado con 15 $\mu$ g/ml de Tc en agitación (200 rpm) e incubado a 28°C durante 24 horas hasta fase exponencial tardía, a partir de estos cultivos se tomaron alícuotas que fueron diluidas en 30 ml de medio fresco con una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de 0.02 unidades. El crecimiento de los cultivos fue seguido por medición de la densidad óptica de los cultivos en el tiempo. Los ensayos se repitieron tres veces para darle robustez y tener confianza en los

resultados obtenidos. Asimismo, se evaluó cualitativamente la capacidad de solubilización de fósforo *in vitro* con las cepas marcadas (Figura 14). En estos ensayos las bacterias se crecieron en medio líquido NBRIP con fosfato tricálcico ( $5 \text{ gL}^{-1}$ ) hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 1,4 unidades. Se tomaron alícuotas  $5 \mu\text{l}$  y fue sembrada en placas de Petri con medio NBRIP-agarizado que contenía  $5 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico. Las placas se incubaron a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 días, y cada dos días se midió el diámetro del halo, producto de la solubilización de estas cepas. El índice de solubilización (IS) se calculó restando el diámetro de la colonia menos el diámetro total de solubilización.



**Figura 14. Actividad solubilizadora de fósforo de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 y sus derivadas transformantes marcadas con GFP y GUS.** En A-B: Se muestran la actividad solubilizadora como halos claros (zona traslúcida) de las cepas salvajes y cepas marcadas con el gen GFP. En los paneles C-D: Idéntico A-B, con las cepas marcadas con el gen GUS y las respectivas cepas salvajes.

## 2. 11 Ensayos de fisiología microbológica

### 2.11.1 Evaluación de producción de enzimas

La evaluación de actividad de enzimas líticas de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 se realizó en medios sólidos. Estas enzimas están relacionadas con la rizocompetencia del microorganismo, interacción planta microorganismos y

biocontrol. Se utilizaron medios de cultivo específicos para la determinación cualitativa de distintas actividades enzimáticas. Las cepas fueron crecidas en medio LB hasta alcanzar una DO ( $_{600}$ ) 1.4 se centrifugo el medio a 5000 rpm y se resuspendió en PBS 1x, se tomó una alícuota de 5 $\mu$ l y sembró en los diferentes medios.

### **2.11.2 Determinación de celulasas**

Medio de cultivo: NaNO<sub>3</sub> 0,2% p/v; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1% p/v; MgSO<sub>4</sub> 0,05% p/v; KCl 0,05% p/v; peptona 0,02% p/v; CMC (Carboximetilcelulosa) 0,2% p/v, agar 1,7% p/v PH 6,00.

Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. El medio utilizado para la determinación de celulasas se reveló mediante la adición de rojo Congo 0,1% v/v. El colorante se dejó durante 5 minutos y el excedente se lavó con NaCl 1 M (para desteñir la zona con actividad) y por último se agregó ácido acético al 0,5% v/v para bajar el pH [188]. Las celulasas hidrolizan la celulosa a unidades de glucosa. Luego del revelado, el rojo Congo es absorbido por las cadenas largas de polisacáridos de CMC. Si el microorganismo utiliza como sustrato la CMC, alrededor de esa zona, no se absorbe el rojo Congo, por lo tanto, se observará un halo claro, mientras que el medio se observa de un color marrón oscuro.

### **2.11.3 Determinación de Amilasas**

Medio de cultivo: almidón soluble 1% p/v; EL 0,2% p/v, peptona 0,5% p/v, MgSO<sub>4</sub> 0,05% p/v; NaCl 0,05% p/v; CaCl<sub>2</sub> 0,015% p/v; agar 2% p/v.

Las placas Las placas se incubaron a 28°C durante 48 hs. El revelado se realizó con una solución de I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> (1 g de I<sub>2</sub> + 5 g de IK en 330 ml de agua). El medio cambia de color con el agregado de la solución yodada, debido a la no hidrolizarían y reacciona con el yodo para formar un complejo de color azul intenso. Con un resultado positivo se observa la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, en un medio color azul/violeta. [189].

### **2.11.4 Determinación Lipasas.**

Medio de cultivo: NaCl 0,5% p/v; CaCl<sub>2</sub> 0,01% p/v; peptona 1% p/v; agar 2% p/v; tween 80 1% v/v PH 6,00.

Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. Las lipasas catalizan la hidrólisis de acilgliceroles de cadena larga. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el tween 80 contenido en el medio de cultivo se observa la aparición de un precipitado alrededor de la colonia debido a la combinación de  $\text{Ca}^{+2}$  y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis, formándose monooleato de calcio [190].

#### **2.11.5 Determinación Proteasas**

Medio de cultivo: leche descremada 5% p/v; agar 1% p/v. Las placas se incubaron a 28 °C y se observaron luego de las 24 y 48 hs. Las proteasas producen la hidrólisis de la caseína (proteína predominante de la leche). Las bacterias productoras de proteasas degradan la caseína e incorporan los aminoácidos liberados en la hidrólisis. Con un resultado positivo, se observarían halos transparentes alrededor de las colonias, lo cual indicaría que se produjo la hidrólisis de la caseína [191].

#### **2.11.6 Determinación de Pectinasas**

Medio de cultivo: pectina cítrica 1% p/v; EL 0,2% p/v; peptona 0,5% p/v;  $\text{MgSO}_4$  0,05% p/v;  $\text{CaCl}_2$  0,015% p/v; NaCl 0,05% p/v; agar 2% p/v PH 6.00. Las placas se fueron incubadas a 28°C durante 5 días. Pasado ese tiempo, las placas se revelaron con la solución de I2/I-descripta anteriormente [192]. La pectina reacciona con el yodo para formar un complejo color café (color del medio luego del revelado). Con un resultado positivo se observa la decoloración instantánea alrededor de la colonia.

#### **2. 11.7 Evaluación de formación de biofilm**

La capacidad de formar biofilm de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 fue evaluada por dos metodologías:

1. caracterización cuantitativa del biofilm formado en dos superficies en medios de cultivo LB mediante la técnica de tinción con cristal violeta [193].
2. caracterización cualitativa del biofilm mediante técnicas microscopía confocal y de fluorescencia [194].

### **2.11.7. 1 Caracterización cuantitativa del biofilm**

En primera instancia se determinó el tiempo necesario para la formación de biofilm de las dos cepas en estudio en tubos de vidrio de 15 ml y medio de cultivo LB. Las cepas se crecieron hasta fase exponencial tardía, luego tomo una alícuota y se adicionó a los tubos (24 tubos) hasta alcanzar una  $DO_{600}$  inicial de 0.2 unidades, los tubos se encubaron  $28^{\circ}\text{C}$ . En las primeras horas los medios se mantuvieron estáticos con el propósito de favorecer la adhesión de las cepas a la superficie de vidrio.

Posteriormente se llevaron a agitación a 100 rpm. El ensayo contempla un control positivo (*Burkholderia tropica*) y un control negativo del medio y tubos inoculados con las cepas. El control de medio se adiciono una alícuota de agua estéril. Se tomaron muestras a las 12, 24 y 72 horas. Para cada tiempo de muestreo tomaron 2 tubos y se descartó el medio con las bacterias no adheridas a la superficie. Posteriormente se lavaron los tubos por inversión con agua estéril, este procedimiento se repitió tres veces. Los tubos se llevaron a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y se realizó la tinción con cristal violeta que permite teñir a las bacterias siguiente protocolo descrito por O'Toole (2011)[193].

- Agregar una solución de cristal violeta 0,1% hasta cubrir la muestra para teñir a las bacterias y dejar actuar por 15 minutos.
- Descartar el colorante excedente y lavar la muestra 3 veces con agua destilada.
- Dejar secar a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Eluir con 2 volúmenes de etanol 96% v/v y dejar actuar de 10 minutos, sobres las zonas teñidas por el cristal violeta, medir a una  $DO_{590}$  el colorante eludido.

La cuantificación del biofilm se realizó por espectrometría utilizando una longitud de onda de 600 nm con placas multipocillo estériles con medio de cultivo LB, para determinar cuál de las cepas contiene mayor biofilm partiendo de una  $DO_{600}$  0.2 unidades y para ello las cepas se incubaron por 24 horas.

### **2.11.7.2 Caracterización de la formación de biofilm por técnicas microscópicas**

El crecimiento del biofilm de las cepas *E. sp.* 2.14-GFP y *E. sp.* 1.24-GFP y caracterización de las estructuras se realizaron sobre portaobjetos de vidrio ubicados en tubos de polipropileno que contenían medio LB. Los portaobjetos fueron lavados previamente con alcohol 96% y esterilizados, los ensayos se hicieron por triplicado. Los tubos fueron inoculados con una  $DO_{600}$  inicial 0.2 unidades, y se incubó a 28°C, las primeras se mantuvieron de forma estática para permitir la adhesión de las bacterias a la superficie, seguidamente los tubos se colocaron en agitación a 100 rpm. Los tubos de polipropileno contenían 15 ml de medio, quedando los portaobjetos parcialmente sumergidos y se cerrados con Parafilm, para permitir el paso de oxígeno. Los portaobjetos fueron retirados a distintos tiempos para ser analizados por microscopia confocal. Los portaobjetos se lavaron 3 veces con agua destilada, se cubrieron con agua destilada, se colocó el cubreobjetos y se sellaron con esmalte.

Las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica SP5 equipado con una cámara digital Leica DFC300 FX. Para la excitación de la proteína fluorescente se utilizó una longitud de onda de 488 nm (láser de argón). Se seleccionó una banda de emisión para detectar la proteína GFP entre 504-550 nm. Se utilizó un objetivo de 63X y 100X aceite UV y una apertura numérica de 1,40. Se obtuvieron imágenes en diferentes planos a través del eje z con intervalos de 0.2µm. Las imágenes obtenidas de los stacks (conjunto de imágenes consecutivas en el eje z) fueron analizadas en los programas Leica Application Suite, ImageJ, para conformar la estructura tridimensional del biofilm.

### **2.11.8.1 Determinación de capacidad de fijación de nitrógeno**

Se evaluó la presencia del gen *nifH* en las cepas *E. sp.* 2.14 y *E. sp.* 1.24, este gen codifica el componente II de la enzima nitrogenasa. Para ello, se realizó la extracción de ADN de los dos aislamientos puros siguiendo el protocolo descrito por Alippi y Aguilar (1998) [195]. La amplificación y condiciones de reacción del gen se realizaron por PCR anidada utilizando cebadores descritos en la sección técnicas moleculares.



### **2.11.8.2 Determinación de actividad ACC desaminasa in vitro**

Con el fin de determinar la actividad ACC desaminasa de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 se utilizó el protocolo descrito por Penrose y Glick (2003) [196] y se describe a continuación las bacterias se cultivan en un primer paso en medio rico y luego se transfieren a medio mínimo con ACC como única fuente de nitrógeno. Las cepas se cultivan hasta la fase exponencial tardía en 15 ml en medio TSA y se inocula con 1 ml de las cepas. Los cultivos bacterianos se incuban a 28 °C durante 12 horas con agitación a 200 rpm posteriormente se cosechan las bacterias mediante centrifugación a una velocidad de 8000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las bacterias fueron resuspendidas con 5 ml de medio mínimo M9 y se vuelve a centrifugar a 8000 rpm durante 10 min, se elimina el sobrenadante y se vuelve a resuspender las bacterias con 7,5 ml de medio M9 y se transfieren a nuevo tubo donde se agrega 45 ml ACC 0,5M. Para obtener una concentración final de ACC de 3,0 mM. Las bacterias se incuban nuevamente a 28 °C durante 24 horas y en agitación (200rpm) con el fin de que las bacterias utilicen el ACC como única fuente de nitrógeno se produzca la inducción del gen. Las bacterias se cosechan por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se elimina y las células se lavaron con 5 ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6. Posteriormente las bacterias fueron lisadas para la obtención de los extractos crudos.

La determinación de la actividad de desaminasa ACC se realizó a mediante el método modificado de Honma y Shimomura (1978)[176] que mide la cantidad de  $\alpha$ -cetobutirato producida cuando la enzima ACC desaminase se encuentra activa. El extracto obtenido de la lisis celular fue mezclado con 25 mM ACC en un volumen final de 200  $\mu$ l de Tris 0.1 M (pH 8.5). La mezcla fue incubada a 30°C por 2 horas. Como control negativo se incluyó la cepa de *Pseudomona putida* ATC 17399, control positivo *Pseudomona putida* cepa ATC 17399 con plásmido PRK que contiene múltiples copias del gen ACC desaminasa y como blanco de lectura Buffer Tris 0.1 M (pH 8.5). Posteriormente, la mezcla fue incubada por 15 minutos a 30°C con 1.8 ml de HCl 0.56 N y 0.3 ml de una solución de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNP) disuelta en HCl 2N. A la reacción se adiciono de 2 ml de NaOH 2N. La absorbancia de la muestra fue medida a 540 nm. El número de  $\mu$ moles de  $\alpha$ -cetobutirato producido por la enzima fue

determinado a través de la comparación de las mediciones de  $A_{540}$  con las obtenidas en una curva estándar de  $\alpha$ -cetobutirato en un margen de 0.1 a 1  $\mu\text{mol}$ . Cada una de las series de las concentraciones conocidas de  $\alpha$ -cetobutirato fueron preparadas en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  en buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 8.5, dando el mismo tratamiento que a los extractos de proteínas totales, excepto la adición de ACC.

### **2.11.8.3 Prueba de antagonismo in vitro**

Se evaluó la capacidad de las cepas *E. sp.* 2.14 y *E. sp.* 1.24 como antagonista del hongo patógeno *Bipolaris sorokiniana* (aislado de trigo) provisto por la Dr. Cecilia Mónaco del Centro de investigaciones en fitopatologías (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agraria y Forestales UNLP. El aislamiento se incubó en cajas de Petri con medio PDA con tres replicas biológicas. Las cepas en estudio se crecieron en medio LB se incubaron 28 °C con agitación de 200 rpm, hasta obtener una  $\text{DO}_{600}$  1.4 unidades. El crecimiento del hongo patógeno se realizó en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) a pH 7, se incubó a 25°C durante 10 días con intervalo de luz oscuridad de 12 horas. Las cajas de Petri donde se evaluó el grado de inhibición en el desarrollo del hongo por efecto de las cepas fueron divididas en 3 cuadrantes marcando el punto central de la placa y 3 puntos equidistantes. En cada punto se sembraron 20 $\mu\text{L}$  de las cepas bacterianas y se incubó a 28 °C por 24 horas. Posteriormente con un sacabocado de 1 cm de diámetro se retiró una porción del micelio del hongo fitopatógeno previamente repicado y se sembró en el centro de la placa que contenían las cepas en los cuadrantes. Paralelamente se realizaron placas control del hongo sin bacterias. Las cajas de Petri que contenían el hongo con cepas los controles se incubaron las placas a 25°C con periodo de luz/oscuridad de 12 horas, y se mantuvieron durante 10 días donde se evaluó el grado de inhibición del crecimiento del hongo.

## **2.12 Estudio de interacción entre las cepas bacterianas *E. sp.* 2.14, *E. sp.* 1.24 y las plantas**

### **2.12.1 Preparación del inóculo**

Las cepas bacterianas *E. sp.* 2.14-*GFP*, *E. sp.* 2.14-*GUS*, *E. sp.* 1.24-*GFP* y *E. sp.* 1.24-*GUS* se incubaron en frascos erlenmeyers (1 l) conteniendo 250 ml de medio LB suplementado con el antibiótico tetraciclina (15 µg/ml) y en agitación a 200 rpm con una temperatura 28 °C durante 24 h. Para los estudios del patrón de colonización, las bacterias se concentraron, por centrifugación a 7000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer PBS 1X estéril, llevándola a una concentración final de 1X10<sup>8</sup> UFC/ml. Seguidamente se procedió a la inoculación a plantas de tomate y trigo.

### **2.12.2 Experimentos en plantas**

Se realizaron ensayos de inoculación en plantas de tomate y trigo. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con solución de alcohol al 70% durante 2 minutos, seguido de un lavado con agua estéril e inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min. Finalmente se realizaron tres lavados con agua estéril con el fin de eliminar las trazas de hipoclorito de sodio para evitar posibles intoxicaciones de las plántulas al momento de germinar.

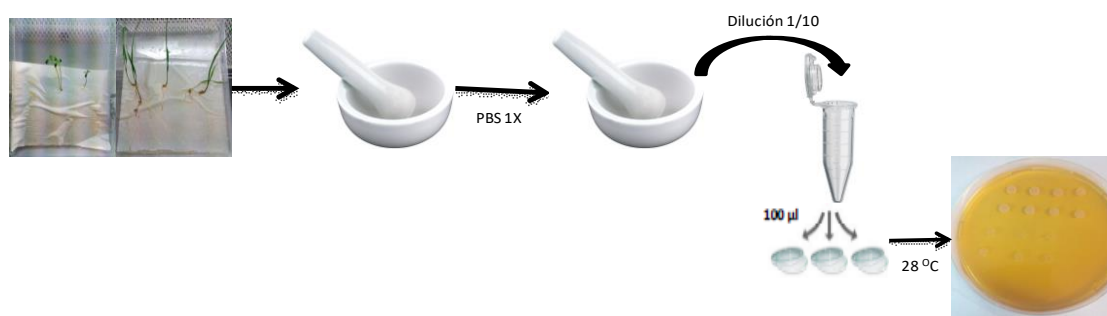
Las semillas fueron germinadas sobre papel filtro húmedo e incubadas (días 6 días para tomate y 4 días para trigo) a 28 °C en oscuridad. Posteriormente las semillas germinadas fueron transferidas a cajas acrílicas de 17 cm \* 22 cm, conteniendo agar-agua con solución de Fåhraus [197] estéril. El ensayo comprendió un tratamiento control (sin inoculación) y un tratamiento con inoculación con las cepas *E. sp.* 2.14-*GFP*, *E. sp.* 2.14-*GUS*, *E. sp.* 1.24-*GFP* y *E. sp.* 1.24-*GUS* en forma independiente. La inoculación de las cepas se realizó a los 5 días post-emergencia con 1ml por caja con una concentración de 1X10<sup>8</sup> UFC/ml, el control fue regado con agua estéril. Las plantas se mantuvieron durante 12 días en cámara de crecimiento con el ciclo de luz / oscuridad de 12 h/12 h, respectivamente, a 28 °C y se tomaron muestras a los 3 y 10 días post-inoculación. El patrón de colonización se evaluó cuantitativamente mediante la utilizando microscopia de fluorescencia, confocal y campo claro.

### **2.12.3 Recuento de bacterias en extracto de tallo y raíz de tomate y trigo**

Con el fin de determinar el tipo de asociación entre las cepas *E. sp.* 2.14-GFP y *E. sp.* 1.24-GFP en las plantas de tomate y trigo se realizó el siguiente experimento: las semillas de tomate y trigo se germinaron y crecieron como se describe anteriormente. El ensayo tiene un control, plantas inoculadas con las cepas de forma independiente. 5 días post-germinación las plantas fueron inoculadas con las cepas con una concentración mencionada anteriormente, las plantas control fueron regadas con agua estéril. El experimento se mantuvo por 22 días, se tomaron muestras a las 24, 72 horas, 8, 12, 17 y 22 días post-inoculación.

Las plantas de tomate y trigo fueron cosechadas y se separaron cuidadosamente el tallo y raíz. Seguidamente se tomó una porción a los cuales se les aplicó un procedimiento de desinfección superficial consistente en: lavado con una solución de alcohol al 70% 10 min y agitación a 200 rpm, luego se transfirieron a erlenmeyer estériles con solución de hipoclorito de sodio 3% durante 10 min y agitación a 200 rpm y finalmente se relazaron 4 lavados con agua estéril para eliminar las trazas del hipoclorito de sodio. La eficiencia de la esterilización superficial se evaluó mediante la toma de alícuotas de agua del último lavado y porciones de tallo y raíz tomados al azar que posteriormente fueron sembrados en medio LB e incubadas a 28 °C durante 48 horas. Posteriormente a la incubación se observó si en los medios si hay presencias de colonias bacterianas en las placa con el fin de evaluar la eficiencia de esterilización. Paralelamente las muestras desinfectadas, sin desinfección y sus respectivos controles fueron maceradas con solución PBS 1X estéril donde se tomaron alícuotas de los extractos para realizar diluciones seriadas (Figura 15) y fueron sembradas en medio de cultivo LB suplementado con tetraciclina (15 µg / ml), e incubadas a 28 °C por 24 horas.

Se estimó el número de bacterias que expresan *GFP* de cada muestreo y se determinó el número de UFC por gramo de tejido fresco.



**Figura 15.** Macerado de raíces tallo en mortero y siembra en medio de cultivo agarizado para el recuento de las poblaciones del rizoplasma y endofítica.

#### **2.12.4 Técnicas microscópicas para visualizar las bacterias inoculadas**

Se utilizaron tres técnicas microscópicas con el fin de determinar los sitios de colonización de las cepas *E. sp. 2.14-GFP*, *E. sp. 2.14-GUS*, *E. sp. 1.24-GFP* y *E. sp. 1.24-GUS* en raíces y tallo de tomate y trigo en condiciones de esterilidad e inoculación controladas.

##### **2.12.4.1 Preparación de plantas para observación microscópica**

Consideramos que el patrón de crecimiento y solubilización entre las cepas silvestres y marcadas con *GFP* y *GUS* no presentan cambios significativos en su crecimiento y capacidad de solubilizar fósforo se, procedió a determinar el tipo de colonización, mediante el uso de microscopía, confocal, fluorescencia y campo claro. Los tallos y raíces de los explanto fueron separados y una parte de las muestras fueron lavadas suavemente con agua estéril con el fin de eliminar los restos de agar-agua para eliminar las bacterias que no se encuentran adheridas fuertemente a los tejidos. Otra parte de las muestras fueron sometidas a esterilización con el procedimiento descrito anteriormente.

##### **2.12.4.2 Microscopía de campo claro**

Se realizó la detección histoquímica de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa [198] en raíces de plantas de trigo y tomate inoculadas con las cepas de *E. sp. 2.14-GUS* y *E. sp. 1.24-GUS* de forma independiente a diferentes tiempos post-inoculación. Se analizaron 3 raíces y 3 tallos de cada especie, al día 3 y día 10, con sus respectivos controles no inoculados y tejidos desinfectados superficialmente. La mezcla de reacción empleada para la detección de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa se detalla en la Tabla 9. Las raíces y tallos fueron lavadas con buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM a pH 7, se sumergió en la

mezcla reactiva, se incubó a 37°C durante 12 horas, se descartó la mezcla de reacción y se lavaron las raíces 3 veces con buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM a pH 7. La actividad de la enzima se manifiesta mediante la tinción de color azul las zonas donde se encuentra las cepas marcadas con este gen. Las observaciones en raíces las enteras y en cortes transversales de tallo de tomate y trigo, con microscopio de campo claro.

#### **2.12.4.3 Microscopia de fluorescencia**

Se observaron múltiples raíces y cortes trasversales de tallo de tomate y trigo con desinfección superficial y sin desinfección, utilizando microscopia de fluorescencia para evaluar el tipo colonización de las cepas E. sp. 2.14-GFP y E. sp. 1.24-GFP, se empleó el microscopio OILYMPUS IX 51 equipado con una cámara digital refrigerada.

**Tabla 9.** Composición de la mezcla de reacción para la detección histoquímica de actividad β-glucuronidasa.

| Componente                   | Concentración final | Volumen (μl) |
|------------------------------|---------------------|--------------|
| Tritón X-100                 | (1% v/v)            | 100          |
| Tris pH 7                    | 100mM               | 50           |
| Ferrocianuro de potasio      | 100mM               | 100          |
| X-Gluc (en dimetilformamida) | 2 mM                | 250          |
| H2O destilada                |                     | 400          |
| NaCl                         | 50mM                | 100          |

Los muestreos de las plantas se realizaron a los 3 y 10 días post-inoculación, las raíces se colocaron sobre la porta donde se agregó agua destilada luego se cubre las raíces con cubreobjetos para su posterior visualización. Lo cortes transversales se realizaron con cuchilla Gillette utilizando el mismos montaje para las observaciones en el microscopio.

#### **2.12.4.3 Microscopía Confocal**

Se observaron raíces de trigo y tomate utilizando un microscopio confocal Leica SP5. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm (láser de argón). Se seleccionó una banda de emisión para detectar la proteína GFP (499-551 nm).

Las imágenes obtenidas fueron posteriormente analizadas con el procesador de imágenes Leica Application Suite e ImageJ.

Se observó cortes transversales de tallo, y raíces enteras, se colocaron entre porta y cubre para la observación microscópica. Las imágenes obtenidas en diferentes planos del eje z (denominadas stacks) fueron analizadas con el procesador de imágenes ImageJ

#### **2.12.5 Ensayos de colonización en suelo no estéril en condiciones controladas**

Con el propósito de evaluar las cepas en su capacidad para asociarse a raíz de tomate y trigo en suelo no estéril, se realizó el siguiente ensayo:

Las semillas de trigo y tomate fueron desinfectadas según el protocolo descrito anteriormente. Las plantas se inocularon con las cepas *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP* utilizando 1ml por planta en concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Además, se analizaron plantas no inoculadas, tratadas con agua destilada en lugar de inóculo. Las semillas se sembraron en una mezcla de tierra y perlita en proporciones 2/2, la mezcla se transfirió a macetas de 1 litro de capacidad. En cada maceta, se colocaron 5 semillas, y las mismas fueron colocadas en condiciones de ambiente controlado (luz 12 horas / 12 noches temperatura 28 °C). El riego se realizó cada dos días con agua destilada.

El ensayo se realizó por triplicado, y se tomaron muestras a los 10 y 20 días. Las raíces de las plantas y se sumergió en un volumen determinado de solución fisiológica estéril con Tween 20 se agitó vigorosamente durante 1 minutos, luego llevo las muestras a shaker con velocidad de 200 rpm por 1 hora. La suspensión resultante se consideró como las bacterias adheridas al rizoplasma. Se realizaron diluciones seriadas con solución fisiológica de esta suspensión y se sembraron en medio LB-agarizado suplementado con tetraciclina 15 µg/ml. Otra parte de los tejidos fueron esterilizados superficialmente y fue evaluada la eficiencia de esterilización con el protocolo descrito anteriormente. Las muestras fueron maceradas con solución fisiológica y se realizaron diluciones serias y se sembraron en medio LB-agarizado (15 µg/ml) en las cuales se determinó el número de colonias por gramo de tejido.

### **2.12.6 Sobrevivencia de las cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24* en suelos de la localidad de Junín, Ferré y Pergamino provincia de Buenos Aires**

Con el fin de analizar la capacidad de las cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24* de sobrevivir y competir en los suelos, de las localidades de Junín (campo las Alisias), Ferré (campo de la escuela Agrotécnica salesiana) Pergamino (campo experimental RIZOBACTER S.A) fue necesario la obtención previa de mutantes cromosomales espontáneos resistentes a rifampicina que permitieran la selección de estos microorganismos del resto de la población presente en las muestras de suelo. Los mutantes fueron facilitados por Ifran [156] del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET-UNNE).

#### **2.12.6.1 Ensayos de sobrevivencia**

La capacidad de las cepas de sobrevivir en suelo fue evaluada mediante la inoculación en suelos de tres localidades de la provincia de Buenos Aires.

Las cepas se crecieron en medio LB con rifampicina (100mg/ml) hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 7000g durante 5 minutos, se resuspendió en buffer PBS 1X estéril. Los ensayos se realizaron por triplicado y los tratamientos utilizados se describen en la Tabla 10.

Se utilizó 200 g de suelo de cada localidad para la inoculación de las cepas *E. sp. 2.14-M* y *E. sp. 1.24-M* de forma independiente. Los suelos fueron inoculados con 30 ml de la suspensión bacteriana (recuento en placa de  $1 \times 10^8$  UFC/ml). El suelo inoculado fue homogenizado y transferido a macetas a las cuales se le agregó 70 gramos de suelo. Los controles fueron regados con agua destilada estéril en lugar del inocula. Los ensayos se mantuvieron bajo condiciones de ambiente controlado con temperatura de 28 °C, humedad relativa, 55-60% y 12 horas luz /12 horas oscuridad. El ensayo se mantuvo por 60 días y se tomaron muestras al día 0, 7, 15, 30, 45 y 60 días, en cada muestreo se tomó 1 gramos de suelo aproximadamente y se agregó 9 ml de PBS 1X estéril. Posteriormente se tomó una alícuota de las soluciones y se realizó diluciones seriadas. Las diluciones fueron sembradas en medio LB-agarizado con rifampicina (100mg/ml) e incubadas a 28 °C por 24 horas, posteriormente se realizó el recuento en placa de las colonias recuperadas de los suelos inoculados y los respectivos controles (suelos sin inocular).



## **2.11 Ensayos de microcosmos en cámara de plantas**

### **2.11.1 Ensayos de inoculación en tomate, trigo variedad y alfalfa**

Se realizaron ensayos de inoculación de las cepas E. sp. 1.24 y E. sp. 1.24 en plantas de tomate, trigo y alfalfa para determinar la capacidad de promoción de crecimiento y sus efectos en las variables fisiológicas evaluadas. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con 70% de alcohol durante 2 minutos seguido de un lavado con agua estéril e inmersión en hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos, finalmente se realizaron tres lavados con agua estéril. Las semillas fueron germinadas sobre papel de filtro húmedo, e incubadas (6 días para tomate, 4 días para trigo y 3 días para alfalfa) a 28° C en oscuridad. Luego de la germinación las plántulas fueron transferidas a macetas con capacidad de un 1 litro, conteniendo una mezcla de perlita y arena en una proporción 3/1 respectivamente.

**Tabla 10:** Tratamientos utilizados en ensayos de supervivencia en suelo

| Localidad | Tratamiento                       |
|-----------|-----------------------------------|
| Junín     | Suelo inoculado con E. sp. 2.14-M |
| Junín     | Suelo inoculado con E. sp. 1.24-M |
| Junín     | Control                           |
| Pergamino | Suelo inoculado con E. sp. 2.14-M |
| Pergamino | Suelo inoculado con E. sp. 1.24-M |
| Pergamino | Control                           |
| Ferré     | Suelo inoculado con E. sp. 2.14-M |
| Ferré     | Suelo inoculado con E. sp. 1.24-M |
| Ferré     | Control                           |

Los ensayos se mantuvieron bajo condiciones de ambiente controlado descrita anteriormente. Las plantas fueron regadas con agua destilada y fertilizadas dos veces en la semana con solución de Fåhraeus [197]. El ensayo comprendió los siguientes tratamientos: plantas control (sin inoculación), plantas inoculadas con cepas E.sp.2.14 y plantas inoculadas con cepa E.sp.1.24, cada tratamiento contiene 3 réplicas (15 plantas por replica). 5 días post-emergencia las plantas fueron inoculadas con las cepas con 1ml/maceta en una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Las plantas control fueron regadas con agua estéril, los ensayos

se mantuvieron por 45 días post-inoculación. Las características determinadas para evaluar la promoción de crecimientos fueron: diámetro de tallo, longitud de raíz, altura de plantas, peso seco raíz y parte aérea.

### ***2.13.2 Evaluación de capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas en asociación con tomate***

Con el fin de evaluar la capacidad de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 para proporcionar a las plantas de tomate, nitrógeno a través de la fijación biológica se realizó el ensayo que se describen a continuación. La desinfección de semillas, germinación, crecimiento, inoculación, condiciones de ambiente controlado, riego y fertilización fueron según el procedimiento descrito previamente. La solución de Fåhraeus [197] utilizada en el ensayo es carente de compuestos nitrogenados a excepción de control con nitrógeno. Los tratamientos utilizados fueron: plantas control sin nitrógeno (Co-N), plantas control con nitrógeno (Co+N), plantas inoculadas con la cepa E.sp.2.14 (E.sp.2.14) y plantas inculcadas con cepas E.sp.1.24 (E.sp.1.24). Cada tratamiento tiene tres replicas (15 plantas por replica), el ensayo se mantuvo por 45 días post-inoculación y se evaluó: longitud de raíz, diámetro de tallo, altura de planta, pesos seco parte aérea, raíz y contenido de N, P, K, Ca y Mg en tejido.

Para la determinación de nitrógeno total en tejido se utilizó el método semi-micro Kjeldahl, la determinación de fósforo se utilizó el método Murphy-Riley, la determinación potasio se utilizó el método de fotometría de llama y calcio, magnesio con el método de complejometría con EDTA [199],[200][201].

### ***2.13.3 Ensayos de evaluación de capacidad de solubilizar fósforo de las cepas en asociación con tomate***

Con el propósito de evaluar la capacidad de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 para solubilizar fosforo y proporcionar a las plantas de tomate, realizo en siguiente ensayo. La desinfección de semillas, germinación, crecimiento, inoculación, condiciones de ambiente controlado, riego y fertilización fueron según el procedimiento descrito previamente. La solución de Fåhraeus utilizada es carente de fuentes de fósforo a excepción del control con fósforo soluble. La fuente de fósforo insoluble utilizada fue fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , agregando

12mg por maceta (en el momento de transferir las semillas germinadas a macetas). Los tratamientos fueron: plantas control sin fosforo (Co-P), plantas control con fosforo soluble (Co+Ps), plantas control con fosfato tricálcico (Co+Pi), plantas inoculadas con la cepa E.sp.2.14 más fosfato tricálcico (E.sp.2.14+Pi) y plantas inculcadas con cepas E.sp.1.24 más tricálcico (E.sp.1.24+PI). Cada tratamiento tiene tres replicas (15 plantas por replica), el ensayo se mantuvo por 45 días post inoculación y las variables biométricas evaluadas fueron longitud de raíz, diámetro de tallo, altura de planta, peso seco y parte aérea y raíz. En el momento de la cosecha de las plantas se tomó la hoja 3 (contando de la parte inferior a superior) para la determinación de fosforo en tejido y nitrógeno de tejido utilizando los métodos mencionado anteriormente.

Los datos generados de los diferentes ensayos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con el software Infostat versión 2014, sus medias se contrastaron con el test de Tukey utilizando una insignificancia del 5% ( $P \leq 0,05$ ).

# Resultados

## **CAPÍTULO III**

# **Caracterización de las cepas *E. sp.* 2.14 y *E. sp.* 1.24, en sus capacidades PGPR y rizocompetencia**

Ciertas propiedades biológicas identificadas como características propias de las PGPR han sido asociadas a actividades bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos. En este capítulo se describen, los resultados de la determinación de actividades de un conjunto de esas propiedades biológicas en las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24. Además, como complemento de los estudios mencionados se describen los resultados de la evaluación del efecto de la inoculación de tomate en medio libre de suplementación exógena de compuestos nitrogenados y de fosfato tricálcico.

### **Objetivos**

- ✓ Evaluar la capacidad de las cepas E.sp. 2.14 y E.sp. 1.24 para expresar funciones benéficas para la planta y características de la rizocompetencia.

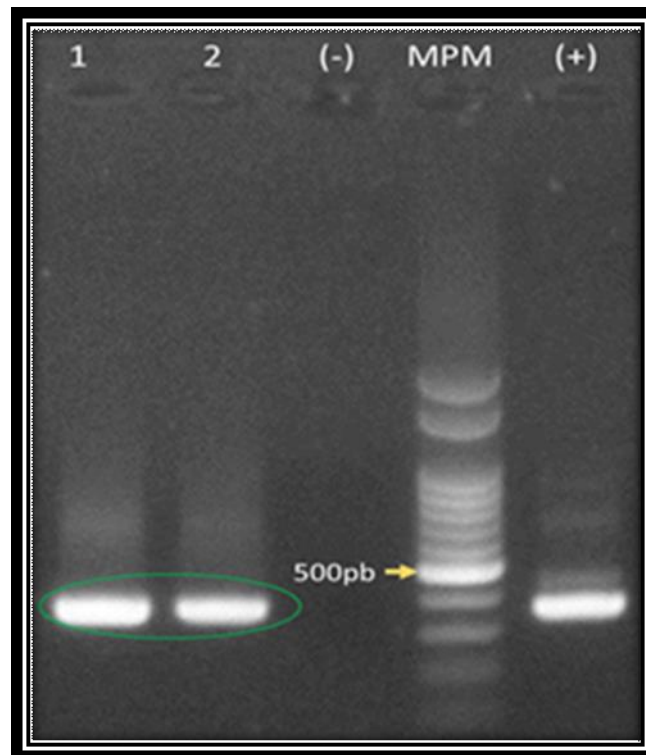
### **Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar las capacidades de fijación de nitrógeno, producción de ACC desaminasa, solubilización de fósforo, inhibición *in vitro* del fitopatógeno.
- ✓ Evaluar la capacidad de formación de biofilm y la actividad de enzimas extracelulares.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Determinación de fijación biológica de nitrógeno

Con el fin de investigar la portación de secuencias *nif* en el genoma de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 y por lo tanto su potencialidad para fijar nitrógeno, se encararon tres ensayos: 1- la amplificación del gen *nifH* mediante PCR; 2- la evaluación del crecimiento bacteriano en un medio de cultivo libre de nitrógeno (NFb), y 3- evaluación del crecimiento de tomate inoculado con las cepas, sobre un sustrato carente de compuestos nitrogenados exógenos. A continuación se presentan los resultados siguiendo la secuencia de objetivos. Los resultados obtenidos mediante PCR mostraron un producto del tamaño esperado de 359 pb correspondiente al fragmento del gen *nifH* (Figura 16), lo cual indicaría que las cepas poseen genes *nif*.



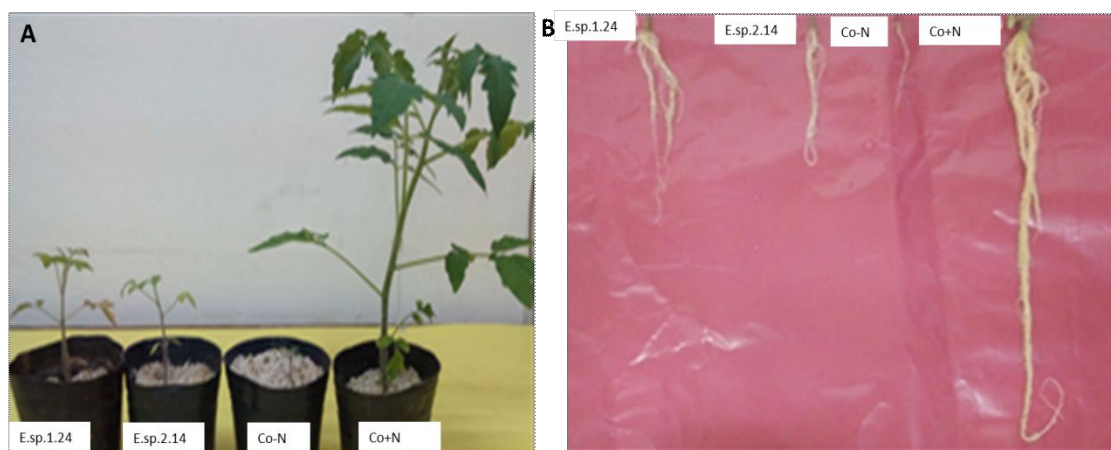
**Figura 16.** Reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *nifH*. Corrida electroforética del producto PCR del gen *nifH* de las cepas E.sp.2.14 (calle 1) y E.sp.1.24 (calle 2) en gel de agarosa/ bromuro de etidio. El producto de PCR de 359 pb se remarca con un círculo. (+) indica el control positivo DNA de *Azospirillum vinelandii*. La flecha señala la banda de 500pb del estándar de tamaño molecular (MPM) de 100pb (PB-L Productos Bio-Lógicos ®).

Por otro lado, el ensayo de crecimiento en medio NFb, nos permitió observar desarrollo celular después de 24 horas de incubación (Resultados no mostrados). Este resultado mostrando crecimiento en un medio libre de

nitrógeno fijado, indicaría que la nitrogenasa es funcional en las cepas, con un nivel de actividad suficiente para sostener el desarrollo bacteriano.

Para evaluar el crecimiento de tomate inoculado con las cepas e incubadas en un medio libre de nitrógeno exógeno se utilizaron dos grupos de plantas como controles, un grupo fue incubado sin el agregado de compuestos nitrogenados (Co-N) y el otro fue incubado en medio suplementado con nitrógeno ( $\text{KNO}_3$  8mM) (Co+N). El grupo de plantas experimentales fueron inoculadas con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, respectivamente, e incubadas en el sustrato libre de nitrógeno exógeno. Se evaluaron parámetros de crecimiento, biomasa y contenido foliar de N, P, K, Ca y Mg.

El aspecto de las plantas control y las plantas inoculadas con las cepas, evidenciaron síntomas de deficiencia nutricional tales como clorosis en hojas y nervaduras, menor área foliar, un menor sistemas radicular y un reducido vigor de las plantas (Figura 17 panel A-B). Estos resultados fueron confirmados con el análisis foliar, encontrando que el nivel de nitrógeno en el control e inoculadas se encuentran en el rango 0.7% y 1.05 %, mientras, que en las plantas crecidas en medio suplementado con nitrógeno fue del 3% (Figura 19, panel A). Esto indicaría que la deficiencia aparente comprende al menos al N.



**Figura 17. Plantas de tomate crecidas en ausencia de nitrógeno e inoculadas con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24. A:** Plantas representativas del ensayo. **B:** Raíces con los diferentes tratamientos. De izquierda a derecha planta inoculada con cepas E.sp.1.24 (E.sp.1.24-N), inoculada con cepa E.sp.2.14 (E.sp.2.14-N), planta control sin nitrógeno (Co-N) y planta control con nitrógeno (Co+N).

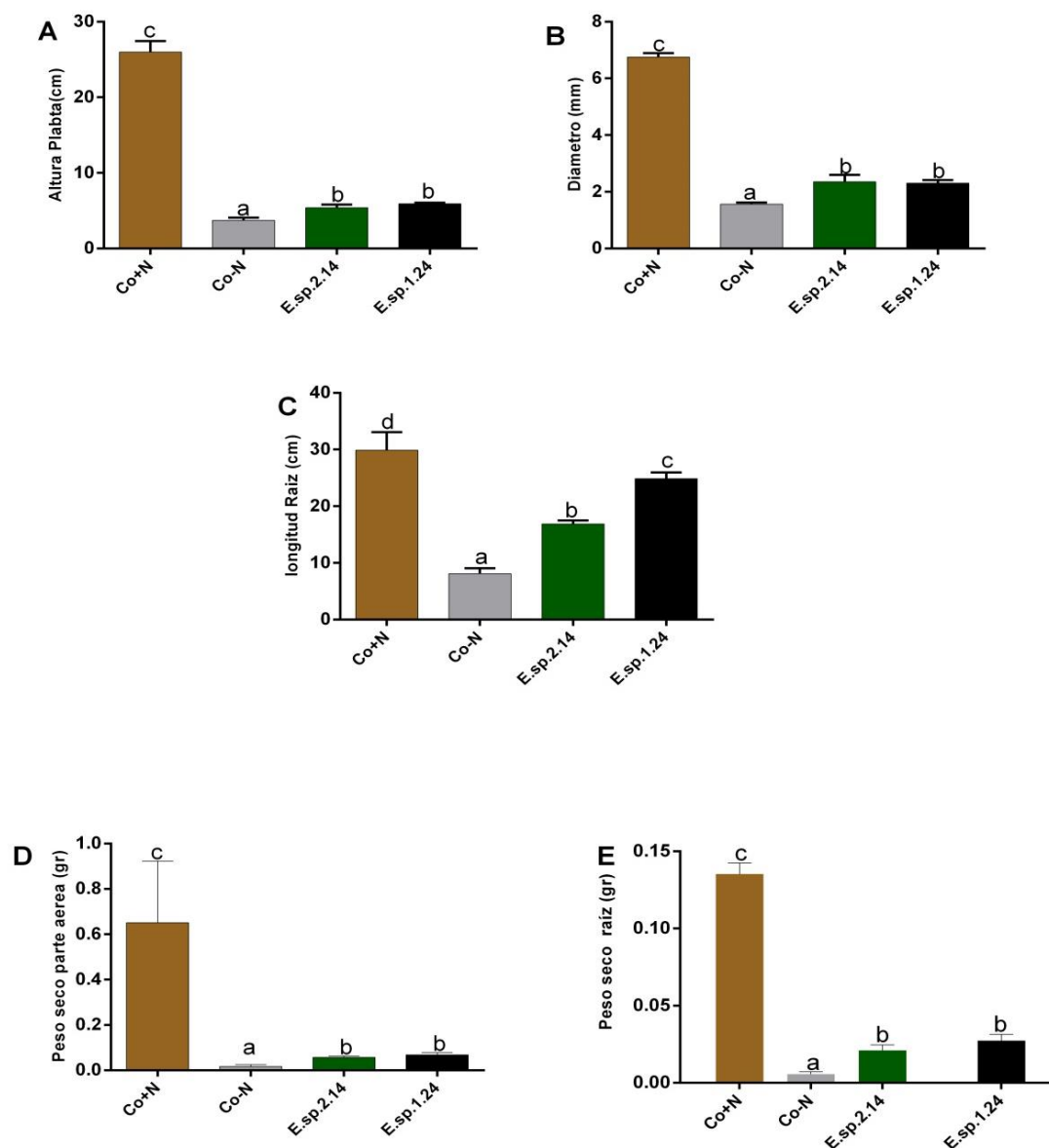
En la Figura 18 se presentan los resultados de la evaluación de variables fisiológicas indicadoras de crecimiento tales como: altura de planta, diámetro de tallo, longitud de raíz y peso seco de parte aérea y raíz. Estas variables fueron tomadas como referencia para evaluar la capacidad de promoción de



crecimiento de las cepas en asociación con tomate en situación de deficiencia de nitrógeno. Tomando en su conjunto a los parámetros de crecimiento, encontramos que la respuesta más alta con significancia estadística fue en las plantas del grupo control suplementado con nitrógeno, seguido de los tratamientos inoculados. Los aumentos registrados en todos los indicadores de crecimiento, presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) respecto al control sin nitrógeno.

Cuando se compararon los tratamientos inoculados, no se identificaron diferencias significativas entre las cepas, a excepción de la variable longitud de raíz donde la inoculación con E.sp. 1.24 registró la mejor respuesta.

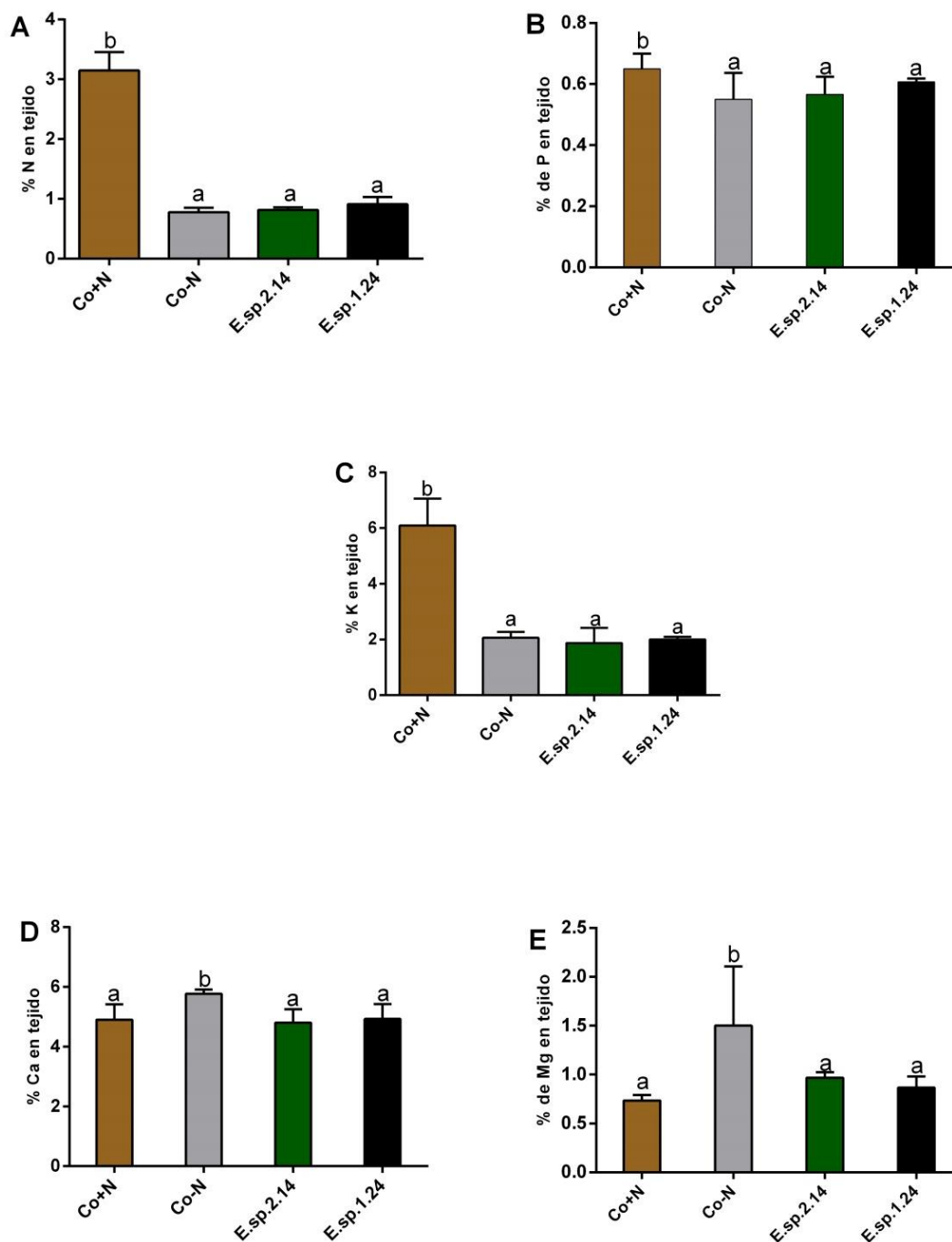
En las plantas inoculadas se registraron los siguientes aumentos respecto al control sin nitrógeno, para E.sp.2.14 y E.sp.1.24 respectivamente: altura de planta 8,5% y 6,4%, diámetro de tallo 11,6% y 10,7%, longitud de la raíz 29,3% y 56%, peso seco parte área 6% y 7,7% y peso seco de raíz 21,2% y 15,3%. Estos resultados indican que la inoculación tiene efectos positivos sobre el crecimiento de tomate, disminuyendo los efectos que provoca la deficiencia de nitrógeno.



**Figura 18. Efecto de la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 sobre el crecimiento de tomate.** En **A** se muestran los valores de altura de planta, **B** valores de diámetro de tallo, **C** evaluación de la variable longitud de raíz, en **D** y **E** peso seco de la parte aérea y raíz respectivamente peso. Se aplicó la prueba de Tukey en las diferentes variables, las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) y las letras (b, b) indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos. Control-N (plantas sin aplicación de nitrógeno exógeno), Control+N, Control con aplicación de nitrógeno exógeno, y plantas inoculadas con las cepas E.sp.1.24- E.sp.2.24 sin aplicación de nitrógeno exógeno respectivamente.

En la Figura 19 se muestran los valores del análisis foliar de N, P, K, Ca y Mg. Detectamos cambios significativos en los niveles de P, K en el control con nitrógeno comparado con control sin nitrógeno, mientras que los tratamientos inoculados no registraron diferencia significativas en comparación al control sin nitrógeno (Figura 19 panel B-C). Los niveles de Ca y Mg no mostraron diferencias significativas entre el control con nitrógeno y las plantas inoculadas

en medio sin agregado de compuestos nitrogenados, mientras que aumentaron significativamente en el control sin nitrógeno. El aumento de Ca y Mg en las plantas control sin nitrógeno quizás se debió a un desbalance fisiológico por el estrés provocado por la limitación de nutrientes nitrogenados.



**Figura 19. Niveles del contenido de N, P, K, Ca y Mg en hoja de tomate.** Los paneles A, B, C, D y E muestran respectivamente los valores porcentuales de Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca) y Magnesio (Mg). Las barras representan la desviación estándar. Se aplicó la prueba de Tukey, las letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) y las letras (a, a) indican diferencias no significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Lin *et al.* (2012) [202] muestran que cepas del género *Enterobacter sp* aisladas de caña de azúcar fueron inoculadas en la etapa inicial del cultivo de caña de azúcar, resultando en la contribución del 20% del nitrógeno requerido para el desarrollo de las plántulas en la primera etapa vegetativa. Además, aumentaron la biomasa y el crecimiento.

En nuestros ensayos observamos un aumento en los parámetros de crecimiento y peso seco que podría ser atribuido a la capacidad de las cepas para fijar nitrógeno y proporcionarlo a la planta. Sin embargo, el análisis foliar nos indicó que el aumento en el porcentaje de nitrógeno no fue significativo con respecto al control no inoculado, por lo que proponemos, que el crecimiento y aumento de la materia seca observada en las plantas de tomate en sustrato carente de nitrógeno se debe a otra actividad PGPR o a un conjunto de actividades PGPR de las cepas tales como fitohormonas, solubilización de fósforo etc, que provocan acumulación de materia. También podemos especular que la técnica utilizada para la determinación del nitrógeno en hojas no tiene la suficiente sensibilidad para poder cuantificar niveles relativamente bajos de aumento del nitrógeno producto de la fijación biológica de nitrógeno.

Podemos concluir que aunque la inoculación de tomate con las cepas en medio libre de nitrógeno exógeno se encontró asociada al aumento de los parámetros de crecimiento vegetal y de biomasa, el nivel de respuesta en crecimiento no alcanza al de las plantas crecidas sobre un medio suplementado con nitrógeno.

### **3.2 Determinación de actividad ACC desaminasa**

El etileno es una de las respuestas de las plantas a situaciones de stress ambiental, tanto biótica como abiótica. En relación con este mecanismo, la actividad ACC desaminasa que se encuentra en algunas bacterias con características PGPR, degrada el precursor de la síntesis del etileno (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), y así participa en el mantenimiento del nivel fisiológico aceptable para la sobrevivencia de la planta [44], [203]. Teniendo en cuenta este rol hallado en las bacterias PGPR se evaluó la actividad ACC desaminasa en las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24. Para ello se utilizó el protocolo descrito por Penrose y Glick (2003) [196] consistente en la cuantificación de  $\alpha$ -cetobutirato resultante del clivaje del ACC. Los resultados mostraron que la cepa control positivo produjo 0,7 nmoles de  $\alpha$ -cetobutirato mientras que las

cepas E.sp. 1.24 y E.sp. 2.14 exhibieron niveles de actividad muy bajos o indetectables (0,04 nmoles/h proteína), lo que demostraría que las cepas no expresan actividad de ACC desaminasa. Dado que la capacidad de promoción puede darse por diferentes mecanismos (fitohormonas, fijación de N, ACC desaminasa etc.), podemos inferir que en el caso de nuestras cepas es probable que la actividad ACC desaminasa no participe en la promoción de crecimiento vegetal, aunque encontramos necesario confirmar este resultado con evidencias provenientes de medidas *in vivo*.

### **3.3 Determinación de la actividad de enzimas líticas**

Se ha informado sobre la participación de ciertas enzimas líticas en el proceso de colonización de diferentes órganos de las plantas y en el control biológico contra patógenos [91], [204]–[207]. Considerando que se trata de exo-enzimas aplicamos un protocolo relativamente simple y de rápida realización para determinar las actividades de las enzimas líticas, algunas participan degradando pared de las hifas de hongos patogénicos mientras que otras degradan pared celular.

Las cepas fueron crecidas en medio LB hasta 1.4 U de DO<sub>600</sub>. Luego se tomó una alícuota de 20µL de esta suspensión bacteriana que se sembró en cada uno de los medios especializados para revelar las respectivas actividades enzimáticas. La composición de los diferentes medios de cultivos y los reactivos usados fueron descritos en Materiales y Métodos. A continuación se presenta una breve descripción de las características observables visualmente en estas determinaciones:

**Celulasas:** se observa un halo claro alrededor de la colonia, que se diferencia del color marrón del medio de cultivo.

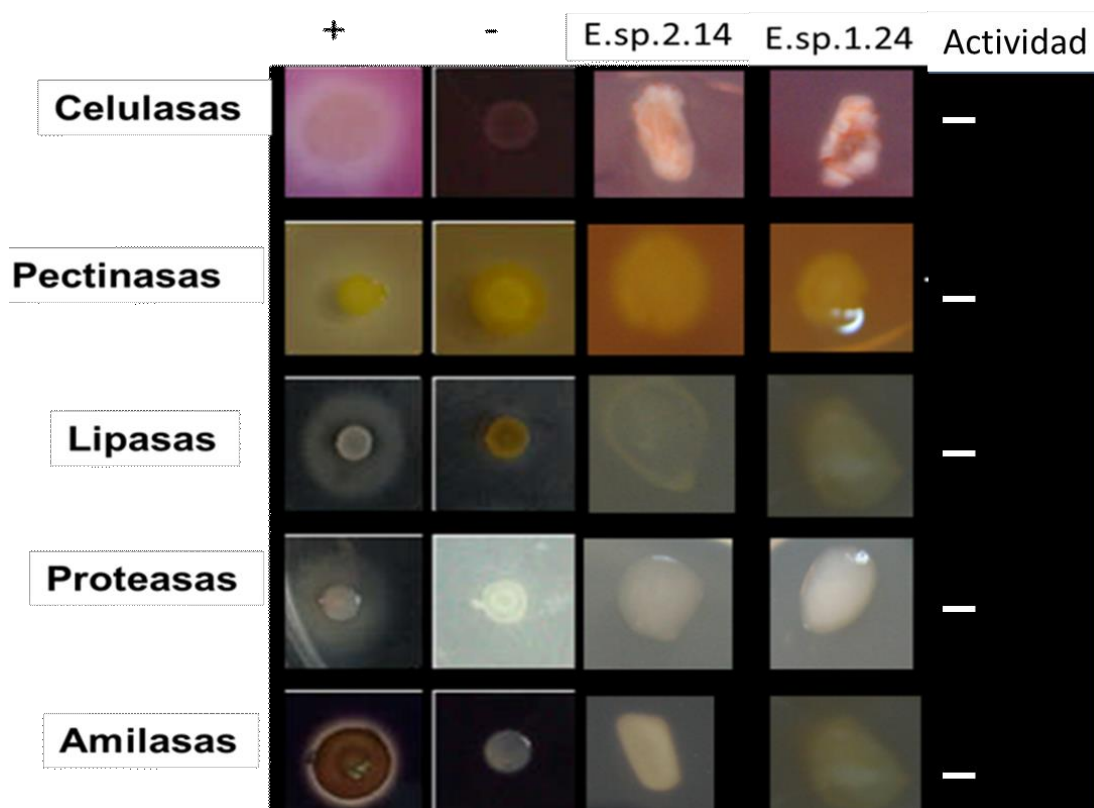
**Pectinasas:** se observa la decoloración del medio de cultivo alrededor de la colonia en el momento que se colocan los reactivos para revelar la actividad.

**Lipasas:** se observa la aparición de un precipitado alrededor de la colonia debido a la combinación entre Ca<sup>+2</sup> y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis, formándose monoesqueleto de calcio.

**Amilasas:** se observa la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, contra un fondo del medio color azul/violeta.

**Proteasas:** se observa un halo transparente alrededor de la colonia, lo cual indica hidrólisis de la caseína.

Las determinaciones de las actividades se presentan en la Figura 20. Los resultados del screening no mostraron actividad *in vitro* de celulasas, pectinasas, lipasas, proteasas y amilasas. Para confirmar este resultado se ensayaron variaciones en la concentración del inóculo inicial, las cuales resultaron nuevamente negativas.



**Figura 20. Screening de actividades enzimáticas de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24. (+):** Control positivo *Bacillus* sp; (-): Control negativo *Pantoea* sp.

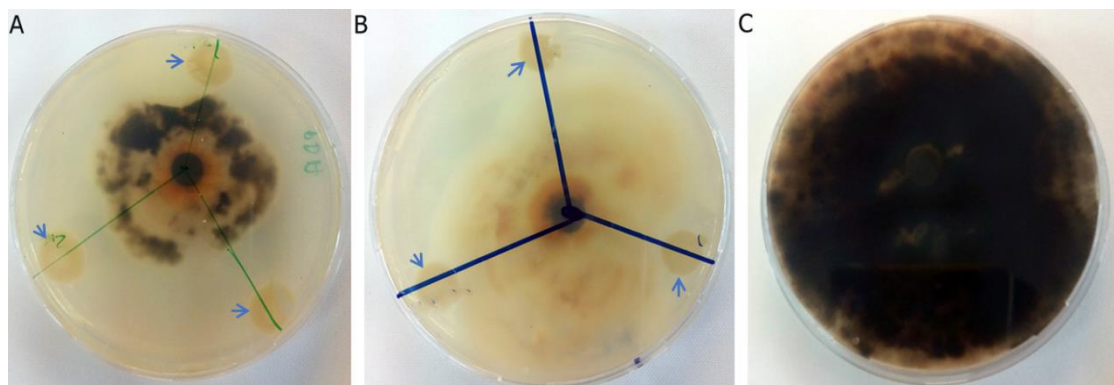
Estas enzimas han sido indicadas como protagonistas en el proceso de control biológico, teniendo en cuenta su actividad hidrolítica de pared de hongos y en su participación en el proceso de colonización de los tejidos internos de la planta mediada por las enzimas celulasas y pectinasas [89], [208], [209]. Nos resultó llamativo encontrar que nuestras cepas no expresan las actividades de enzimas líticas habiendo observado actividad PGPR en las mismas. Teniendo en cuenta que se ha descrito actividad en miembros del género *Enterobacter*, nuestros datos invitan a especular que el patrón de expresión *in vitro* e *in vivo* en asociación con la planta podrían ser distintos, y/o alternativamente sugiere que en el proceso de control biológico podrían estar actuando otros factores

aún ignorados como pueden ser la antibiosis o la producción de las enzimas quitinasas. Sin embargo, es válido referirse a lo descrito por Ahmad *et al.* (2013) [204] y Rodríguez *et al.* (2016) [210], en cuyos trabajos también encuentran que entre los aislamientos de caña de azúcar, tienen un grupo predominante que proviene de la rizosfera y que mostraron actividades líticas nulas en el screening. Contrariamente, el otro grupo de aislamientos con bacterias caracterizadas como endofíticas observaron resultados positivos en el ensayo de las actividades líticas. Algunos de los aislamientos con resultados de actividad nula fueron asignados filogenéticamente al género *Enterobacter* [204].

### **3.4 Evaluación de antagonismo *in vitro***

Con el propósito de evaluar la capacidad de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 para antagonizar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos, se realizó un ensayo *in vitro* usando el hongo *Bipolaris sorokiniana*, el cual es patógeno para trigo y otros cultivos. Se utilizó el siguiente protocolo: Las cepas fueron incubadas a 28 °C en medio LB con agitación, hasta alcanzar 1,4 U de DO<sub>600</sub>. El hongo patógeno fue crecido sobre medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Las placas PDA fueron divididas virtualmente en 3 sectores, en el centro de cada uno de estos sectores se depositaron 20µL de suspensión bacteriana y se incubó a 28 °C por 24 horas, a continuación se incorporó el patógeno en el centro de la caja de Petri, depositando un taco extraído del cultivo fúngico. Paralelamente se realizaron controles consistentes en placas inoculadas con solo el hongo.

Los resultados se presentan en la Figura 21. Se observó que en ausencia de bacterias, el desarrollo del hongo cubrió la caja, mientras que en las otras dos cajas que fueron inoculadas con las cepas, se pudo observar que el desarrollo fúngico estuvo restringido a la parte central e inhibido en las proximidades del desarrollo bacteriano, indicando que las cepas detienen el crecimiento del hongo revelándose como un halo de inhibición. Esta imagen se corresponde con una actividad antagónica de las cepas al crecimiento fúngico. Comparativamente, la inhibición por la cepa de E.sp.2.14 resultó mayor a E.sp.1.24.



**Figura 21.** Prueba de antagonismo *in vitro* entre el hongo *Bipolaris sorokiniana* y las cepas E.sp.2.14 (A), E.sp.1.24 (B). En C, control hongo patógeno sin presencia de las cepas. Las flechas indican los puntos de inoculación con las cepas.

Esta característica de las cepas de actuar *in vitro* como inhibidor del desarrollo fúngico es congruente con los datos reportados en la literatura los cuales indican que el género *Enterobacter* tiene capacidad de antagonizar el desarrollo fúngico [211], [212]. Este resultado es promisorio para el potencial uso de nuestras cepas como biocontrolador. Sin embargo es sabido que no siempre este resultado *in vitro* correlaciona con el biocontrol en condiciones naturales. Una diversidad de factores ambientales regulan la producción de metabolitos antifúngicos por lo cual es posible también que el perfil de expresión de este carácter no sea igual en las condiciones *in vitro* y naturales.

### **3.5 Evaluación de las cepas en su capacidad de solubilizar fósforo asociadas con tomate**

Con el propósito de evaluar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de tomate en un medio con fósforo insoluble (fosfato tricálcico) como única fuente de fósforo, se realizó el siguiente ensayo:

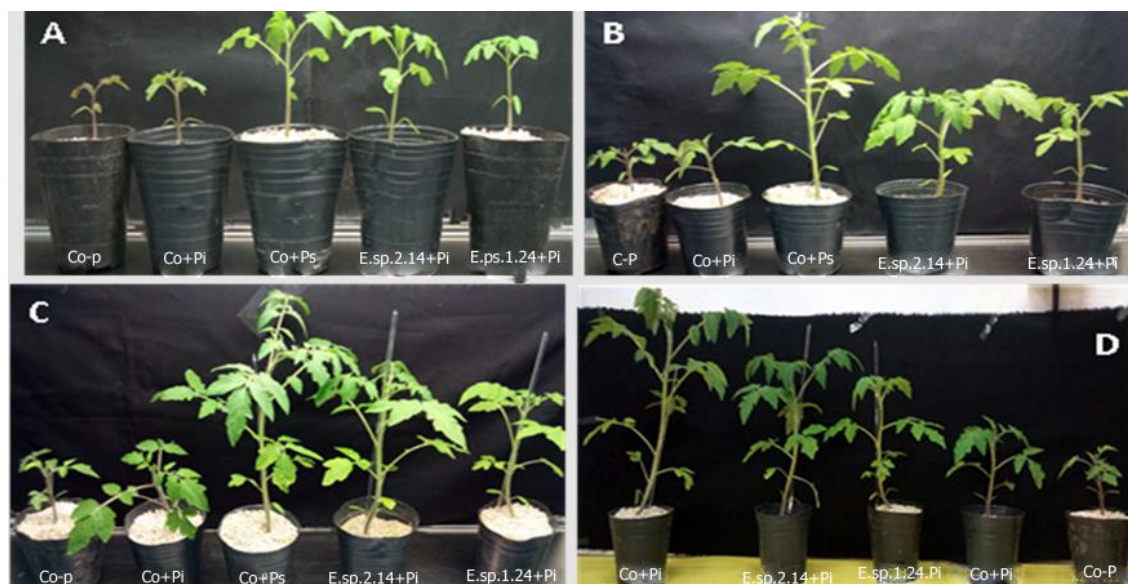
a) Plantas control: 1- carentes de fósforo (Co-P), 2- con fósforo asimilable (Co+Ps) suplementado con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7M y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.84M, 3- con fósforo insoluble (Co+Pi), suplementado con fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )

b) Plantas experimentales en medio suplementado con fosfato tricálcico e inoculadas separadamente con las cepas E.sp.2.14 (E.sp.2.14+Pi) y E.sp.1.24 (E.sp.1.24+Pi).

Se evaluaron cuantitativamente las siguientes características de las plantas: altura de planta, diámetro de tallo, longitud de raíz, peso seco y niveles de N y P en tejido foliar.



El aspecto externo de las plantas se muestra en la Figura 22, mientras que los datos cuantitativos de los parámetros de crecimiento se muestran en la Figura 23. Los mayores aumentos se registraron en las plantas control que se desarrollaron en el soporte con fósforo asimilable (Co+Ps). Por el contrario, las plantas control incubadas en medio carente de fósforo, exhibieron los valores más bajos.



**Figura 22. Ensayo de inoculación de tomate con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, en medio suplementado con fosfato tricálcico. Las fotografías muestran plantas representativas del ensayo: Panel A: A los 12 días PI; Panel B: a los 20 días PI; Panel C: 25 días PI; Panel D: 35 días PI. Abreviaturas: Co-P, plantas tratamiento control sin fósforo, Co+Pi, plantas control con fosfato tricálcico, Co+P, plantas control con fósforo asimilable, E.sp.2.14+FT, plantas inoculadas con E.sp.2.14 más fosfato tricálcico), E.sp.1.24+FT, plantas inoculadas con E.sp.1.24 más fosfato tricálcico.**

El aumento de altura de planta fue estadísticamente significativo en los tratamientos Co+Ps, Co+Pi y en los tratamientos inoculados con las cepas con respecto al Co-P. La inoculación con las cepas mostró estimulación sobre la altura de planta con aumentos significativos del 67% en la cepa E. sp 2.14 y 32% cepa E.sp. 1.24, comparadas con Co+Pi.

El aumento del diámetro de tallo, fue significativo en las plantas inoculadas con E.sp.2.14 (35%) respecto al Co+Pi, por el contrario, no resultó estadísticamente significativo el aumento del 4.5% en el grupo de plantas inoculadas con la E.sp.1.24.

La longitud de raíz no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, ni con Co-P.

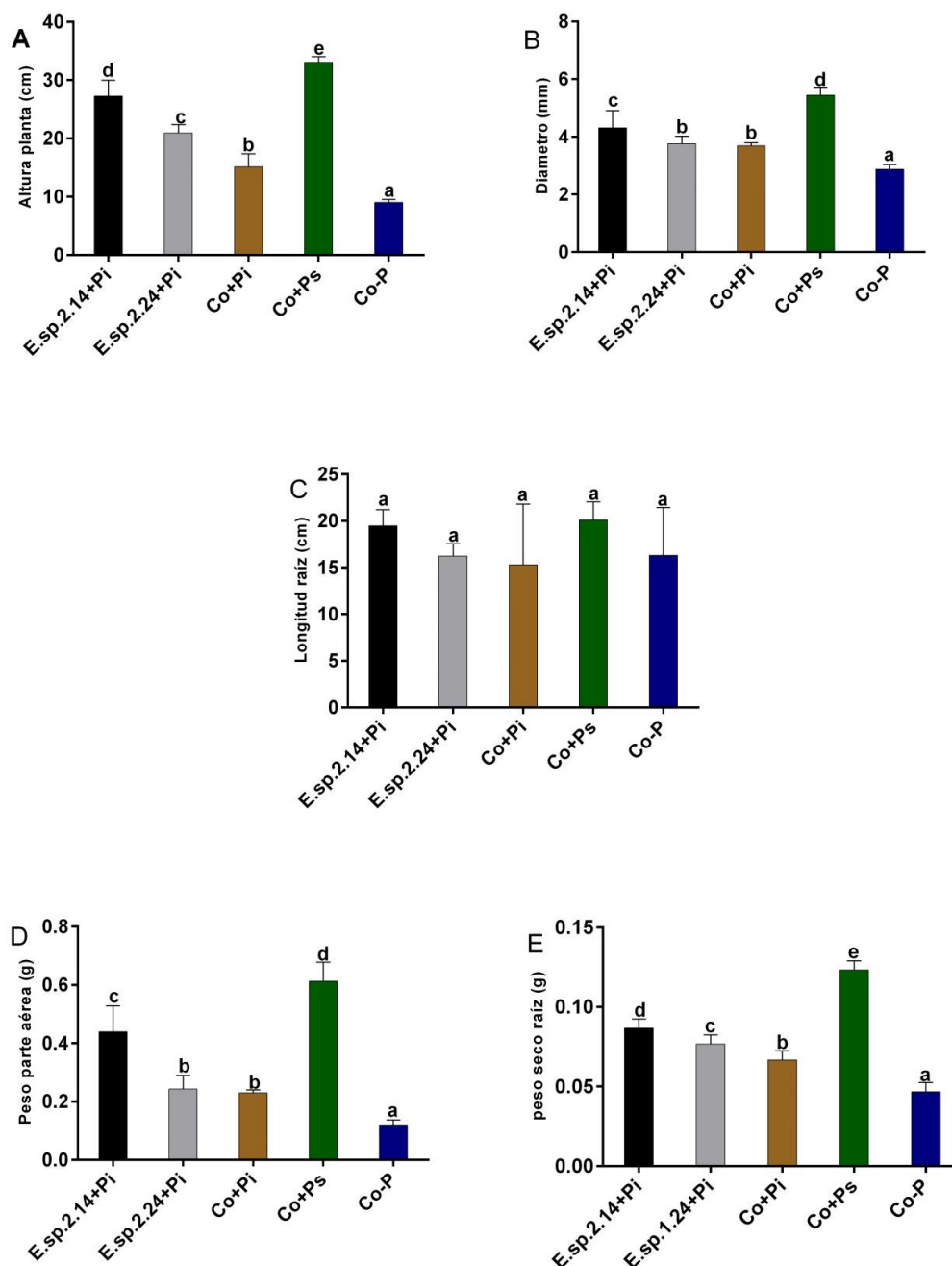
El peso seco de las plantas inoculadas en medio con fosfato tricálcico mostró aumento significativo con respecto Co+Pi y el aumento fue: E.sp.2.14 peso parte aérea 91% y en raíz aumento 28,5% y en las plantas inoculadas con la cepa E.sp.1.24 aumentó un 20% y 4,5% respectivamente. Este resultado indica que la inoculación está asociada al aumento de peso seco cuando la planta se desarrolla sobre un soporte cuya forma de fósforo es la insoluble. Se observó que la respuesta del tratamiento inoculado con la cepa E.sp.2.14 es superior al tratamiento inoculado con la cepa E.sp.1.24 (Figura 23 panel D y E).

En síntesis, las plantas en un soporte con fósforo insoluble como única fuente e inoculadas con los aislamientos, presentaron aumentos en las variables de crecimiento, esto indicaría que también en el cultivo de tomate la inoculación con nuestras cepas se expresa la capacidad para solubilizar y asimilar fósforo, la cual fuera demostrada para poroto en los ensayos *in vitro* reportados por Collavino *et al* (2010) [46]. Nuestros resultados amplían el espectro de plantas que son beneficiadas por la capacidad solubilizadora de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24.

Observamos que la respuesta de desarrollo más alta fue registrada en el grupo de plantas creciendo sobre medio suplementado con la fuente soluble de fósforo, lo cual indicaría que la capacidad de promoción de crecimiento de las cepas con fosfato tricálcico, no alcanza a satisfacer las demandas de tomate.

Los resultados del análisis foliar mostraron un aumento estadísticamente significativo en el contenido de nitrógeno en las plantas inoculadas con las cepas respecto al Co+Pi (Figura 24-A). Contrariamente en los tratamientos Co+Pi y Co-P exhibieron una disminución significativa en el contenido de nitrógeno con respecto a las plantas inoculadas y el tratamiento Co+Ps (Figura 24-A). Estos resultados estarían sugiriendo que las cepas al provocar el aumento del aparato radical, indirectamente estimularían una mayor absorción de compuestos nitrogenados hacia los tejidos efecto que acompañarían sinérgicamente a la solubilización y asimilación de P mediado por las PGPRs. Por otra se ha reportado que las auxinas (AIA) estimulan un mayor crecimiento de la raíces, mayor número de raíces secundarias y mayor longitud de pelos radicales lo que conlleva un aumento de la absorción de los nutrientes del suelos y ayuda a un mejor crecimiento de la planta [50], [51], [213]. Nuestras cepas tienen capacidad de producir AIA *in vitro* [46] y posiblemente esta

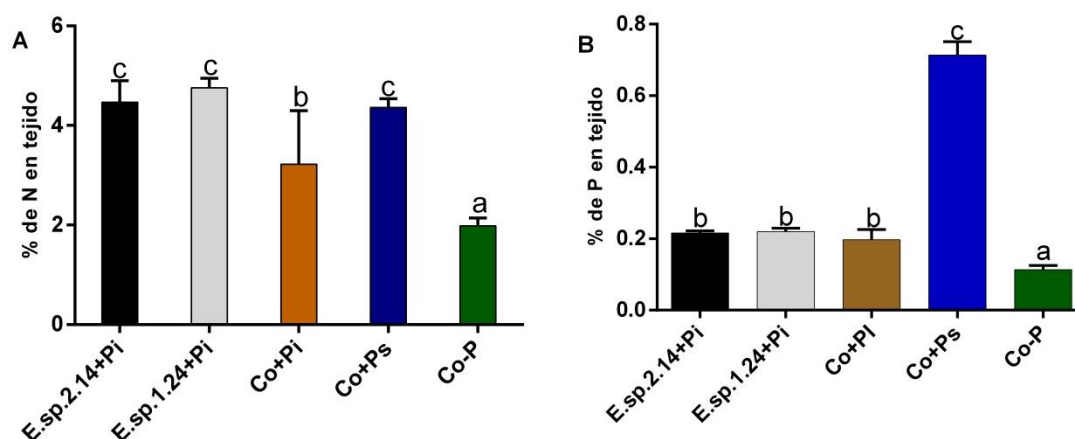
actividad se esté dando en su asociación con tomate, la cual estaría modificando la morfología de la raíz para aumentar la absorción de nitrógeno y otros nutrientes.



**Figura 23. Efecto de inoculación de tomate con las cepas *E.sp.2.14* y *E.sp.1.24* en medio con fosfato tricálcico.** Se evaluó: Altura de plantas (A); Diámetro de tallo (B); longitud de raíz (C), peso seco parte aérea (D) y raíz (E). Se aplicó la prueba de Tukey; las letras diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Las abreviaturas: **Co-P**, plantas tratamiento control sin fósforo; **Co+Pi**, plantas control con fosfato tricálcico; **Co+Ps**, plantas control con fósforo asimilable, **E.sp.2.14+Pi** plantas inoculadas con la cepa *E.sp.2.14* más fosfato tricálcico; y **E.sp.1.24+Pi**, plantas inoculadas con la cepa *E.sp.1.24* más fosfato tricálcico.

Los tratamientos Co+Pi y Co-P exhiben un menor contenido de nitrógeno, una posible explicación es que el efecto de la limitación de fósforo se extiende a la asimilación de nitrógeno afectando su nivel en hoja. Reich *et al.* (2009) [214] indicaron que en los ecosistemas y los suelos con disponibilidad limitada de fósforo, la disponibilidad y asimilación de nitrógeno pueden resultar afectadas negativamente.

Con respecto al contenido foliar de fósforo, se observó que el tratamiento Co+P exhibe el mayor contenido, mientras Co-P presenta la menor acumulación de fósforo. Las plantas de los tratamientos inoculados con las cepas, creciendo sobre fosfato tricálcico, registraron un aumento del 10% del fósforo en tejido, pero sin significancia estadística respecto al no inoculado (Figura 24 B).



**Figura 24. Niveles foliares de N y P en tomate.** Los gráficos de los paneles **A** y **B** muestran los niveles en porcentaje de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) en tejido respectivamente. Se aplicó la prueba de Tukey, las letras (a, b y c) indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) y las letras (b, b) indican diferencias no significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras de color negro representan la desviación estándar de los tratamientos. Las abreviaturas **Co-P** (plantas tratamiento control sin fósforo), **Co+Pi** (plantas control con fosfato tricálcico), **Co+Ps** (plantas control con fósforo asimilable), **E.sp.2.14+Pi** (plantas inoculadas con la cepa E. sp.2.14 más fosfato tricálcico) y **E.sp.1.24+Pi** (plantas inoculadas con la cepa E.sp.1.24 más fosfato tricálcico).

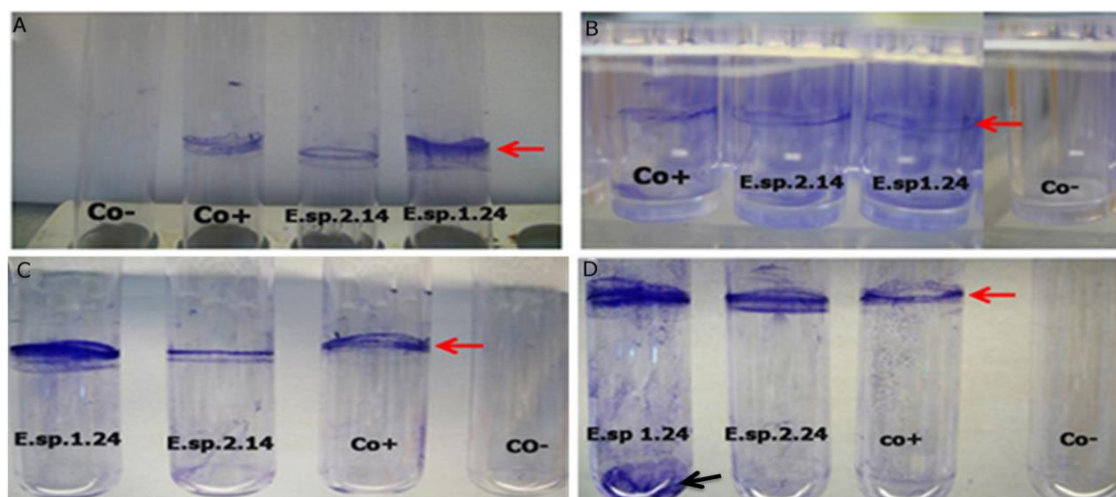
### 3.6 Formación de biofilm

Se ha propuesto que la colonización eficiente de las raíces de las plantas es una cualidad deseable para lograr un comportamiento exitoso en prácticas agrícolas y protección del sistema radical a patógenos [215], [216]. Esta colonización implica el desarrollo bacteriano para formar microcolonias o biofilms [217]. Lo expuesto anteriormente nos generó el interrogante si las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 tienen la capacidad de formar biofilm. Como una

primera aproximación encaramos en esta sección la respuesta examinando la formación de biofilm sobre superficies abióticas.

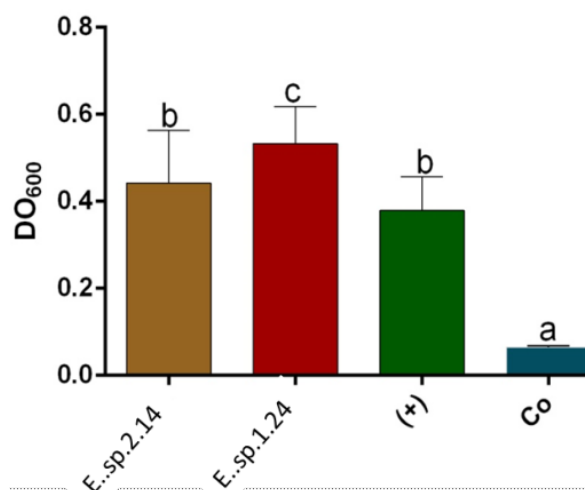
Para evaluar la formación de biofilm aplicamos dos estrategias experimentales : 1- caracterización cuantitativa del biofilm formado en superficies abióticas (vidrio y poliestireno) en medio de cultivo LB mediante la técnica de tinción con cristal violeta [193]; 2- caracterización cualitativa del biofilm mediante técnica de microscopía de escaneo láser confocal [194].

Usando tubos de ensayo de vidrio, se evaluó la adhesión del desarrollo bacteriano de E.sp.2.14 y E.sp.1.24, y del control *B. tropica*, a distintos tiempos de incubación, mediante la tinción con cristal violeta. Esto permitió observar la tinción de la biomasa adherida a las paredes del tubo, en particular un marcado incremento de color a las 12 hs (Figura 25-A). Este período de 12 horas, fue tomado como tiempo satisfactorio para examinar y revelar la adhesión de las bacterias a la superficie abiótica. Encontramos que las dos cepas ensayadas tienen capacidad de formar biofilm en la zona de la interface aire-liquido (Figura 25). La formación de biofilm por parte de las cepas E.sp.1.24 y E.sp.2.14 también la observamos sobre otra superficie abiótica que fue poliestireno, encontrando resultados similares a los de la superficie de vidrio (Figura 25-B). Además, a las 72 horas, la cepa E.sp.1.24 formó un precipitado observable en la base del tubo, que no fuera observado en el control positivo ni en la cepa E.sp.2.14 (Figura 25-D)



**Figura 25.** Biofilm formado por cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 sobre superficies inertes (A, C y D vidrio y B poliestireno). En **A y B** biofilm a las 12 hs, **C** biofilm 24 hs y **D** 72 horas de incubación a 28 °C. Las flechas color rojo marcan el biofilm formado en la interface aire-líquido y la flecha color negro marca el precipitado formado por la cepa E.sp.1.24 en la base del tubo a las 72 horas.

Por otra parte, se cuantificó espectrofotométricamente el biofilm a las 24 horas, mostrando la cepa E.sp.1.24 mayor acumulación de biofilm, siendo estadísticamente significativo con respecto al control positivo de biofilm y a la cepa E.sp.2.14 (Figura 26). La cepa E.sp.2.14, no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control



**Figura 26.** Evaluación cuantitativa de biofilm por las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24. La determinación de DO, se realizó a las 24 hs de incubación en medio de cultivo LB. (+) Control positivo *Burkholderia tropica*; Co, control negativo medio LB

Podemos concluir que las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 tienen la capacidad de desarrollar biofilm sobre las superficies de poliestireno y vidrio, por lo que se puede especular que esta característica podría favorecer la colonización de las raíces y proteger al sistema radical contra ataques de patógenos [76], [218]–[220]. La característica de formación biofilm es deseable en las bacterias PGPR que se inoculan en el suelo ya que el biofilm las protegería de condiciones ambientales adversas tales como alta salinidad, concentraciones de taninos, pH ácido o alcalino, metales pesados, la depredación de las lombrices de tierra, competencia por las poblaciones nativas del suelo [221], y resistencia a protozoos [222].

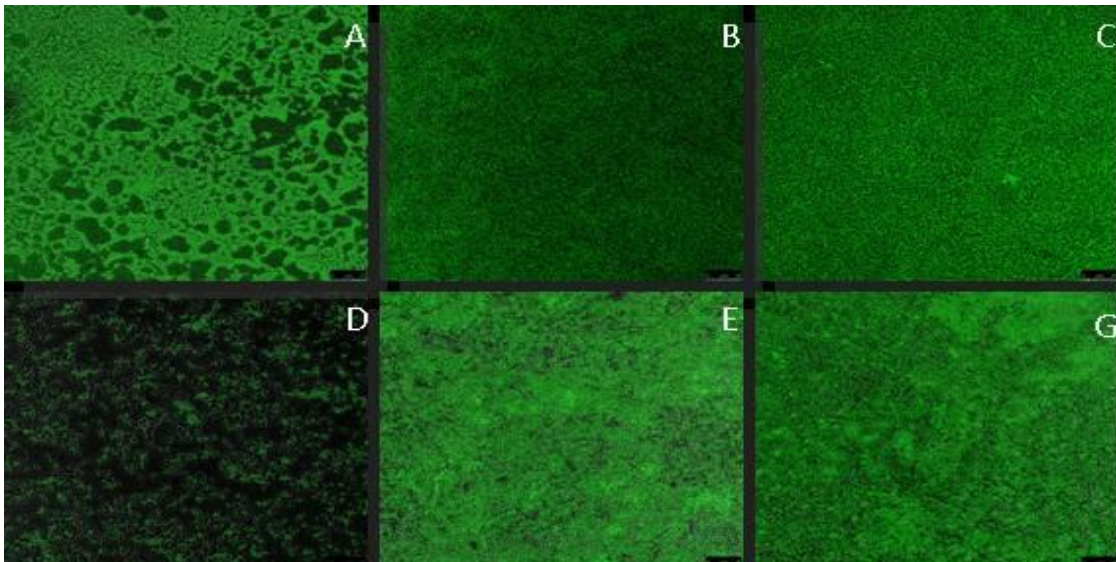
### **3.6.1 Evaluación de la formación de biofilm por microscopía**

Para estudiar por microscopia la formación de biofilm, se realizaron ensayos sobre portaobjetos de vidrio parcialmente sumergidos en medio de cultivo LB inoculado separadamente con las cepas E.sp.2.14-GFP y E.sp.1.24-GFP. Seleccionando una banda de emisión entre 504-550 nm correspondiente a la



longitud de onda de emisión de la *GFP* se observaron selectivamente las bacterias marcadas formando el biofilm. La utilización de cepas que expresan el marcador GFP facilitó su detección.

A las 12 horas de incubación se observaron bacterias fluorescentes adheridas a la superficie, exhibiendo en la interface liquido-aire formaciones asimilables a estructuras organizadas (Figura 27 A y D); a las 24 hs (Figura 27 panel B-C) se observaron agrupaciones formadas por una mayor cantidad de bacterias, y con un ordenamiento mayor. No fue posible distinguir a las bacterias en forma individual ya que se encontraban inmersas en material denso extracelular que se puede interpretar corresponda a la matriz del biofilm. A las 72 hs las bacterias se encontraron formando agregados en la matriz del biofilm (Figura 27 panel E-G).

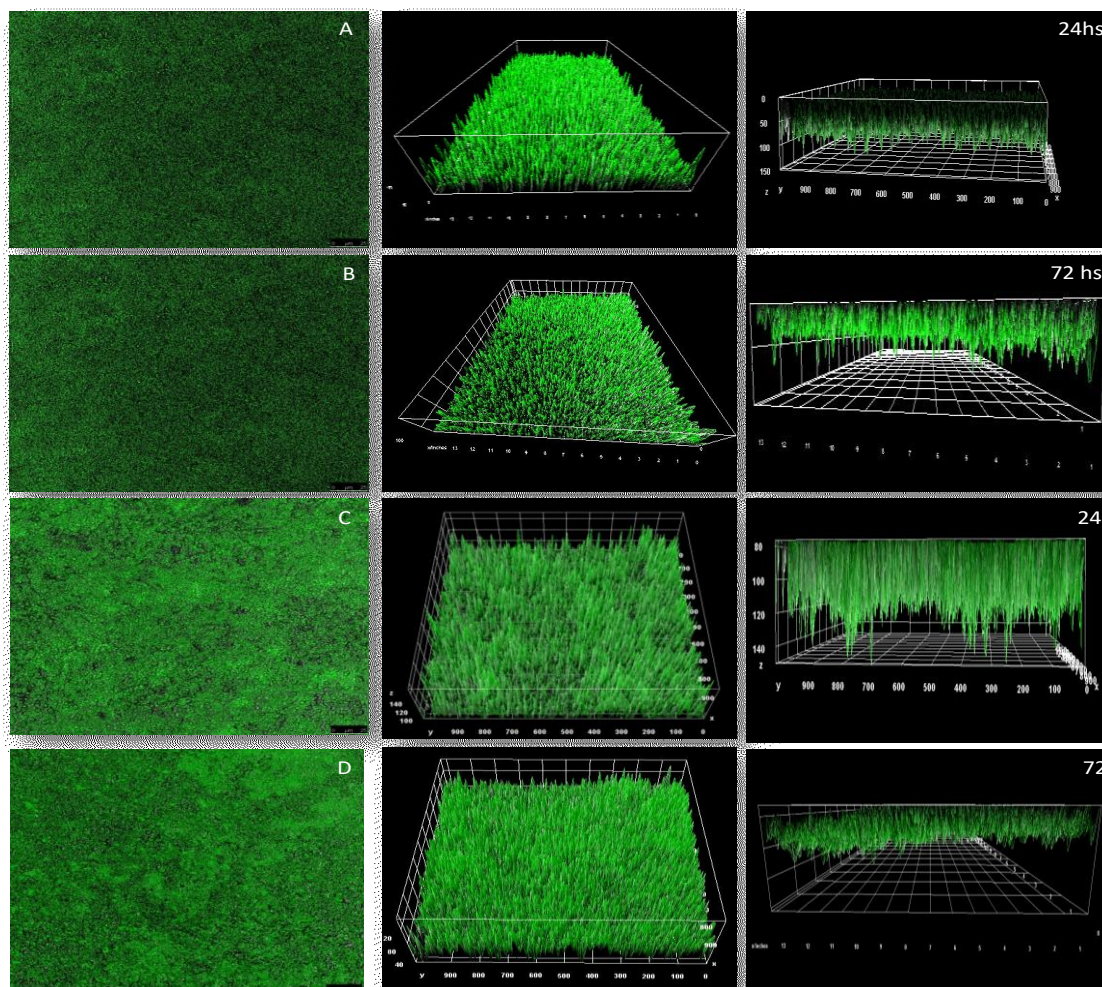


**Figura 27.** Imágenes de Confocal de cepas *E.sp.2.14-GFP* (A, B, C) *E.sp.1.24-GFP* (D, E, G) crecida sobre portaobjetos sumergidos parcialmente por 12 hs (A-D), en B-E 24 hs y C-G 72 hs. Barra: 25  $\mu$ m.

Se obtuvieron imágenes en diferentes planos a través del eje z imágenes a partir de los datos stacks (conjunto de imágenes consecutivas en el eje z) que nos permitió capturar los distintos planos del biofilm que fueron útiles para visualizar la estructura y el tamaño tridimensional (Figura 28).

Las imágenes obtenidas después de su procesamiento digital con los programas correspondientes se muestran en la Figura 28. A las 24 horas, se observaron bacterias adheridas a la superficie de vidrio formando pequeñas agrupaciones celulares o microcolonias típicas de la estructura de biofilm, y

cuyo espesor fue estimado en 11 y 9,9  $\mu\text{m}$  para las cepas E.sp.2.14-*GFP* y E.sp.1.24-*GFP*, respectivamente (Fig. 28 A y C).



**Figura 28.** Imágenes del biofilm obtenidas por microscopía confocal de las cepas E.sp.2.14-*GFP* (A, B) y E.sp.1.24-*GFP*. (C, D). A las 24 horas (A, C), 72 horas (B, D) de cultivo. Plano x-y (Izquierda). Reconstrucción volumétrica en 3D de la serie de imágenes tomadas en secciones del eje z (stacks en z) (Centro y derecha). Barra: 25  $\mu\text{m}$ .

Mientras que a las 72 hs de incubación, el biofilm se observó estructuralmente más complejo y compacto cubriendo la mayor parte de la superficie, con un espesor promedio de 14.8 $\mu\text{m}$ , para las dos cepas. Estas características se corresponden con las de un biofilm maduro.

Podemos concluir que las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 desarrollan biofilm sobre superficies abióticas. Además, haciendo uso de técnicas microscópicas se determinó que la complejidad estructural y espesor del biofilm aumentan en el tiempo en las 72 horas de incubación.

A partir de estos resultados encontramos conveniente encarar futuros ensayos *in vivo* inoculando raíces con cepas marcadas, así como la construcción de cepas mutantes defectivas, por ejemplo en la producción de exopolisacáridos,



para determinar su contribución y rol en la formación de biofilm y eventualmente evaluar el efecto sobre la colonización de las raíces por parte de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24. Por otra parte, resulta interesante evaluar si esta capacidad de formar biofilm sobre superficies abióticas se extiende también a sistemas vivos, y cuál sería el aporte del biofilm en los procesos de colonización y protección de los sistemas radicales en cultivos de interés agronómico.

### **3.7 Resumen de actividades PGPR de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 in vitro**

En la Tabla 10 se presentan las propiedades de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, listando los datos obtenidos en este trabajo y los reportados previamente en los estudios de Collavino *et al.* (2010) [46].

**Tabla 10.** Resumen de las actividades de promoción de crecimientos de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24

| Actividad Fisiológica                                | Cepa      |           |
|--|-----------|-----------|
|  | E.sp.2.14 | E.sp.1.24 |
| Solubilización fosfatos*                             | +         | +         |
| Producción de ácido indol acético *                  | +         | +         |
| Capacidad de fijación de nitrógeno                   | +         | +         |
| Actividad de ACC desaminasa                          | -         | -         |
| Antagonismo de patógeno <i>Bipolaris sorokiniana</i> | ++        | +         |
| Formación de Biofilm                                 | +         | ++        |
| Actividad de Celulasas                               | -         | -         |
| Actividad de Pectinasas                              | -         | -         |
| Actividad de Amilasas                                | -         | -         |
| Actividad de Lipasas                                 | -         | -         |
| Actividad de Proteasa                                | -         | -         |

(+) Positivo para la actividad fisiológica y (-) indica que no tienen actividad fisiológica

\* Indica las actividades PGPR reportadas por Collavino *et. al* (2010) [46].

### 3.8 Conclusiones

Con el propósito de identificar actividades PGPR en las cepas E.sp2.14 y E.sp.1.24 se demostró que poseen el gen *nifH* y la nitrogenasa es funcional, para sostener el crecimiento de las bacterias en el medio libre de nitrógeno exógeno. En ensayos con tomate, la inoculación con las cepas provoca el aumento de los parámetros de crecimiento vegetal y biomasa en medio libre de nitrógeno exógeno.

El análisis foliar no reveló mayor nivel de nitrógeno en el caso de la inoculación, lo cual indica que el aumento en los parámetros de crecimientos no estarían relacionados con la fijación biológica de nitrógeno, probablemente se deba a otros mecanismos de promoción de crecimiento que tienen las cepas (fitohormonas, ACC desaminasa, solubilización de fosforo etc.).

Por otra parte, no se detectó *in vitro* actividad de ACC desaminasa, celulasas, pectinasas, lipasas, proteasas y amilasas. Algunas de estas enzimas (proteasas) participan en la inhibición directa del crecimiento de las hifas de hongos fitopatógeno mientras otras (celulasas, pectinasas) median en el proceso de penetración de las bacterias en el interior de los tejidos vegetales. Nuestros resultados son interesantes desde varios puntos de vista teniendo en cuenta la información que nos es disponible sobre PGPRs y sus mecanismos de promoción. Esto sugiere la adopción de precaución al momento de extrapolar la validez de resultados de ensayos *in vitro* con el potencial desempeño *in vivo* de los microorganismos. Teniendo en cuenta que algunas enzimas experimentan mecanismos de regulación, podría inferirse que el patrón de expresión *in vitro* e *in vivo* difieren entre si dependiendo de la presencia de inductores de la expresión (caso ACC deaminasa). La presencia de determinados componentes en el exudado radical de las diversas especies ensayadas en este trabajo puede eventualmente actuar como inductor de algunas enzimas, y naturalmente también como sustrato que favorece la proliferación en la superficie radical formando biofilm. Es entonces, recomendable encarar ensayos inoculando especies vegetales para evaluar la respuesta *in vivo*.

Por otro lado, se ha informado variabilidad del comportamiento de las PGPRs dentro de miembros pertenecientes a una misma especie. Por ejemplo, varias cepas de *Pseudomonas fluorescens* pueden promover el crecimiento vegetal

mientras otras cepas no expresan efecto alguno sobre la planta [223]. En ensayos descritos por Ahmad *et al.* (2013) [204] sobre una colección de aislamientos filogenéticamente diversos de la rizosfera de maíz que mostraron eficiente actividad de PGPR, se encontró que uno de los mismos asignado al género *Enterobacter sp.*, resultó negativo en la determinación *in vitro* de actividades líticas. Rodríguez *et al.* (2016) [210] han reportado resultados similares con aislamientos rizosféricos de maíz identificados como *Enterobacter sp.* Se puede especular que el perfil de expresión *in vitro* de las enzimas determinadas en este trabajo, sea divergente del perfil *in vivo*, y también del descrito para algunos aislamientos identificados como pertenecientes al género *Enterobacter*. Por ejemplo, se ha descrito actividad amilasa en cultivos *in vitro* de *Enterobacter sp.* mientras, que nuestros ensayos resultaron negativos. Esto en su conjunto, indicaría que el demostrado efecto PGPR encontrado en E.sp.2.14 y E.sp.1.24 resultaría de actividades diferentes a las enzimas examinadas, probablemente por la acción combinada de capacidades tales como solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno, eficiente colonización de la superficie radical y formación de biofilm. La identificación y descripción de las actividades y los determinantes genéticos de las propiedades benéficas para plantas son desafíos actuales. Cuántos y cuáles de los factores bioquímicos y genéticos de las PGPRs son requeridos para expresar cualidades promotoras de crecimiento vegetal. En un trabajo informado por Bruto *et al.* (2014) [224], examinan la presencia de 23 genes señalados como participantes de la actividad PGPR en el genoma de 25 especies microbianas PGPR, concluyendo que ninguno de los 23 genes son compartidos por todas las diversas especies examinadas cuyos genomas están disponibles. Esto sugiere que las PGPRs actúan usando distintos mecanismos sea individualmente o resultante de su combinación y entendemos que nuestros resultados ilustran esta conclusión. El contenido de nitrógeno en los tratamientos inoculados con las cepas en sustrato con fosfato tricálcico fue mayor que en el control con fosfato tricálcico, este resultado podría estar relacionado con la capacidad de las cepas para producir AIA que estimularía un mayor número de raíces secundarias y una mayor longitud de pelos radicales [51], [225] lo que conllevaría a aumentar la absorción de nutrientes.

Se ha mostrado un interés creciente en el uso de biofertilizantes que comprenden microorganismos beneficiosos estimulantes del crecimiento de la planta de forma “amigable” con el ambiente y que contribuya a la productividad del suelo [226]. Sin embargo, teniendo en cuenta los casos que no registran respuesta al inóculo microbiano ha limitado su aplicación comercial generalizada, muy probablemente se debe a la incapacidad de los inóculos para competir exitosamente con la microflora nativa de los suelos y para establecerse en la rizosfera [227], [228]. El fracaso a la introducción de inoculantes bacterianos podría deberse a la incapacidad de formar biofilms.

Los biofilms actuarían protegiendo las PGPRs contra condiciones extremas tales como alta salinidad, concentraciones de tanino, pH, metales pesados, depredación y la competencia con las poblaciones nativas del suelo [229] [222]. Podemos concluir que la capacidad de formación de biofilm por las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 es una característica deseada que les podría dar ventajas en la colonización de los tejidos radiculares.

Podemos concluir que las cepas tienen un gran potencial para ser utilizadas como biofertilizantes en cultivos de interés agronómico y esto traería beneficio económico ya que se podría reducir la aplicación de agroquímico en los agroecosistemas. Estos ensayos son preliminares y necesarios para avanzar en una evaluación a campo.

## **CAPÍTULO IV**

### **Caracterización de la asociación de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 con tomate y trigo**

Ciertas propiedades biológicas identificadas como características propias de las PGPR están asociadas a la capacidad de colonización de las raíces. En este capítulo se describen, los resultados de examinar el tipo de asociación de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 con trigo y tomate en condiciones de asepsia y de cultivo en suelos. Además, se muestran los resultados de los ensayos de sobrevivencia de las cepas en suelos de la Provincia de Buenos Aires

### **Objetivos**

- ✓ Caracterizar la asociación de las cepas. E. sp. 2.14, E. sp. 1.24 con trigo-tomate y evaluar la sobrevivencia de las cepas en diferentes suelos.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Investigar la asociación entre las cepas y la planta, mediante técnicas de microscopía y dependientes del cultivo.
- ✓ Evaluar la capacidad para colonizar las raíces de plantas crecidas en suelo.
- ✓ Evaluar la sobrevivencia de las cepas en suelos de la Provincia de Buenos Aires.

## **4. Resultados y Discusión**

### **4.1 Ensayos de interacción planta-microorganismo**

Se ha propuesto que la falta de respuesta a la inoculación con bacterias PGPR generalmente es atribuible a la incapacidad de los microorganismos para colonizar eficientemente las raíces de las plantas [153]. Atento a esos antecedentes nos propusimos examinar la naturaleza de la asociación de las cepas con tomate y trigo aplicando dos criterios de análisis alternativos. Por un lado, se evaluó la asociación con plantas de trigo y tomate post-inoculación en las condiciones de asepsia descritas en Materiales y Métodos. Por otro lado, en experimentos sobre suelo no estéril se estimó las poblaciones bacterianas en los extractos de raíz y tallo con y sin esterilización superficial, respectivamente. Mediante microscopía de fluorescencia, confocal y microscopía de campo claro se realizaron observaciones de tejidos vegetales post-inoculación. Para facilitar la observación microscópica encaramos experimentos previos para obtener cepas derivadas de E.sp.2.14 y E.sp.1.24, con plásmidos que expresan, respectivamente las proteínas fluorescente GFP y  $\beta$ -glucuronidasa GUS. Además, el pFAJ1708 expresa el gen de resistencia al antibiótico tetraciclina.

### **4.2 Evaluación de la estabilidad del plásmido, crecimiento y capacidad de solubilización de fósforo en las cepas transformadas**

#### **4.2.1 Estabilidad del plásmido**

La estabilidad de una cepa que porta un plásmido exógeno es una condición o propiedad importante y necesaria para encarar ensayos de inoculación de plantas que implican varios días de incubación y muestreo. Se evaluó la estabilidad del plásmido pFAJ1708-GFP y pFAJ1708-GUS, en el curso del tiempo correspondiente a 40 generaciones, se tomaron 2 muestras idénticas del cultivo, que fueron plaqueadas respectivamente sobre medio de cultivo agarizado suplementado con el antibiótico de selección y sobre el medio de cultivo sin suplementación con el antibiótico. Las colonias que desarrollan en medio libre de antibiótico pero no lo hacen en medio con antibiótico corresponderían a los clones que pierden el plásmido. Los resultados del recuento de colonias se muestran en las Tablas 11 y 12. Como se puede observar, el número de colonias resistentes al antibiótico y el de las colonias en

el medio sin antibiótico fue similar entre sí, y son comparables con el recuento de las colonias que emiten fluorescencia cuando se exponen a luz UV. Este resultado está de acuerdo con un plásmido estable al menos en un 1% de las células bacterianas. Adicionalmente, el ADN de un grupo de las colonias seleccionadas al azar a partir del cultivo en el medio libre de antibiótico, fue examinado por amplificación PCR del gen GUS usando cebadores específicos, resultando en el producto PCR de 230 pb, tamaño esperado para la secuencia GUS (Resultados no mostrados).

**Tabla 11.** Evaluación de la estabilidad del plásmido pFAJ1708-*GFP* en las cepas hospederas *E. sp.* 2.14 y *E. sp.* 1.24.

| Cepas                                  | 24 horas           |           |       |           | 48 horas |           |       |           | 72 horas |           |       |           | 98 horas |           |         |             | (% ) colonias |  |
|--|--------------------|-----------|-------|-----------|----------|-----------|-------|-----------|----------|-----------|-------|-----------|----------|-----------|---------|-------------|---------------|--|
|  | Numero de colonias |           |       |           |          |           |       |           |          |           |       |           |          |           |         |             |               |  |
|  | UFC *              | Luz UV ** | UFC * | Luz UV ** | UFC *    | Luz UV ** | UFC * | Luz UV ** | UFC *    | Luz UV ** | UFC * | Luz UV ** | UFC *    | Luz UV ** | % UFC * | % Luz UV ** |               |  |
| <i>E. sp.</i> 2.14- <i>GFP</i> con atb | 100                | 100       | 99    | 99        | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 99    | 99        | 100      | 100       | 99      | 99          |               |  |
| <i>GFP</i> sin atb                     | 100                | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100     | 100         |               |  |
| <i>E. sp.</i> 1.24- <i>GFP</i> con atb | 100                | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100     | 100         |               |  |
| <i>GFP</i> sin atb                     | 100                | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100   | 100       | 100      | 100       | 100     | 100         |               |  |

Con atb: Medio de cultivo suplementado con tetraciclina (15µg/ml).

Sin atb: Medio de cultivo sin tetraciclina

\* Indica el número de colonias en medio LB-agarizado (UFC unidad formadora de colonias).

\*\* Indica el número de colonias fluorescentes a UV en medio LB-agarizado

Estos resultados nos permitieron concluir que la estabilidad del plásmido en las cepas, es aceptable para su utilización en los ensayos de inoculación de plantas.

#### **4.2.2 Crecimiento de las cepas transformadas con plásmidos reporteros**

El crecimiento de las cepas portadoras del plásmido fue evaluado comparativamente con las respectivas cepas silvestres, con el propósito de examinar si la incorporación del plásmido alteró la tasa de crecimiento. Con este objetivo, se incubaron en los medios Mínimo M9 y rico LB, y se determinó la variación de los valores de densidad óptica en el transcurso del tiempo. Como se muestra en las Figuras 29 y 30, el crecimiento de las cepas marcadas con los genes reporteros *GFP* y *GUS*, y las respectivas cepas silvestres fueron similares entre ellas tanto en el medio Mínimo M9 como en el medio rico LB.



**Tabla 12.** Evaluación de la estabilidad del plásmido pFAJ1708-GUS en las cepas hospederas *E. sp.* 2.14 y *E. sp.* 1.24.

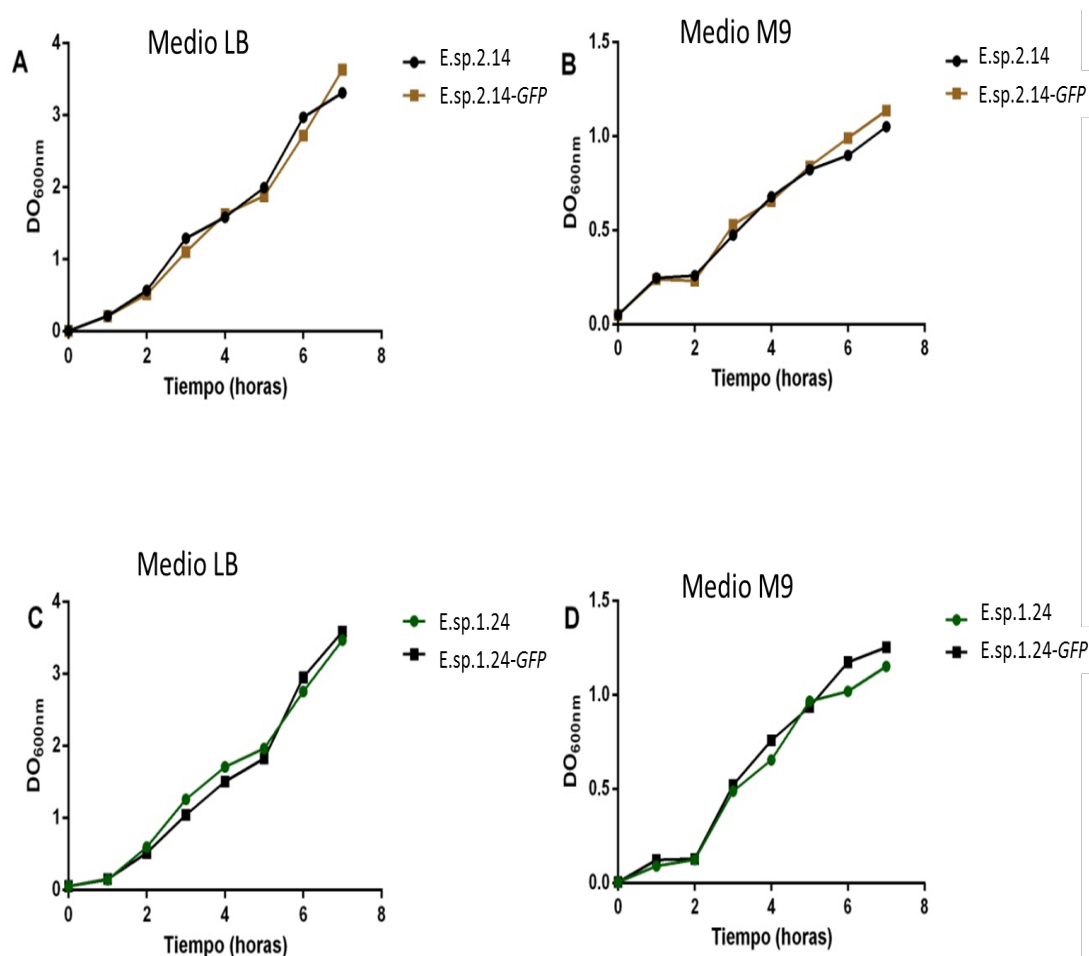
| Tiempo                         | 24 hora                        | 48 horas | 72 horas | 98 horas |      |      |      |      |                      |         |
|--------------------------------|--------------------------------|----------|----------|----------|------|------|------|------|----------------------|---------|
| Cepas                          | Número de colonias             |          |          |          |      |      |      |      | % colonias sensibles |         |
|                                | UFC*                           | PC**     | UFC*     | PC**     | UFC* | PC** | UFC* | PC** | % UFC*               | % PCR** |
|                                | <i>E. sp.</i> 2.14-GUS con atb | 100      | 100      | 100      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100                  | 100     |
| <i>E. sp.</i> 2.14-GUS sin atb | 100                            | 100      | 100      | 100      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100                  | 100     |
| <i>E. sp.</i> 1.24-GUS con atb | 100                            | 100      | 100      | 100      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100                  | 100     |
| <i>E. sp.</i> 1.24-GUS sin atb | 100                            | 100      | 100      | 100      | 100  | 100  | 100  | 100  | 100                  | 100     |

Con atb: Medio de cultivo suplementado con tetraciclina (15µg/ml).

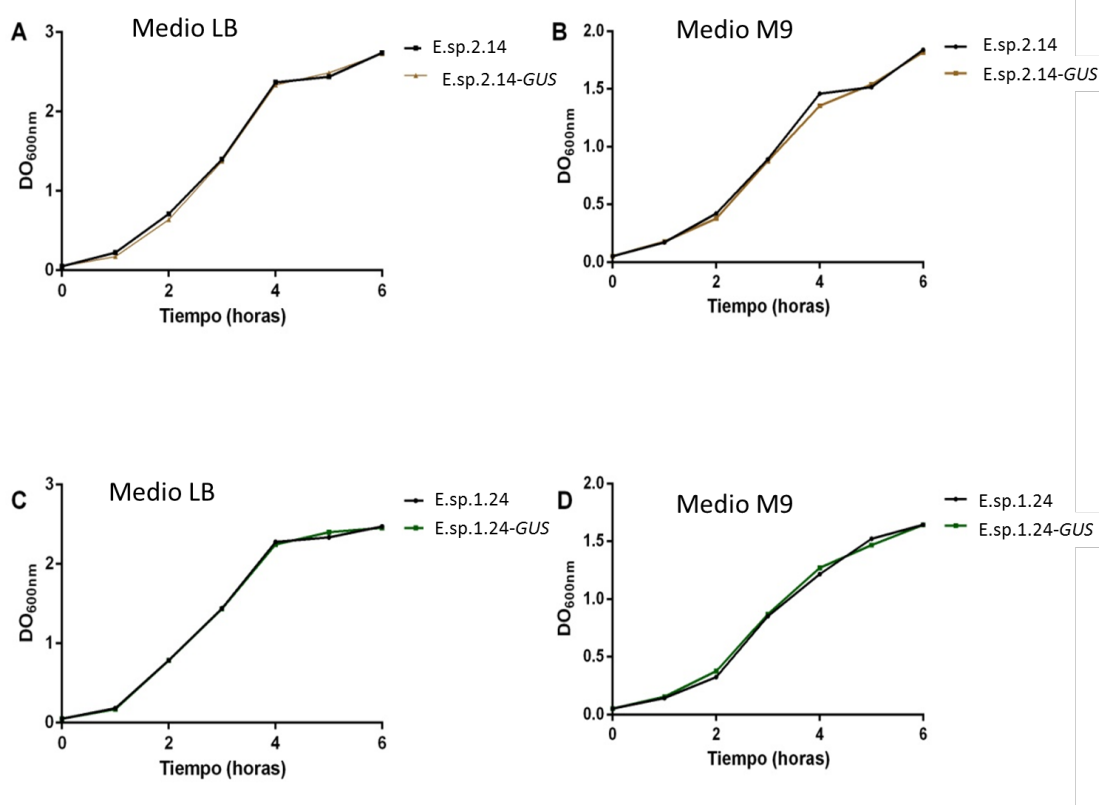
Sin atb: Medio de cultivo sin tetraciclina.

\* Indica el número de colonias en LB-agarizado (UFC unidad formadora de colonias)

\*\* Indica número de colonias positivas en el examen PCR-GUS



**Figura 29.** Curvas de crecimiento de cepas transformadas y cepas silvestre. Panel **A** medio de cultivo LB y cepas *E. sp.* 2.14 y *E. sp.* 2.14-GFP, en panel **B** idéntico a panel **A** en medio mínimo M9, paneles **C** y **D** idéntico al panel **A** y **B** con las cepas *E. sp.* 1.24 y *E. sp.* 1.24-GFP



**Figura 30. Curvas de crecimiento cepas transformadas y cepas silvestre.** Panel **A** medio de cultivo LB y cepas E.sp.2.14 y E.sp.2.14-GUS, en panel **B** idéntico a panel A con medio mínimo M9, en paneles **C** y **D** idéntico a A-B con las cepas E.sp.1.24 y E.sp.1.24-GUS

Estos resultados indicarían que las cepas transformadas y sus respectivas cepas silvestres tienen el mismo ritmo de multiplicación celular, y que la introducción de los plásmidos reporteros no provocó un aparente y obvio efecto negativo sobre el crecimiento. La demostración de estas características fue esencial para justificar su uso en los estudios que se describen a continuación. En concordancia con nuestros resultados, Bernabéu *et al.*, (2015) [158] reportaron que, el plásmido pFAJ1708 portador de los genes reporteros *GFP* y *GUS* es estable en *Bulkholderia tropica* sin afectar el crecimiento y a partir de estas evidencias encararon ensayos de inoculación de tomate.

#### 4.2.3 Solubilización de fósforo

Examinamos la capacidad de solubilizar fósforo como un indicador de integridad de la funcionalidad de nuestras cepas resultantes de la transformación con los plásmidos reporteros. El criterio aplicado fue la determinación semi-cuantitativa del halo de solubilización en medio NBRIP-

agarizado con fosfato tricálcico. Las cepas transformadas mostraron halos de solubilización similares a las cepas silvestres (Figura 31). Asimismo, el resultado se confirmó cuando se estimó el índice de solubilización (índice IS) (Tabla 14), indicando que la incorporación del plásmido pFAJ1708 no afectó la capacidad de las cepas transformadas para solubilizar fósforo *in vitro*. Por lo tanto, se puede considerar que las cepas portadoras de los plásmidos con los genes reporteros y las cepas salvajes, son equivalentes y válidas para su uso en los ensayos de interacción planta-microorganismo.

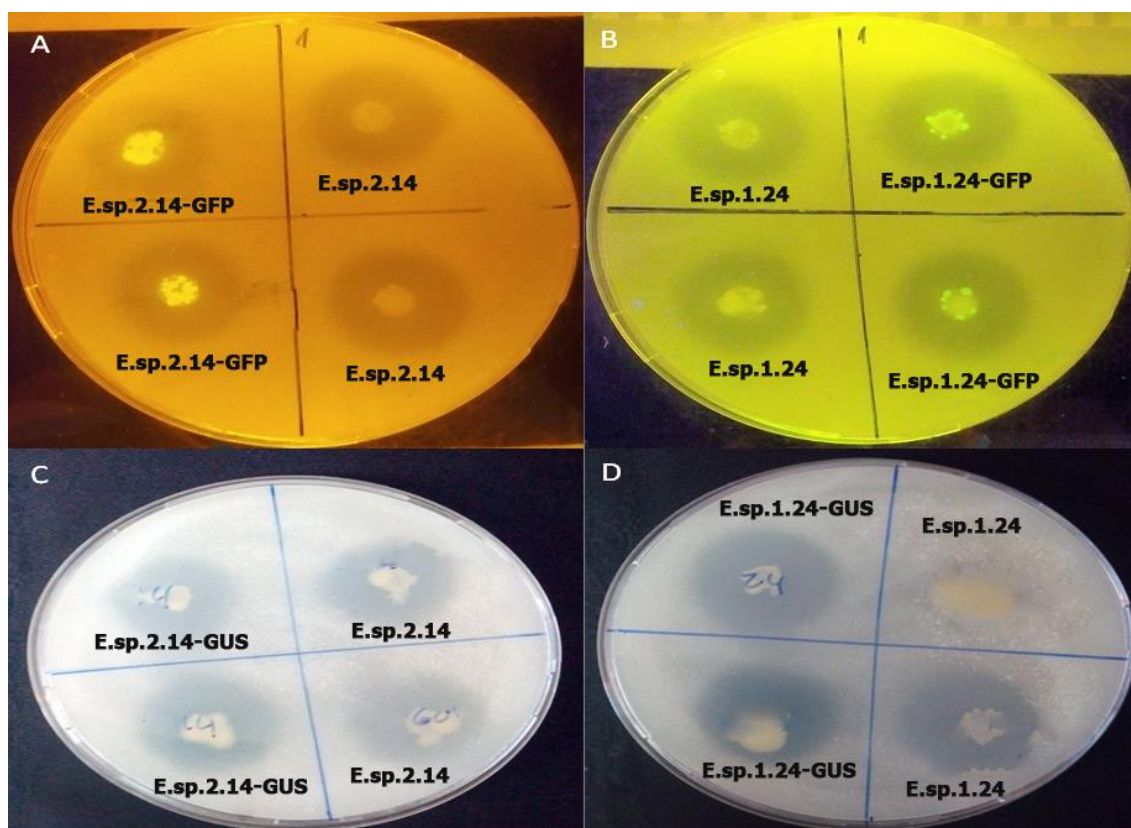
**Tabla 14.** Actividad solubilizadora de fosfatos en medio NBRIP con las cepas *E. sp.* 2.14, *E. sp.* 1.24 y sus variantes isogénicas.

| Cepas                   | IS (mm) * |       |       |       |        |
|-------------------------|-----------|-------|-------|-------|--------|
|                         | Día 2     | Día 4 | Día 6 | Día 8 | Día 10 |
| <i>E. sp.</i> 2.14      | 1, 3      | 1, 7  | 2, 0  | 2, 1  | 2, 2   |
| <i>E. sp.</i> 2.14- GFP | 1, 3      | 1, 6  | 2, 0  | 2, 0  | 2, 0   |
| <i>E. sp.</i> 1.24      | 0, 9      | 1, 7  | 2, 1  | 2, 0  | 2, 0   |
| <i>E. sp.</i> 1.24- GFP | 0, 8      | 1, 7  | 2, 1  | 2, 0  | 2, 0   |
| <i>E. sp.</i> 2.14      | 1, 2      | 1, 1  | 1, 9  | 2, 7  | 2, 7   |
| <i>E. sp.</i> 2.14-GUS  | 1, 2      | 1, 6  | 1, 9  | 2, 8  | 2, 9   |
| <i>E. sp.</i> 1.24      | 0, 8      | 1, 2  | 2, 9  | 3, 0  | 3, 9   |
| <i>E. sp.</i> 1.24-GUS  | 0, 8      | 1, 2  | 2, 8  | 3, 0  | 3, 7   |

\*el índice de solubilización (IS) fue calculado como la diferencia entre diámetro del halo de solubilización y el diámetro de la colonia.

### **4.3 Estudios de interacción cepas-tomate/trigo**

Se realizaron ensayos para caracterizar aspectos de la colonización de tomate y trigo post-inoculación. En particular, nos interesó investigar si las cepas se asocian como endófitos o si la asociación es externa a la planta en el rizoplaneo. Para este análisis se aplicaron técnicas dependientes de cultivo consistente en el recuento bacteriano a partir de extractos de tejido y observaciones con técnicas de microscopía.



**Figura 31. Actividad solubilizadora de fosfato de las cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24* y sus derivadas transformantes marcadas con *GFP* y *GUS*.** En A-B: Se muestra la actividad solubilizadora como halos claros (zona traslúcida) de las cepas salvajes y cepas marcadas con el gen *GFP*. En los paneles C-D: Idéntico A-B, con las cepas marcadas con el gen *GUS* y las respectivas cepas salvajes.

#### **4.3.1 Recuento de bacterias *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP* en extractos de tallo y raíz**

El análisis de la colonización en condiciones de asepsia permite evaluar la interacción entre las bacterias PGPR y las plantas. La condición de asepsia pretende eliminar las poblaciones bacterianas residentes en la superficie de las semillas que se encuentran creciendo en medio/soporte esterilizado, para que las bacterias inoculadas se desarrollen sin la competencia de otros microorganismos [153]. Con esta metodología experimental se crecieron plantas de tomate y trigo en condiciones de asepsia, comprendiendo un grupo de plantas sin inoculación que se utilizaron como control y otro grupo que fue inoculado con las cepas marcadas con *GFP*. Se tomaron muestras de plantas en el curso del tiempo. Una parte de los explantos se sometió a esterilización superficial mientras que otra parte no fueron esterilizadas superficialmente. Se prepararon homogenatos a partir de los cuales se realizaron diluciones seriadas, y se tomaron alícuotas para sembrarlas sobre medio agarizado LB-

Tc. En raíces y tallos desinfectados superficialmente, provenientes de plantas inoculadas y control de tomate y trigo, no se observó desarrollo bacteriano en las primeras 48 horas de incubación en medio LB-agarizado con y sin suplementación con Tc. Tampoco se observó desarrollo en medio LB-agarizado inoculado con alícuotas tomadas de la solución de último lavado de los tejidos post-desinfección. Sin embargo, a las 48 hs observamos desarrollo bacteriano en las cajas de cultivo sin antibióticos, localizado en las vecindades de los extremos correspondientes al corte del explanto (Resultados no mostrados). Esto indicaría que la esterilización fue eficiente y que las bacterias observadas a las 48 hs provienen del interior de los tejidos. Estas colonias observadas después de 48 hs corresponderían a bacterias propias alojadas en las semillas.

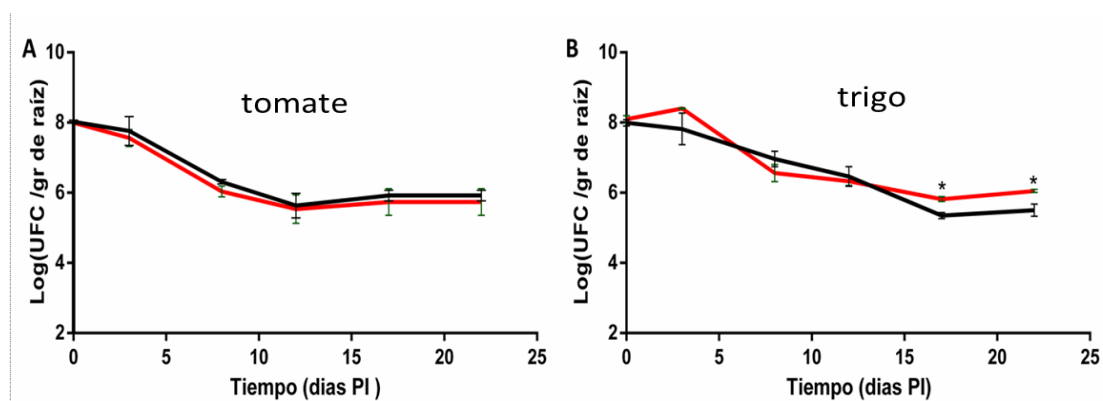
Concluimos que el protocolo de desinfección superficial de los tejidos es satisfactorio para avanzar en la investigación de bacterias en el interior de los tejidos vegetal.

No se observó presencia de bacterias en las diluciones del homogenato, sembradas en medio LB con Tc que provienen de los tejidos desinfectados superficialmente. Contrariamente, se observó desarrollo bacteriano en medio con Tc, en las muestras de los homogenatos de raíces de plantas inoculadas que no fueron tratadas con la desinfección superficial (Figura 32), siendo consistente en las muestras tomadas en el curso de los 21 días del ensayo desde la inoculación de tomate y trigo. Se asume que este recuento de bacterias corresponde a las bacterias inoculadas y a las adheridas superficialmente a la raíz.

En conjunto, estos resultados estarían indicando que las cepas no alcanzan a ingresar en los tejidos de trigo y tomate, sin embargo podrían establecerse en el rizoplasma colonizando superficialmente las raíces. La estimación de los niveles de bacterias por gramo de tejido fue la siguiente: con la cepa *E. sp. 2.14-GFP* fue  $1 \times 10^6$  UFC/g de raíz y para la cepa *E. sp. 1.24-GFP* fue  $9 \times 10^5$  UFC/g de raíz de trigo, mientras que la población en raíz de tomate fue  $4 \times 10^5$  y  $4.3 \times 10^5$  UFC/g de raíz, respectivamente.

Por otra parte, se observó un descenso de las poblaciones en el tiempo ya que el recuento en plantas que fueron inoculadas inicialmente con 1ml de una suspensión bacteriana resultando en  $1 \times 10^8$  UFC/g de tejido, disminuyó hasta el

día 12 en tomate y día 17 en trigo, a partir de ese período se estabilizaron o mostraron tendencia levemente alcista (Figura 32 panel A y B). No se observaron diferencias significativas entre las inoculaciones de tomate con la cepa *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP*. Contrariamente, en trigo se observaron diferencias significativas entre cepas para los muestreos de los días 17 y 22, exhibiendo una mayor población la cepa *E. sp. 1.24-GFP*.



**Figura 32. Cuantificación del número de bacterias de *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP* en raíces de trigo y tomate.** En el panel **A** se muestra el recuento de la población bacteriana en las raíces de tomate y en el panel **B** se muestra el recuento de la población bacteriana en las raíces de trigo. La línea de color negro corresponde a plantas inoculadas con la cepa *E.sp.2.14-GFP* y línea roja corresponde a plantas inoculadas con la cepa *E.sp. 1.24-GFP*. Los valores de las curvas representan los promedios del logaritmo de la población bacteriana y las barras la desviación estándar de los promedios. Las diferencias significativas entre las cepas se indican con un asterisco ( $P>0.05$ ).

A partir de estos resultados podemos inferir/concluir que la asociación de las cepas *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP* con tomate y trigo, tendría lugar sobre la superficie de la raíz. Collavino *et al* (2010) mostraron que estas cepas tienen la capacidad de colonizar eficientemente el sistema radicular de poroto y el tamaño de la población de esta colonización fue estimada en el orden  $2.7 \times 10^5$  y  $1.3 \times 10^5$  UFC/g de raíz, respectivamente. Estos valores son coincidentes con los resultados que hemos obtenido en tomate y trigo, lo cual indica que alcanzado cierto nivel la especie vegetal influyó poco o nada respecto al tamaño de la población de bacterias adheridas a la superficie radical. Es probable que la producción de sustratos atractivos por la planta, para las cepas ensayadas y su presencia en los exudados radical, promuevan la colonización de la superficie de raíz de trigo y tomate, tal como fuera propuesto por otros autores [53], [208].

#### **4.3.2 Observación microscópica de raíz y tallo inoculados con cepas marcadas con GFP y GUS**

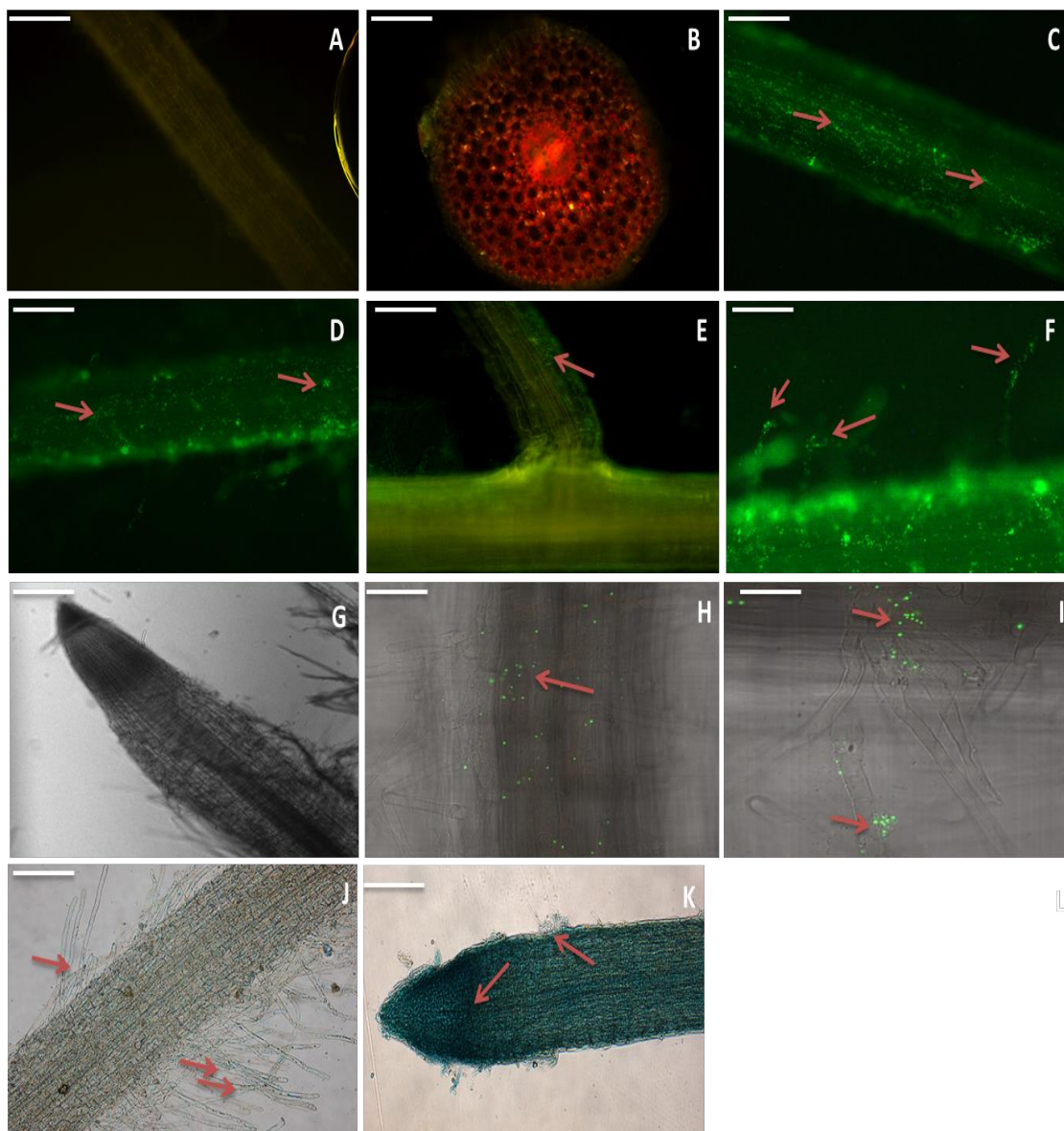
Las observaciones microscópicas fueron realizadas en tejido de tallo y raíz de plantas inoculadas y de plantas control sin inoculación. Una parte de los tejidos fue sometida a desinfección superficial, mientras que otra parte sólo se sometió a un lavado con agua estéril para eliminar partículas y bacterias adheridas débilmente a los tejidos. Se realizaron observaciones a los 3 y 10 días post-inoculación (PI).

Los explantos fueron observados por microscopía con el propósito de visualizar la presencia de bacterias en los tejidos. En general, se detectó cierta autofluorescencia propia del tejido vegetal, pero fue posible diferenciarla de la fluorescencia generada por la proteína *GFP*. Así, resultó que la fluorescencia específica fue observada sobre la superficie de las raíces (Figura 33C, 34C, 35C, 36C), consistente en puntos verdosos que se diferenciaron del fondo ligeramente verde, cuando el material fue expuesto a luz UV. La fluorescencia generada por la proteína *GFP* no fue detectada en raíces de los controles y tampoco en los tejidos inoculados pero previamente desinfectados superficialmente a la observación microscópica (Figura 33 A y G, 34 A y G, 35 A y G, 36 A y G). En cortes transversales de tallo de tomate y trigo inoculados, la exposición a luz UV reveló respectivamente autofluorescencia de color rojo y verde pero, no observamos puntos o agregados con fluorescencia de la proteína *GFP*, esperable si las cepas se comportan como endófitos localizadas en el interior. Esto indicaría que las bacterias no ingresaron en los tejidos (Figura 33B, 34B, 35B, 36B). Se observaron resultados similares con las cepas marcadas con GUS en los tejidos desinfectados, control y cortes transversales, donde no se observó la tinción características de bacterias sobre los tejidos o en el interior (Resultados no mostrados).

Usualmente la colonización de las bacterias endofíticas comienza en la superficie de la raíz, luego ingresan al tejido y colonizan los espacios intercelulares [91], [207] desde donde pueden movilizarse invadiendo el apoplasto llegando a atravesar la barrera de la endodermis. Desde allí podrían moverse a lo largo de la raíz para colonizar los tejidos aéreos [230], [231]. En las observaciones de los tejidos inoculados pero con desinfección superficial y de los cortes transversales no nos fue posible observar células en tejido



internos. Los resultados precedentes conforme a los criterios propuestos por Reinhold-Hurek y Hurek (1998) [232] permiten concluir que las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 no son endófitas en plantas de trigo y tomate .



**Figura 33. Observación microscópica de raíces de tomate inoculadas con las cepas E. sp. 2.14-GFP y E. sp. 2.14-GUS.** **A:** Raíz no inoculada; **B:** corte transversal de tallo inoculado; **C:** raíz colonizada 3 días PI; raíz colonizada 10 días PI (**D**); raíz secundaria colonizadas (**E**); pelos radicales colonizados (**F, I, J y H**); ápice de raíz desinfectado superficialmente (**G**); **J:** colonización de pelos radicales (**J**) ápice radical (**K**) con cepa E. sp. 2.14-GUS. De **A-F** microscopía de fluorescencia, **G, H e I** microscopía confocal y **J-K** microscopía campo claro. Las flechas señalan los sitios de colonización de la cepa E. sp. 2.14. Barra de escala: **A, B, C, E, J y K** 500 µm, **F** 50 µm, **G** 100 µm, **H, I** 25 µm, **D, G e I:** 50 µm.

A los 3 días PI observamos bacterias sobre la superficie de las dos especies vegetales, las cuales se encontraron separadas entre ellas o agrupadas formando filas, localizadas predominantemente en la unión de las células

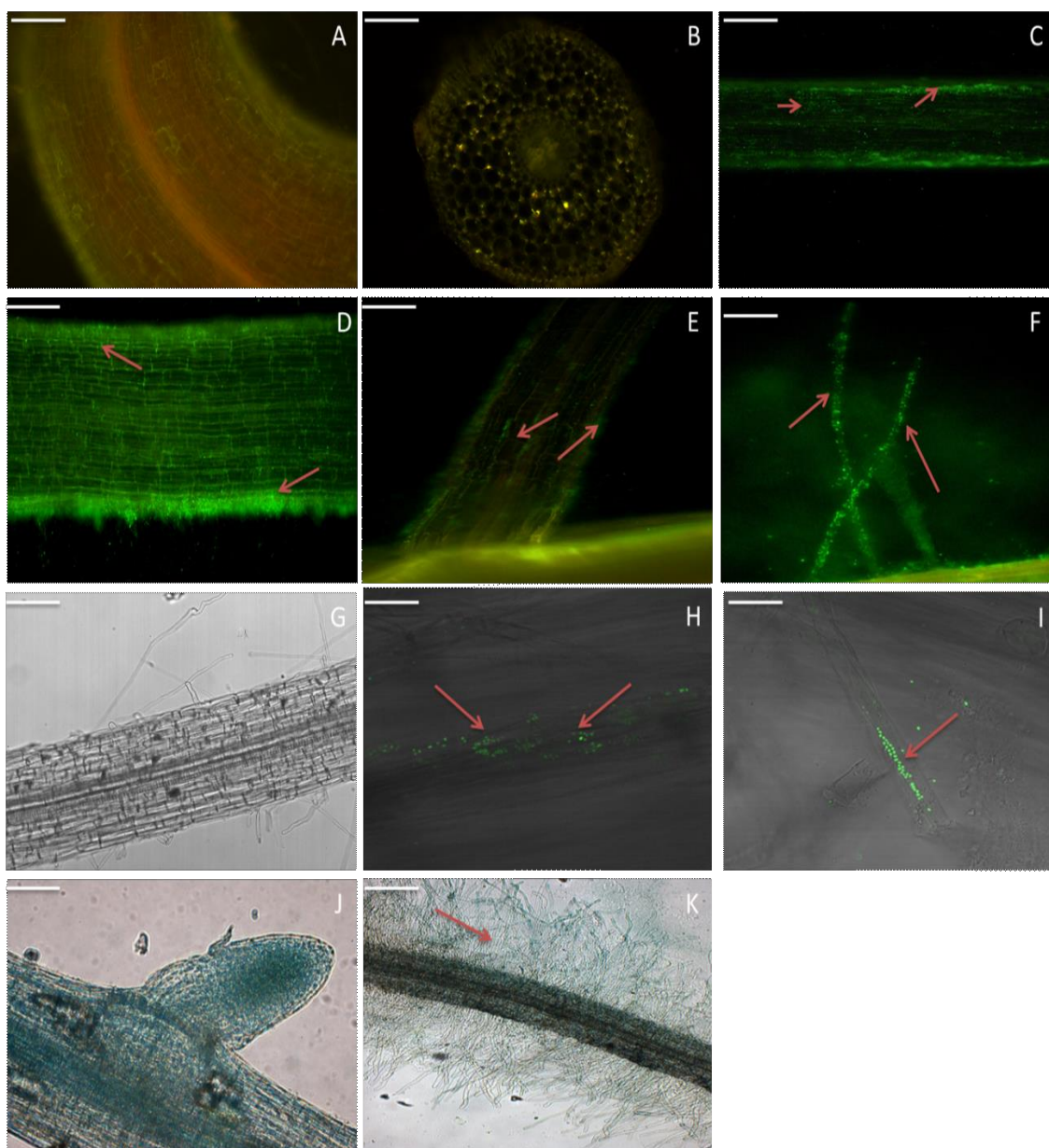


epidermales de los pelos radicales y en la zona de elongación radical (Figuras 33C, 34C, 35C y 36C).

La colonización avanzó en el curso del período de 10 días, cuando la presencia de células fluorescente fue alta en las zonas descritas arriba (Figuras 33D, 34D, 35D y 36D). En la región del ápice y cuello radicular se observó menor fluorescencia y una tinción más débil de los tejidos (GUS) lo que correspondería a las zonas con menor colonización. Observamos que la colonización de las raíces secundarias de tomate se inicia en la zona de emergencia de la raíz y desde ahí se desplaza hacia la zona de los pelos radicales secundarios (Figura 33E y 34E).

Con las cuatro cepas observamos que la distribución espacial sobre las raíces de trigo y tomate, es similar a lo reportado para otras bacterias con características de PGPR en asociación con otras especies vegetales [80], [153], [233]–[235]. Uno de los mecanismos determinantes para el ingreso de las bacterias a los tejidos internos de raíz involucra la producción de celulasas y pectinasas [89], [209], [236], [237]. Reinhold-Hurek *et al* (2006) [89] encontraron una celulasa en *Azoarcus sp* relacionada con la degradación de la pared, cuya actividad aumentó cuando las bacterias se aproximan a las raíces, especialmente en los sitios de emergencia de las raíces secundarias donde tendría acceso la bacteria. Las bacterias perdieron la capacidad para ingresar a los tejidos internos de las raíces de arroz cuando se inactivó el correspondiente gen codificante de la celulasa. Estos resultados y nuestras observaciones microscópicas indican que las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 no expresarían actividades líticas importantes para facilitar la entrada en tomate y trigo.

En línea con esta conclusión, en el capítulo anterior se describió el resultado de la determinación de actividades de enzimas líticas, el cual mostró que las cepas no fueron activas en el ensayo *in vitro* y podemos especular que esta es una de las causas por la cual las bacterias no logran atravesar las pared celular para alojarse en el interior de los tejidos de trigo y tomate.

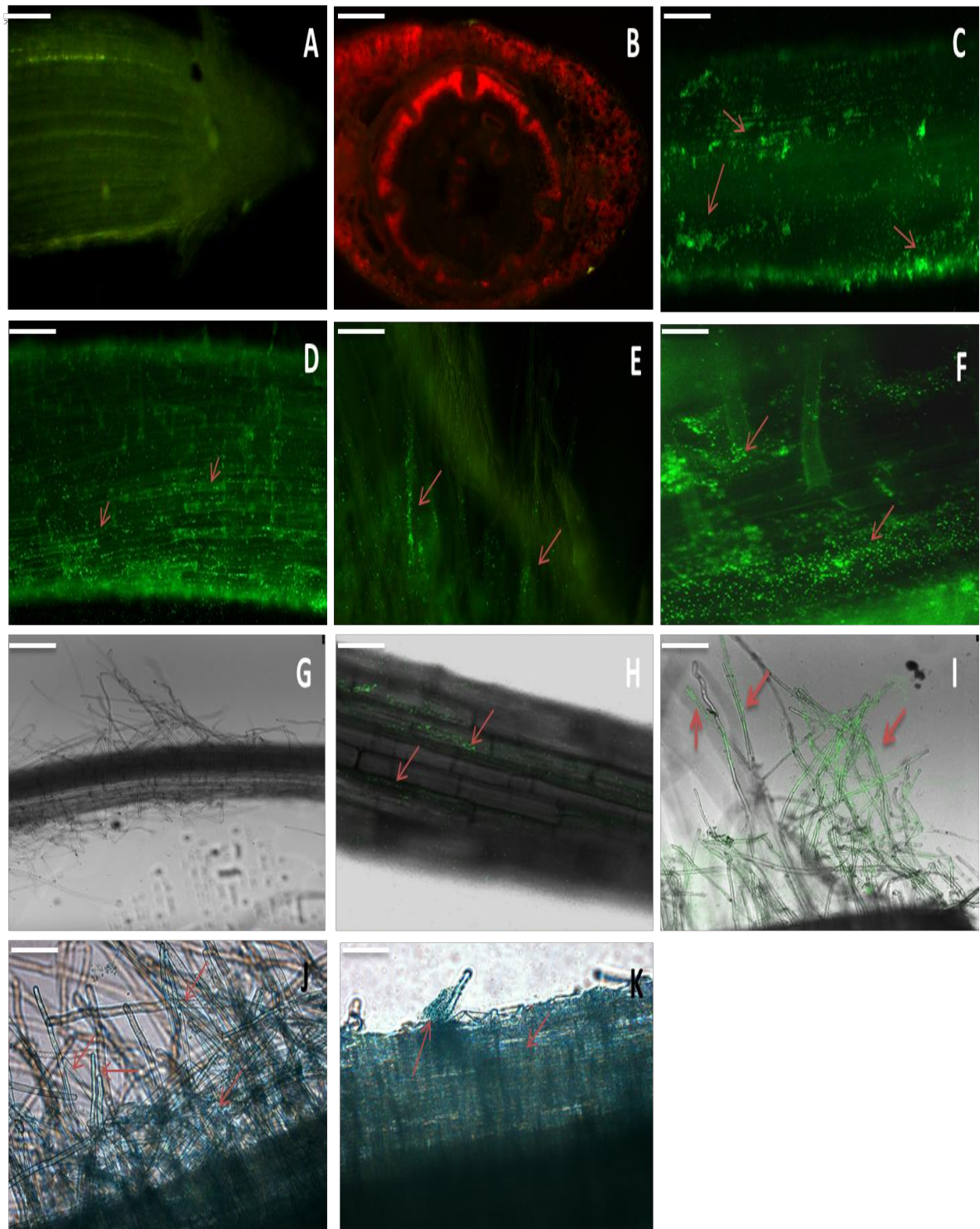


**Figura 34. Colonización de raíces de tomate inoculado con cepas *E. sp. 1.24-GFP* y *E. sp. 1.24-GUS*. Raíz no inoculada (A); corte trasversal de tallo (B); raíz colonizada 3 días PI (C y H); raíz colonizada 10 días PI (D); raíz secundaria colonizadas (E); pelos radicales colonizados (F, I y K); de raíz desinfectado superficialmente (G); colonización de rizoplano (K) y pelos radicales (K) con cepas *E. sp. 2.14-GUS*. Las figuras de A-F microscopía de fluorescencia. G, H e I microscopía confocal y J-K microscopía campo claro. Las fechas señalan los sitios de colonización de la cepa *E. sp. 1.24* en tomate. Barra de escala: A, B, C, E, J y K 500 μm, F 50 μm, G 100 μm, H, I 25 μm. 200 μm. D, G e I: 50 μm.**

Ha sido previamente reportado la formación de biofilm sobre la superficie de raíces inoculadas con PGPR creciendo en condiciones de asepsia [69], [238]. Como se describió en el capítulo III, las cepas *E. sp. 2.14* y *E. sp. 1.24* tienen capacidad de formar biofilm sobre superficies abióticas. En las observaciones microscópicas dirigimos nuestra atención a la búsqueda de estructuras asociadas a la colonización bacteriana con semejanza a las de biofilm. En el

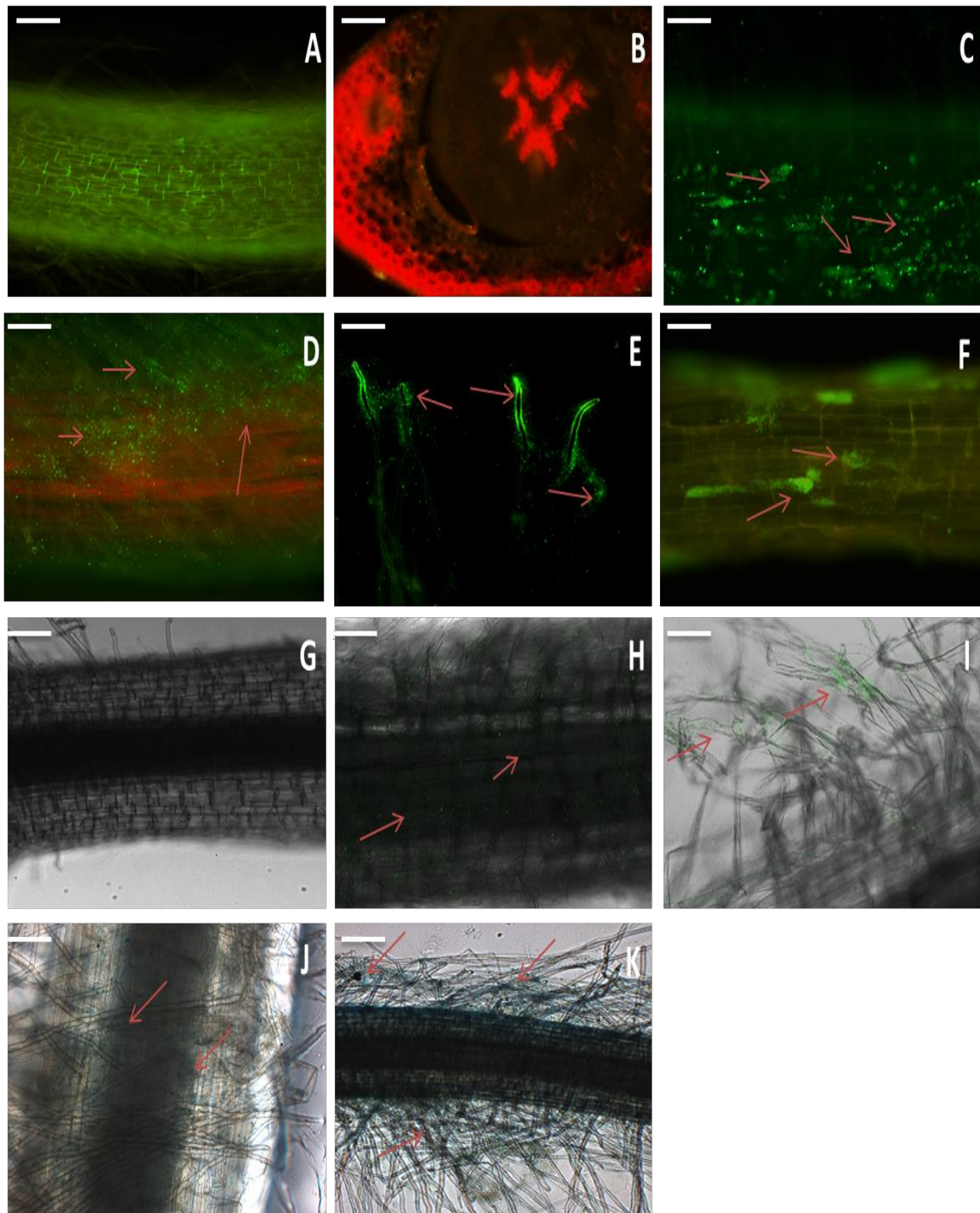
caso de los microorganismos asociados a plantas, la matriz química de los biofilms está formada por exopolisacáridos bacterianos producidos a partir de los sustratos presentes en los exudados radicales [72], [239]. Estas estructuras pueden representar un mecanismo que mejora la sobrevivencia de las bacterias en el ambiente y en particular en un medio compartido con una diversidad de otros microorganismos [240]. A los 10 días PI, encontramos estructuras semejantes a las descritas para biofilm sobre la superficie de las raíces de tomate y trigo (Figura 33K, 34D, 35K y 36J)[75], donde se observó un agrupamiento de células bacterianas embebidas en una materia que se revela como translúcida, con apariencia análoga al mucílago, probablemente de constitución exopolisacáridica. En nuestra descripción asimilamos estas formaciones a biofilms.

La formación de estructuras tipo biofilm, nos permite inferir que esa propiedad que fuera demostrada en ensayos *in vitro*, se expresa *in vivo* favoreciendo la colonización bacteriana sobre la superficie radical, y además como fuera propuesto dar protección a las raíces contra patógenos y tolerancia a sequía [76].



**Figura 35. Localización de las cepas *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 2.14-GUS* en trigo.** Imágenes de microscopía de fluorescencia, confocal y campo claro de las raíces de trigo, las flechas indican los sitios de colonización bacteriana. Raíz no inoculada (A); corte trasversal de tallo (B); bacterias formando colonias en raíz 3 días PI (C y F); raíz colonizada 10 días PI (D); pelos radicales colonizados (E, I y J); raíz desinfectada superficialmente (G); colonización de rizoplano (N, y F); colonización de pelos radicales (J) y rizoplano (K) con cepa *E. sp. 2.14-GUS*. Los paneles de A-F corresponden a microscopía de fluorescencia, G-I, microscopía confocal y J-K, microscopía campo claro. En la figura K se muestra formaciones densas tipo biofilm sobre el pelo radical. Barra de escala: A, B, C, E, J y K 500  $\mu\text{m}$ , F 50  $\mu\text{m}$ , G 100  $\mu\text{m}$ , H, I 25  $\mu\text{m}$ . 200  $\mu\text{m}$ . D, G e I: 50  $\mu\text{m}$ .





**Figura 36. Localización de las cepas *E. sp. 1.24-GFP* y *E. sp. 1.24-GUS* en trigo.** Imágenes de microscopía de fluorescencia (Paneles A a F), confocal (Paneles G a I) y campo claro de las raíces de trigo (J-K), las flechas indican los sitios de colonización de la cepa. Raíz no inoculada (A); corte trasversal de tallo (B); raíz colonizada 3 días PI (C y F); raíz colonizada 10 días PI (D, H); pelos radicales colonizados (D, E, I y K); raíz desinfectada superficialmente (G); colonización del rizoplasma (J y F); colonización de pelos radicales (K) y rizoplasma (J) con cepas *E. sp. 2.14-GUS*. En la figura F se muestra un agrupamiento de las células bacterianas con posible formación de biofilms. Las figuras de A-F microscopía de fluorescencia, G-I microscopía confocal y J-K microscopía campo claro: A, B, C, E, J y K 500  $\mu\text{m}$ , F 50  $\mu\text{m}$ , G 100  $\mu\text{m}$ , H, I 25  $\mu\text{m}$ . D, G e I: 50  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4 Colonización de raíces de trigo y tomate en suelo**

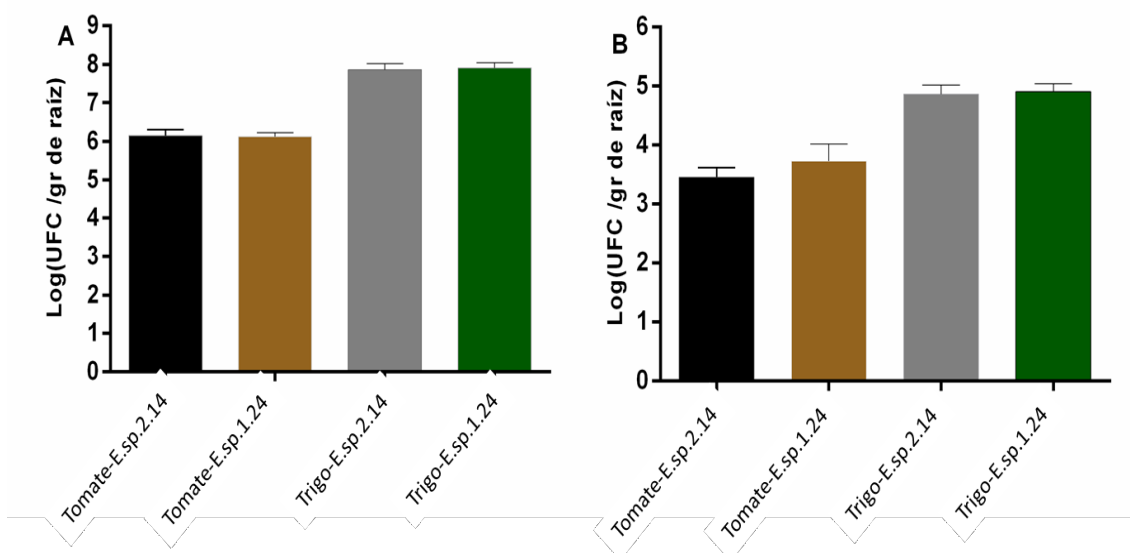
La evaluación de la colonización de las plantas por los microorganismos en sustratos no estériles y condiciones controladas de incubación es útil para estimar la capacidad del inóculo para establecerse en suelo, asumiendo que se trata de una situación ambiental cercana a la situación natural del campo.

Dentro de este marco conceptual se encararon ensayos, usando semillas desinfectadas superficialmente y sembradas en suelo no estéril contenido en macetas. Se inocularon dos grupos de semillas, respectivamente con las cepas *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP* usando 1 ml de suspensión bacteriana en concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml/30 semillas; a los 10 y 20 días post-inoculación se tomaron muestras de raíz y tallo para determinar el número de bacterias resistentes a Tc extraídas de la superficie. Por otra parte, se examinó la población extraída de tejidos después del tratamiento de esterilización superficial y homogeneización del tejido.

En los extractos de tejidos desinfectados superficialmente de raíces y tallos provenientes de plantas inoculadas, no se detectó crecimiento en medio LB con Tc. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en los ensayos de la sección anterior, indicando que las cepas no tendrían capacidad para ingresar al tejido (Figura 37).

En los tejidos de los controles sin inocular, respectivamente con y sin desinfección superficial no se observó crecimiento bacteriano en LB-Tc, lo cual indicaría en caso de ocurrencia de microorganismos que los mismos son propios del suelo y sensibles a Tc.

En extractos de tejidos de trigo con inoculación de las cepas *E.sp.2.14* y *E.sp.1.24*, sin desinfección superficial se logró recuperar las cepas en el orden de  $10^7$  /g tejido a los 10 días, y de  $10^4$  a los 20 días, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron con los extractos de raíz de tomate inoculados con las cepas sin desinfección superficial; los recuentos resultaron más bajos con respecto a trigo, y se encuentran en el orden de  $10^6$  a los 10 días y  $10^3$  a los 20 días.



**Figura 37.** La población superficial en las raíces de plantas de trigo y tomate inoculadas con las cepas *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP*, crecidas en suelo no estéril. **A:** muestras a 10 días de inoculación (PI); **B:** muestras a 20 días de inoculación (PI).

Podemos concluir que las cepas *E. sp. 2.14-GFP* y *E. sp. 1.24-GFP* tienen la capacidad para establecerse eficientemente en el rizoplasma de trigo y tomate creciendo en suelo, lo que indicaría que las cepas soportan las condiciones propias del ambiente suelo (pH, humedad, materia orgánica, etc.). Esto además, permite especular que las cepas compiten satisfactoriamente con los microorganismos del suelo. El tamaño de la población en las raíces de tomate fue menor que en trigo, sugiriendo que trigo promueve un mayor desarrollo, probablemente por algún componente presente en el exudado radical, que estaría atrayendo y sosteniendo una mayor población bacteriana. En este sentido, por ejemplo se comparó a *Bacillus sp.* y *Azospirillum sp.* en plantas de arroz y se observó que *Bacillus sp.* tiene en las raíces una mayor población que *Azospirillum sp.*, lo cual es atribuido a los exudados que les proporciona la raíz [241]; en otros estudios encontraron que el ácido málico y el ácido cítrico presentes en los exudados de las raíces de tomate son utilizados para atraer a *Pseudomonas fluorescens* para que colonice la raíz [242].

Encontramos que las poblaciones de las cepas *E.sp.2.14* y *E.sp.1.24* son similares a las reportadas por Bernabéu *et al.* (2017) [158] y Hassen *et al.* (2010) [243], los cuales indican en sus trabajos que las bacterias pertenecientes a los géneros *Bulkholderia*, *Bacillus* y *Paenibacillus* se las encuentra en la superficie de las raíces de trigo, sorgo y tomate crecidas en

suelo no estéril, y las poblaciones están en el orden de  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  UFC/g de tejido. Comparando nuestros resultados con los mostrados por estos autores podemos inferir que las cepas ensayadas son eficientes en colonizar la superficie de la raíz, y posiblemente esta característica también podría observarse en la situación natural de campo.

#### **4.5 Ensayos de sobrevivencia en suelo**

Para encarar el estudio de sobrevivencia en suelo usamos mutantes derivados resistentes a rifampicina, los cuales fueron provistos por Lic. Ifran, del Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes [156]. La resistencia a la rifampicina reside en las mutaciones que alteran la ARN polimerasa en los residuos del sitio de unión de la rifampicina, lo que resulta en una disminución de su afinidad. Las mutaciones que determinan resistencia residen en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa [244], [245]. Los mutantes fueron identificados como E.sp.2.14-M y E.sp1.24-M.

##### **4.5.2 Curvas de crecimiento en medios mínimo M9 y rico LB**

El crecimiento de las cepas resistentes a rifampicina E.sp. 2.14-M y E.sp.1.24-M fue evaluado comparativamente con las respectivas cepas silvestres, con el propósito de investigar el efecto de la mutación sobre la tasa de crecimiento. Con este objetivo, se incubaron en medio mínimo M9 y rico LB, y se determinó el crecimiento por la variación de los valores de densidad óptica en el transcurso del tiempo.

Los resultados mostraron que los tiempos de desarrollo de los mutantes resistente a rifampicina, son similares a los de las cepas silvestres, tanto en medio mínimo M9 como rico LB (Figura S1). Este ensayo nos permitió concluir que la mutación del gen *rpoB* no provoca una alteración en la tasa de crecimiento de las bacterias.

##### **4.5.3 Evaluación cualitativa in vitro de la capacidad para la solubilización de fósforo**

Examinamos la capacidad de solubilizar fósforo como un indicador de funcionalidad bacteriana en nuestras cepas mutantes resistentes a rifampicina mediante la determinación semi-cuantitativa del halo de solubilización en medio NBRIP-agarizado suplementado con fosfato tricálcico. Se observó que los

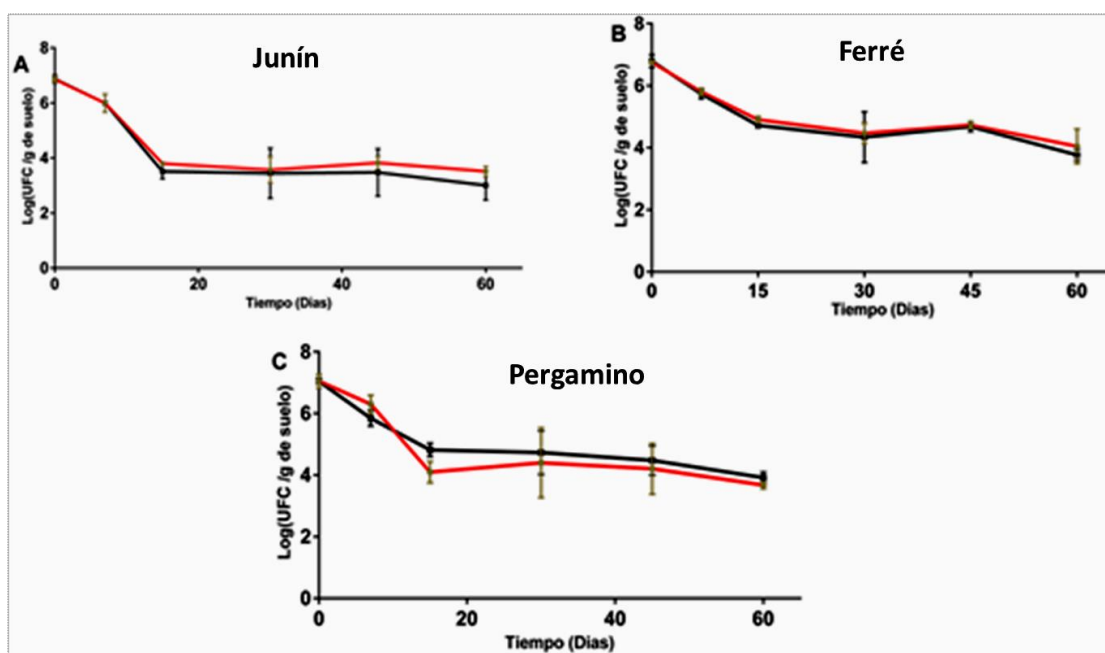


halos de solubilización de las cepas mutantes fueron similares a las cepas silvestres (Figuras S2). Asimismo, el índice de solubilización (IS) confirmó la evaluación visual (Tabla S4), indicando que la mutación no afectó la capacidad de las cepas para solubilizar fósforo *in vitro*. Por lo tanto, podemos considerar equivalentes a las cepas silvestres y mutantes, y aptas para su uso en los ensayos de sobrevivencia en suelo.

#### **4.5.4 Sobrevivencia de las cepas en suelo**

La sobrevivencia de las bacterias, después de su incorporación al suelo mediante la inoculación, puede ser afectada por la interacción con los otros organismos que componen el suelo y por factores ambientales tanto bióticos como abióticos [246]–[248]. El resultado de una buena asociación con la raíz está condicionado por la capacidad para colonizar, superar la competencia con la población indígena del suelo y la capacidad de las bacterias para adaptarse a las condiciones del suelo que comprenden factores físicos y químicos, tales como pH, textura, disponibilidad de nutrientes, humedad y temperatura, contenido de materia orgánica. Con este objetivo se evaluó la sobrevivencia de las cepas E.sp.2.14-M y E.sp.1.24-M en muestras de suelo de las localidades de Junín, Ferré y Pergamino, respectivamente.

En la Figura 38, se muestran los valores del recuento de bacterias en suelo a tiempos diferentes post-inoculación. Observamos en los tres suelos evaluados, que el recuento de las cepas E. sp. 2.14-M y E. sp. 1.24-M descendieron en los primeros 15 días. Esta disminución de la población de las cepas fue de aproximadamente tres órdenes de magnitud. Observamos en particular, que el suelo de Pergamino presentó la población más baja. Si bien ambas cepas disminuyeron en el tamaño de la población, la cepa E.sp.2.14-M registró la población más baja. Los recuentos realizados sobre muestras tomadas después de los 15 días indicaron que las poblaciones tendieron a estabilizarse hasta el muestreo del día 45, posteriormente las poblaciones disminuyeron (Figura 38).



**Figura 38. Ensayo de sobrevivencia en suelo de la provincia de Buenos Aires.** A: Junín; B: Ferré; C: Pergamino con cepas mutantes *E. sp.* 2.14-M (Color rojo) y *E. sp.* 1.24-M (Color negro).

El recuento de *E.sp.*2.14 y *E.sp.*1.24 se redujo respecto al valor inicial ( $1 \times 10^7$  UFC/gramo de suelo), llegando al final del ensayo a una población que representa el 1% de la población inicial. Se ha reportado que los ensayos con bacterias introducidas en el suelo para promover el crecimiento de la planta, supresión de patógenos tienen resultados variables [148], [249]–[251]. Un factor clave que afectaría los resultados puede es atribuido a la capacidad para establecerse o en suelo [252]–[254]. La humedad, temperatura del suelo, pH, textura, disponibilidad de oxígeno, nutrientes, depredación por protozoos, antagonismo y competencia con la microfauna son los principales factores que afectan las poblaciones bacterianas introducidas en los suelos [221], [228], [247]. En este contexto podemos decir que las cepas *E.sp.*2.14 y *E.sp.*1.24 tienen la capacidad de sobrevivir y adaptarse a las condiciones de los suelos evaluados, cuyas características son diferentes a las de los suelos a partir de los cuales fueron aisladas las cepas. Los resultados son alentadores para intentar incorporar cepas con propiedades benéficas en los cultivos que se encuentran en las región de Junín, Ferré y Pergamino.

#### 4.6 Conclusiones.

Uno de los objetivos de este capítulo fue examinar el tipo de asociación entre las cepas *E.sp.*2.14 y *E.sp.*1.24 con tomate y trigo. En este sentido,

encontramos útil disponer de las cepas marcadas con genes reporteros. Por antecedentes disponibles que demuestran su utilidad, se adoptó el uso de los genes reporteros GFP y GUS, los cuales fueron incorporados mediante plásmidos replicativos y demostramos que las bacterias transformadas con el plásmido pFAJ1708 portador de los genes reporteros presentaron estabilidad en el tiempo, las características fisiológicas no resultaron afectadas lo cual validó el uso de las cepas para su seguimiento mediante el monitoreo de las actividades GFP o GUS en el curso del tiempo requerido por el ensayo.

Los resultados de las observaciones microscópicas y de la aplicación de técnicas microbiológicas, mostraron que las cepas colonizan eficientemente el rizoplano de tomate y trigo, las células bacterianas fueron visualizadas en la superficie de la raíz de ambos cultivos dispuestos en filas, predominantemente sobre la unión de las células de la epidermis y en la zona de pelos radicales.

En raíces y tallos desinfectados superficialmente y en cortes transversales no se detectó la presencia de las cepas. Probablemente los resultados obtenidos en las observaciones microscópicas esta asociado a la inactividad de las enzimas celulasas y pectinasas que actúan degradando la pared celular. Los resultados de las observaciones y recuentos de las bacterias nos dieron evidencias suficientes para concluir que las cepas no son endófitas en los cultivos ensayados.

La formación del biofilm sobre la superficie de las raíces depende de los exudados para el crecimiento y mantenimiento de las bacterias que se encuentran embebidas en la matriz del biofilm [255], [256]. Aunque la cantidad de compuestos orgánicos que provienen de los exudados radicales es relativamente bajo, no superan el 0,4% del carbono fotosintetizados [257], estos compuestos ejercen una influencia muy fuerte sobre los microorganismos del suelo promoviendo la atracción hacia la zona rizosférica. Además, están involucrados en la adhesión de las bacterias a la superficie radical y posteriormente la formación de biofilm [221], [255]. Espinosa-Urgel *et al.* (2002)[258] observaron que *Pseudomonas putida* puede responder rápidamente a la presencia de exudados de las raíces en los suelos, convergiendo en los sitios de colonización de las raíces y estableciendo biofilm. Por lo que podemos concluir que la formación de biofilm por las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, demostrado en ensayos *in vitro* en el capítulo III, también se expresa *in vivo*

sobre las superficies radicales de tomate y trigo. . Por otra parte podemos inferir que la capacidad de formación de biofilm de las cepas sobre la superficie radical en condiciones de asepsia, se podría extrapolar a condiciones naturales, lo cual favorecería la colonización de las raíces de tomate y trigo en las condiciones reales del cultivo. Dado los resultados obtenidos sobre biofilm y la asociación con la planta, encontramos interesante confirmar el rol de los biofilms de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 en la colonización radical. En este sentido, sería interesante la obtención de mutante defectivos en la formación de biofilm para encarar futuras investigaciones. .

La introducción de bacterias en el suelo mediante inoculación constituye un aspecto importante de la ecología microbiana. El suelo es un hábitat complejo compartido por una gran diversidad de microorganismos, donde el establecimiento de cepas bacterianas exógenas, puede experimentar diversos desafíos tales como la depredación por la microfauna, acción de antibióticos, enzimas líticas y características intrínsecas de los suelos que afectan la capacidad de colonizar las raíces. En este sentido se evaluó la respuesta de la inoculación de las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 en raíces de tomate y trigo crecidas en suelo, encontrando a las cepas sobre la superficie radical de las plantas ensayadas y las poblaciones son semejantes a las encontradas por otros autores con otras PGPR [153], [243]. Con las evidencias mostradas podemos concluir que las cepas alcanzan a establecerse exitosamente en el rizoplano y posiblemente compitiendo con las bacterias nativas residentes en el suelo.

Los datos de los ensayos en suelos de las 3 localidades mostraron que las poblaciones de las cepas alcanzan niveles apreciables a los 15 días y que al menos permanece hasta los 45 días. Este resultado es alentador para proponer la introducción de estos microorganismos benéficos en el manejo de los cultivos, aunque a los efectos de generalizar este comportamiento encontramos necesario evaluar las cepas en otros suelos con propiedades edáficas tales como pH extremo, diferentes grados de compactación, granulación y agregados y niveles de elementos químicos claves para el suelo. Si bien realizamos ensayos usando suelos de tres localidades ubicadas en una zona con una productividad agronómica muy eficiente, reconocemos que las propiedades de esos suelos son muy semejantes entre sí, comparten muchas

de las características ambientales y propiedades edáficas. El estudio realizado no explora el comportamiento de nuestras PGPR en condiciones contrastantes de suelo y ambiente.

# **CAPÍTULO V**

## **Ensayos a campo de inoculación con promotoras de crecimiento**

Para concluir con la recomendación del uso de PGPR como biofertilizantes, es importante que los resultados obtenidos en los ensayos de inoculación de plantas en el laboratorio sean validados con ensayos a campo sobre cultivos de interés agronómico. En este contexto, nos propusimos evaluar la respuesta a la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.2.24 en cultivos de interés agronómico, tanto en ensayos de laboratorio como también ensayos a campo. La evaluación del efecto de la inoculación con cepas promotoras de crecimiento consistió en determinar:

a- Parámetros fisiológicos en laboratorio;

- Altura de planta
- Diámetro de tallo
- Longitud de raíz
- Peso seco de parte aérea y raíz

b- Parámetros de rendimiento;

- Kilogramos de grano por hectárea (kg/ha)

Estas variables fueron determinadas en cultivos de tomate, trigo y alfalfa, en condiciones controladas (cámara de plantas), mientras que los ensayos con trigo, maíz y soja fueron realizados en 3 localidades de la Provincia de Buenos Aires, durante 6 campañas sucesivas entre los años 2012 y 2017.

### **Objetivos:**

- Evaluar el efecto de promoción de crecimiento de las cepas bacterianas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 en tomate, trigo y alfalfa en microcosmos y ambiente controlado.
- Evaluar el efecto de la inoculación de soja, trigo y maíz con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, en ensayos a campo de la zona núcleo agrícola de la provincia de Buenos Aires.

## **5. Resultados y Discusión**

### **5.1 Inoculación de tomate, trigo y alfalfa**

Las características de los ensayos con tomate, trigo y alfalfa fueron las siguientes:

El ensayo se realizó en condiciones controladas de temperatura, luz y ciclo día/noche, un grupo de plantas fueron inoculadas con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 de forma independiente, 5 días post-germinación. Otro grupo de plantas sin inocular se utilizó como control, los ensayo comprendieron 3 réplicas con 15 plantas por réplica en cada tratamiento y el ensayo se mantuvo por 35 días post-inoculación.

#### **5.1.1 Evaluación de la respuesta a la inoculación de tomate**

Los efectos de la inoculación de tomate fueron significativamente superiores comparadas con las plantas sin inocular. El aumento de la altura fue del 53% para plantas inoculadas con la cepa E.sp.2.14, y 30% para plantas inoculadas con la cepa E.sp.1.24. (Figura 39, panel A). Por su parte, el aumento del diámetro del tallo resultó del 46.8% y 24.9%, para plantas inoculadas con las cepas E.sp.2.14, y E.sp.1.24, respectivamente (Figura 39, panel B).

La variable longitud de raíz exhibió aumentos significativos del 60,4% y 103% en plantas inoculadas con las cepas E.sp.2.14 y E. sp. 1.24, respectivamente (Figura 39, panel C). Este efecto sobre la raíz es de gran importancia para las plantas ya que el mayor desarrollo radical mejora su anclaje y permite explorar un área mayor de suelo en la búsqueda de nutrientes.

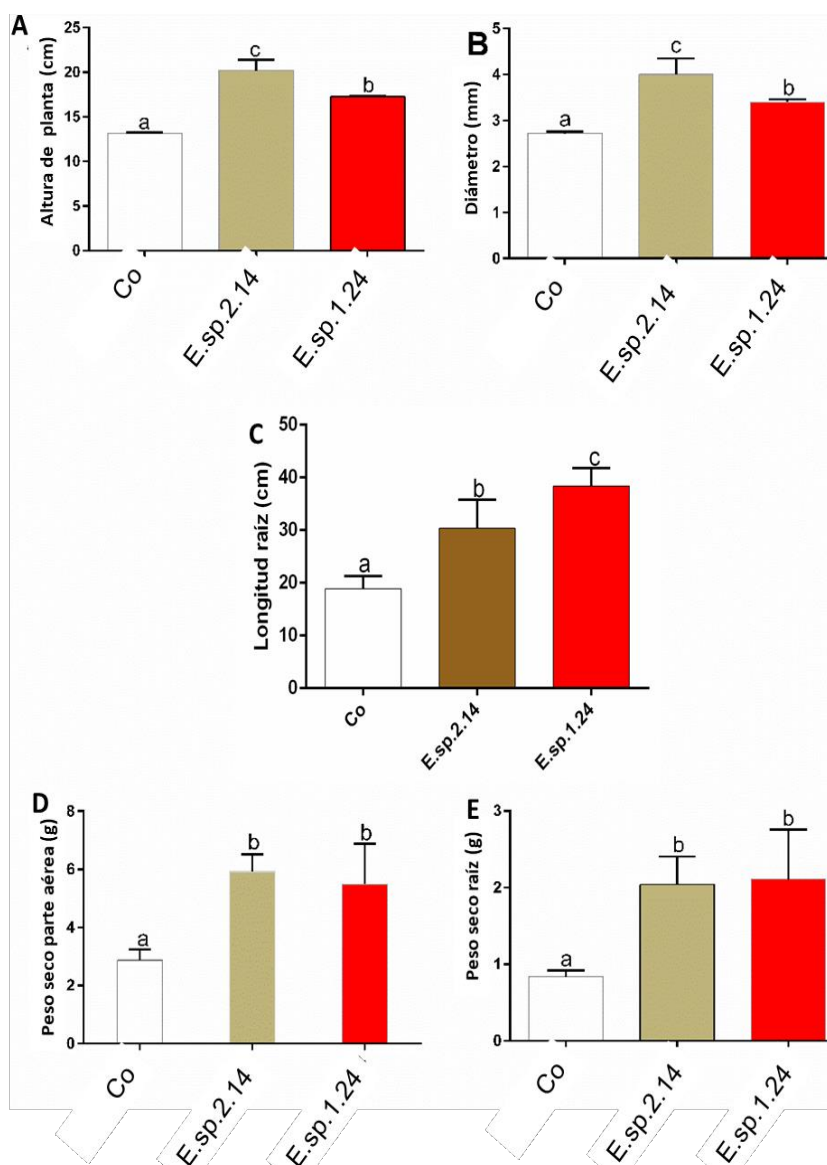
La inoculación promueve un aumento de peso seco tanto de la parte aérea como de raíz (Figura 39, paneles D y E). La respuesta a la inoculación con E.sp.2.14 fue superior a E.sp.1.24, a excepción del peso seco y longitud de raíz. Podemos concluir que la inoculación de tomate con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 tiene efectos positivos.

#### **5.1.2 Evaluación de la respuesta en alfalfa**

Las plantas de alfalfa inoculadas presentaron aumentos estadísticamente significativos en todas las variables respecto al control (Figura 40). La variable altura aumentó 66,8% y 72% en las plantas inoculadas con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, respectivamente; asimismo, el diámetro del tallo aumentó 114% y



120%. El aumento de la longitud de raíz fue del 16,6% y 12,2%, en las plantas inoculadas, respectivamente (Figura 40, paneles A, B y C).



**Figura 39. Efecto de inoculación del tomate con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 sobre el crecimiento del tomate.** El ensayo fue realizado en condiciones controladas de incubación en cámara de cultivo. Altura de planta (A), diámetro de tallo (B), longitud de raíz (C), peso seco parte aérea (D) y raíz (E). Co: control sin inoculación. Se aplicó la prueba de Tukey, las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre sí.

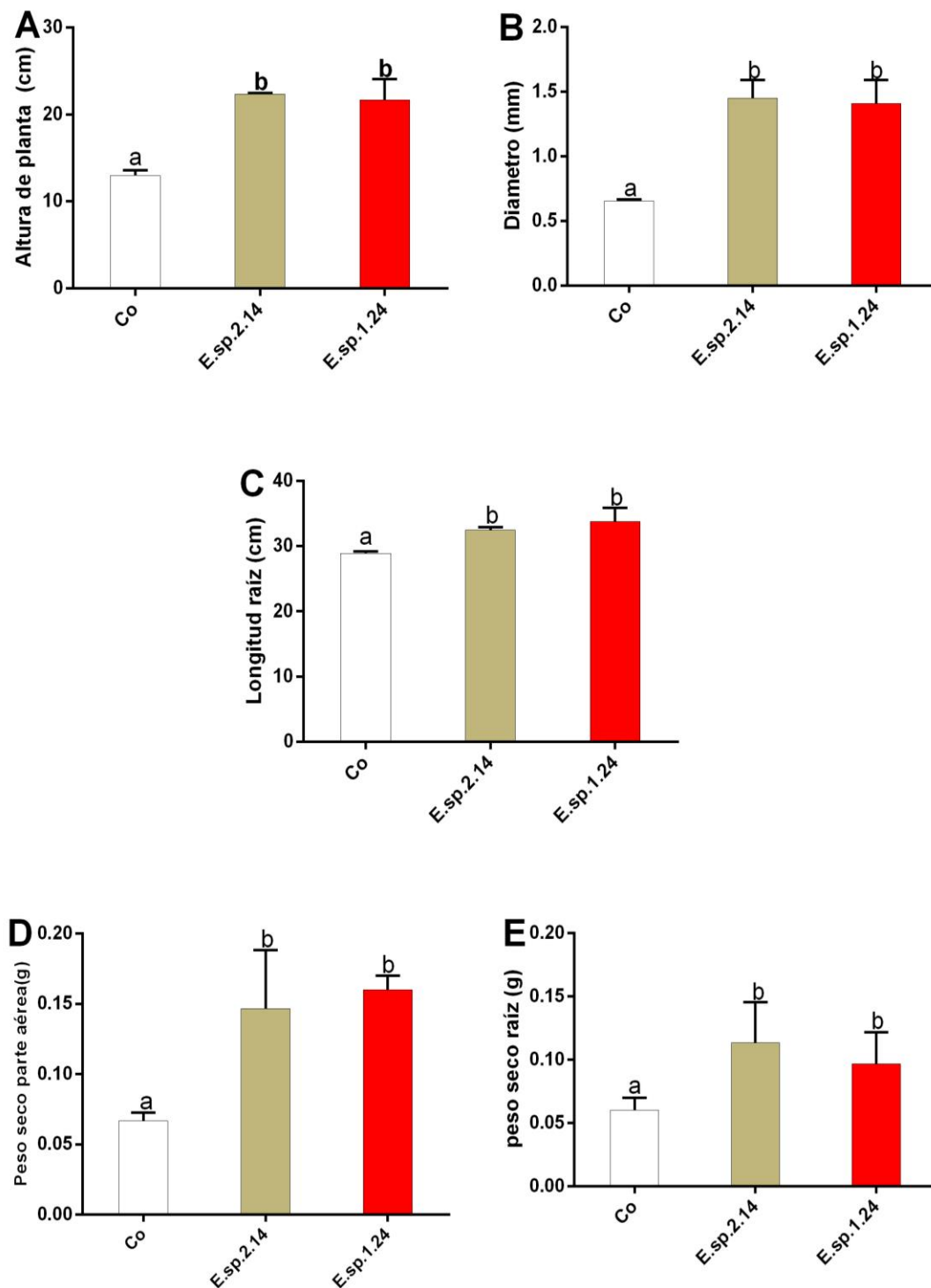
El aumento de la variable peso seco de parte aérea y raíz fue para E.sp.2.14 del 106,7% y 79.5% mientras, que para E.sp.1.24 fue del 111,9% y 90%, respectivamente (Figura 40 paneles D y E). Estos resultados indican un efecto estimulante del crecimiento de una leguminosa forrajera por la inoculación de las cepas.

### **5.1.3 Evaluación de la respuesta en trigo**

Los resultados obtenidos en el ensayo de inoculación de trigo se presentan en la Figura 41. Encontramos un aumento significativo de la altura de las plantas, diámetro de tallo y peso seco, tanto para la cepa E.sp.2.14 como para la cepa E. sp. 1.24. Por otra parte, sólo se observaron diferencias significativas en la longitud de raíz inoculadas con la cepa E.sp. 1.24, no así para las plantas inoculadas con E.sp.2.14. Los aumentos con la cepa E.sp. 2.14 y E.sp. 1.24 respectivamente fueron: 16,4% y 57,5% en altura de planta, 94,6% y 100% en diámetro de tallo, 106,4% y 86,6% en peso seco aéreo, 142% y 77,6% en peso seco raíz (Figura 41 paneles A-D). A partir de estos resultados se puede concluir que la inoculación estuvo asociada al crecimiento de trigo, lo que genera expectativas positivas para un futuro ensayo a campo.

Podemos concluir que la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 promueve el aumento del crecimiento de los cultivos de tomate, alfalfa y trigo, indicando que la habilidad PGPR de las cepas expresa su potencial en un amplio espectro de especies vegetales, tales como las ensayadas en este trabajo, representativas de gramíneas, solanáceas y fabáceas. Mirza *et al.* (2001) [259] reportaron que la inoculación con bacterias PGPR del género *Enterobacter* sp. incrementó el peso seco de la raíz y de los brotes de caña de azúcar en sistemas de cultivo *in vitro*. Por otra parte, Mehnaz *et al.* (2001) [260] mostraron los efectos de la inoculación con cepas de la especie *E. cloacae* en cultivos de arroz, donde observaron aumentos del área radical y biomasa de raíz y parte aérea

Estos resultados en conjunto, muestran que la capacidad PGPR de *Enterobacter* sp. se distribuye en una diversidad de cultivos importantes desde el punto de vista agropecuario, social y económico. Además, su uso ayudaría a disminuir la aplicación de agroquímicos y con ello evitar el deterioro de los agroecosistemas. Encontramos indispensable realizar ensayos para determinar si los efectos observados en laboratorio se pueden extrapolar a campo, ya que en estas condiciones las bacterias deben enfrentarse a diferentes condiciones ambientales que pueden afectar su crecimiento [261].



**Figura 40. Efecto de inoculación de alfalfa con las cepas *E.sp.2.14* y *E.sp.1.24*.** Altura de plantas (A), diámetro de tallo (B), longitud de raíz (C), peso seco parte aérea (D) y raíz (E). La abreviatura **Co** indica control (sin inoculación). Se aplicó la prueba de Tukey, las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

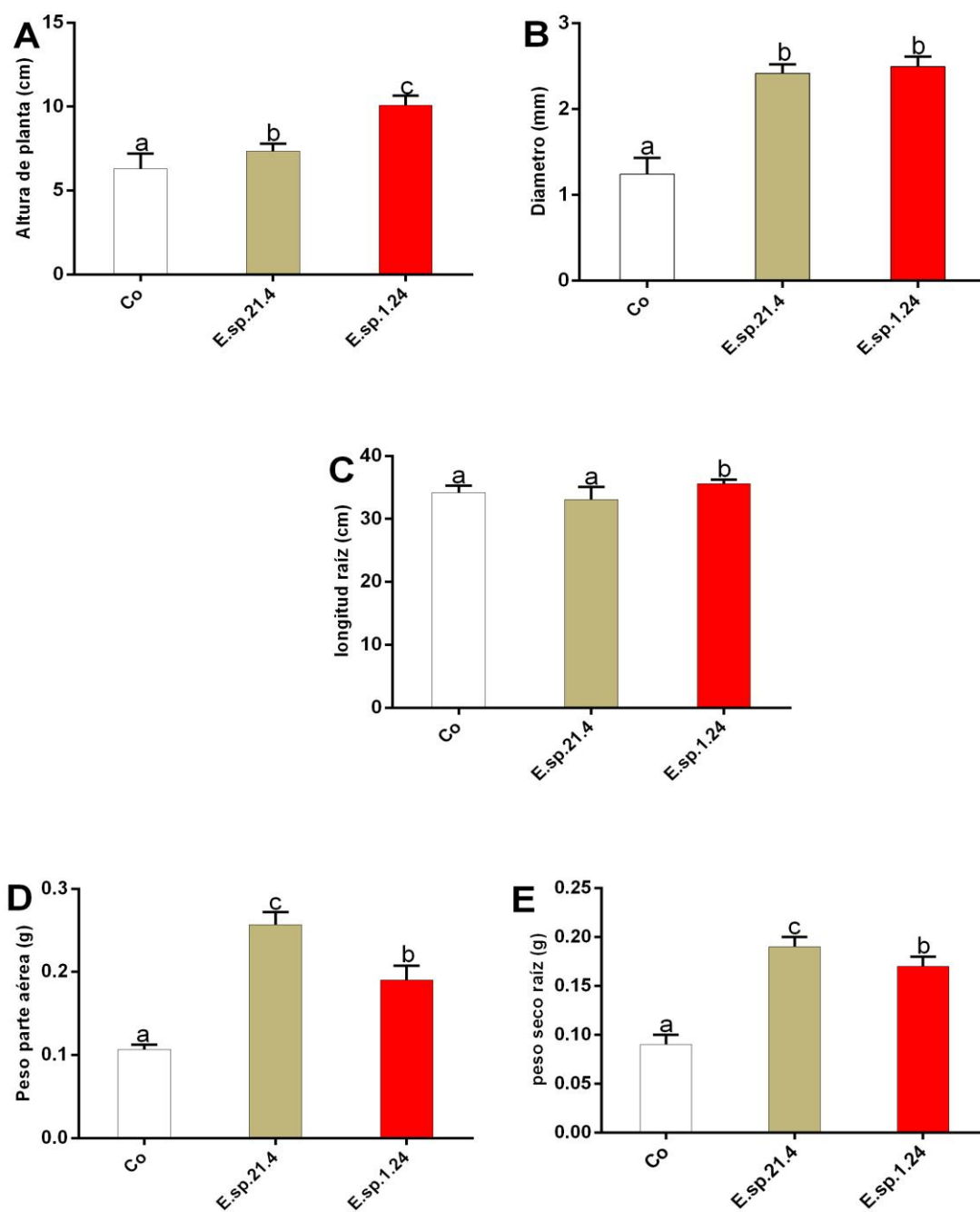


Figura 41. Efecto de la inoculación de trigo con las cepas E.sp.21.4 y E.sp.1.24 en ambiente controlado. Altura de plantas (A), diámetro de tallo (B), longitud de raíz (C), peso seco parte aérea (D) y raíz (E). La abreviatura Co indica al control (sin inoculación). Se aplicó la prueba de Tukey, las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 5.2 Ensayos a campo de inoculación de trigo, maíz y soja

Con el fin de determinar a campo, el efecto de la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 sobre la productividad y parámetros fisiológicos de los cultivos de trigo, maíz y soja, se realizaron ensayos en diferentes localidades

de la provincia de Buenos Aires. Para los tres cultivos se diseñaron ensayos con diferentes tratamientos que se encuentran descriptos en la sección de Materiales y Métodos. Con el propósito de darle robustez a los datos, estos ensayos fueron repetidos en sucesivas campañas de siembra entre los años 2012 y 2017. Se realizaron 10 ensayos en trigo, 9 en soja y 10 en maíz.

Los ensayos fueron realizados con la colaboración de Rizobacter Argentina S.A. en los campos de la Escuela Agrotécnica Salesiana en la localidad de Ferré, campo las Alisias en la localidad de Junín y campo experimental de Rizobacter en la localidad de Pergamino. La grilla de distribución de las parcelas fue realizada según un diseño estadístico de bloques completos al azar con tres repeticiones. En los ensayos de trigo y maíz se utilizó además el inoculante comercial Rizofos (Rizobacter SA) formulado con bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens*, usado como biofertilizante promotor del crecimiento vegetal. En el caso de soja, también se inoculó con el producto comercial Rizoliq (Rizobacter SA) que contiene cepas simbióticas del género *Bradyrhizobium sp.* La inoculación con estos productos comerciales fueron incluidos con el propósito de comparar rendimientos con las cepas E.sp.2.14 y E.sp1.24.

A continuación se hace referencia a los datos obtenidos de evaluar en primer término el rendimiento expresado en kg grano/hectárea (kg/ha) y en segundo término el de los parámetros fisiológicos de los cultivos.

### **5.2.1 Ensayos de inoculación de trigo**

Los resultados de los rendimientos obtenidos en cada localidad se presentan en Tabla 15.

#### **Ferré**

El rendimiento promedio de las diferentes campañas fue 3884,8Kg/ha. En particular, el rendimiento más alto se registró en el tratamiento con el inoculante comercial (Rizofos) (3993.9 Kg/ha), seguido de los tratamientos inoculados con E.sp.2.14 (3892.9 kg/ha), E.sp.1.24 (3862.7 kg/ha) y el tratamiento de la co-inoculación de las cepas E.sp.2.14-E.sp.1.24 (3861.9 Kg/ha). El tratamiento control presentó el menor rendimiento (3813,6 Kg/ha), sin significancia estadística con los tratamientos que fueron inoculados con la cepa E.sp.1.24 y con la co-inoculación de las cepas. Por el contrario, el

tratamiento con el inoculante comercial y el tratamiento con la cepa E.sp.2.14 presentaron diferencias significativas comparadas con el control. El aumento del rendimiento por efecto de la inoculación fue: Inoculante comercial 4,7%, inoculado con la cepa E.sp.2.14 2,1%, inoculado con la cepa E.sp.1.24 1,3%, y co-inoculado con las cepas 1,3%.

### ***Junín***

El rendimiento promedio de las diferentes campañas fue 4887,2 Kg/ha, superior al registrado en la localidad de Ferré. En particular, el rendimiento del tratamiento inoculado con la cepa E.sp.2.14 fue el más alto (5033,1kg/ha), con diferencias significativas respecto al control. Por el contrario, el aumento del rendimiento en el tratamiento con el inoculante comercial no tuvo significancia estadística. Por su parte, los rendimientos de las parcelas inoculadas con la cepa E.sp.1.24, así como con la co-inoculación de las cepas, presentaron rendimientos por debajo del control.

El aumento del rendimiento fue: Inoculado con la cepa E.sp.2.14 3.4%, inoculante comercial 0.1%. La a inoculación con E.sp.1.24 y la co-inoculación de las cepas registraron una disminución de -0.5% y -1%, respetivamente.

### ***Pergamino***

Se registraron los rendimientos más altos comparados con las otras dos localidades. El rendimiento promedio de las diferentes campañas para esta localidad fue de 5807,7 Kg/ha. El tratamiento control exhibió el menor rendimiento, seguido del tratamiento con el inoculante comercial mientras que los rendimientos en los tratamientos inoculados con las cepas E.sp.1.24, E. sp.E.sp.2.14 y la co-inoculación fueron los más altos, con 5962,3, 5863,2 y 5863,6 kg/ha, respectivamente. Las diferencias con el control e inoculante comercial fueron estadísticamente significativas.

Resultó interesante encontrar que en Pergamino el rendimiento de los tratamientos correspondientes a la inoculación con nuestras cepas fue el más alto en comparación con los rendimientos de Ferré y Junín.

El aumento porcentual del rendimiento fue: tratamiento inoculado con la cepa E.sp.1.24 5,7%, tratamiento inoculado con la cepa E.sp.2.14 4% y en el tratamiento con la co-inoculación de las cepas 4%. Se observó que el inoculante comercial mostró la menor respuesta en el rendimiento (1,3%).

Con el propósito de evaluar los rendimientos de las tres localidades en conjunto, se promediaron los rendimientos de los 10 ensayos (Tabla 16). Los aumentos no resultaron estadísticamente significativos tanto en los tratamientos inoculados con las cepas, como en el tratamiento con el inoculante comercial en comparación con el control. El aumento del rendimiento con la cepa E.sp.2.14 fue 4.4%, seguido de los tratamientos con la cepa E.sp.1.24 (2.7%), inoculante comercial (2.6%) y por último con la co-inoculación de las cepas (1.6%). La inoculación con las cepas, provocaron rendimientos superiores al del inoculante comercial.

En ensayos realizados en laboratorio por *Tahir et al.* (2013) se reportó el incremento del rendimiento, entre 9.3% y 14.8%, en trigo inoculado con *Azospirillum*, *Bacillus* y *Enterobacter*. Estos resultados luego fueron validados a campo, encontrando que las plantas inoculadas con las cepas del género *Enterobacter* estuvo asociadas a la mayor respuesta en el rendimiento, del 5%. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestros ensayos en suelos de la provincia de Buenos Aires, por lo que podemos especular que la promoción de crecimiento de trigo es una propiedad ubicua en cepas de *Enterobacter* aisladas en distintos sitios y especies vegetales, sugiriendo la ocurrencia de una interacción positiva con trigo. El nivel de efecto es importante, indican que nuestras cepas generan un mayor rendimiento que el inoculante comercial en condiciones de cultivo a campo.

Con respecto a las variables fisiológicas evaluadas en Ferré (Tabla S5) resultó que el número de plantas, peso seco y peso fresco de las espigas no presentaron aumentos por la inoculación con cada una de las cepas e inoculante comercial. Sin embargo, el número de espigas exhibió una disminución significativa del 31,1%, en el tratamiento inoculado con la cepa E.sp.2.14 mientras que, los demás tratamientos no presentaron cambios o variaciones con respecto al control. La variable número de macollos por metro cuadrado mostró aumentos estadísticamente significativos, en los tratamientos inoculados con la cepa E.sp.2.14 (50%) e inoculante comercial (8,9%), cuando se comparó con el control. El peso seco de los macollos registro aumento significativo en el tratamiento con la cepa E.sp.2.14 (43,7%) e inoculante comercial (9,10%), comparados con el control. Con respecto a la variable peso fresco del macollo, se observó aumento estadísticamente significativo en el

tratamiento inoculado con la cepa E.sp.2.14 (35,4%). Estas variables no mostraron diferencias significativas entre tratamientos del ensayo de los campos de Junín y Pergamino. (Tabla S6 y S7).



**Tabla 15.** Valores promedio de rendimiento de las campañas de siembra de trigo en localidades Junín, Ferré y Pergamino.

| Tratamiento             | Promedio del rendimiento en la diferentes campañas |                              |                           |                     |                              |                           |                     |                              |                           |
|-------------------------|--|------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------|
|                         | Localidad Ferré                                    |                              |                           | Localidad Junín     |                              |                           | Localidad Pergamino |                              |                           |
|                         | Rendimiento (Kg/ha)                                | Aumento (Kg/ha) <sup>*</sup> | Aumento (%) <sup>**</sup> | Rendimiento (Kg/ha) | Aumento (Kg/ha) <sup>*</sup> | Aumento (%) <sup>**</sup> | Rendimiento (Kg/ha) | Aumento (Kg/ha) <sup>*</sup> | Aumento (%) <sup>**</sup> |
| <b>control:</b>         |  |                              |                           |                     |                              |                           |                     |                              |                           |
| Sin inoculación         | 3813,6a  |                              |                           | 4868,1 a            |                              |                           | 5638,9 a            |                              |                           |
| <b>Inoculación:</b>     |  |                              |                           |                     |                              |                           |                     |                              |                           |
| E.sp. 1.24              | 3862,7 a   | 49,1                         | 1,3                       | 4846,1 a            | -22,01                       | -0,5                      | 5962,3 b            | 323                          | 5,7                       |
| E.sp.1.24-<br>E.sp.2.14 | 3861,9 a   | 48,3                         | 1,3                       | 4817,2 a            | -50,9                        | -1                        | 5863,6 b            | 225                          | 4                         |
| E.sp.2.14               | 3892,1 b   | 78,5                         | 2,1                       | 5033,1 b            | 164,9                        | 3,4                       | 5863,2 b            | 224                          | 4                         |
| Rizofos                 | 3993,9 b   | 180,3                        | 4,7                       | 4871,7 a            | 3,5                          | 0,1                       | 5710,7 a            | 72                           | 1,3                       |

Se aplicó análisis de varianza contrastando las medias con el test Tukey. Los subíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.01$ ).

(\*) Aumento del rendimiento (kilogramos por hectárea kg/ha).

(\*\*) Aumento porcentual del rendimiento.

**Tabla 16.** Rendimiento promedio de granos por hectárea en los campos de Junín, Ferré y Pergamino.

| Tratamiento             | Rendimiento (Kg/ha) | Aumento* (Kg/ha) | Aumento (%)** |
|-------------------------|---------------------|------------------|---------------|
| Control sin inoculación | 4560,3              |                  |               |
| <b>Inoculación:</b>     |                     |                  |               |
| E. sp. 1.24             | 4683,1              | 122,8            | 2,7           |
| E. sp. 1.24+E. sp. 2.14 | 4634,4              | 74,1             | 1,6           |
| E.sp.2.14               | 4760                | 199,7            | 4,4           |
| Rizofos                 | 4676,8              | 116,5            | 2,6           |

(\*) Aumento del rendimiento (kilogramos por hectárea kg/ha).

(\*\*) Aumento porcentual del rendimiento.

### 5.2.2 Ensayos de inoculación de maíz

#### **Ferré**

Los resultados del análisis de rendimiento se presentan en la Tabla 17. El tratamiento control e inoculado con la cepa E.sp.2.14 no presentaron diferencias significativas, mientras que la co-inoculación con las cepas registró una disminución significativa del 3,3% con respecto al control. Los tratamientos inoculados con la cepa E.sp.1.24 e inoculante comercial exhiben aumentos con respecto al control del 3,1% y 1,7%, respectivamente. Por el contrario, el rendimiento del cultivo inoculado con la cepa E.sp.2.14 fue inferior al control.

#### **Junín**

Encontramos que los tratamientos inoculados con E.sp.1.24, la co-inoculación y con el inoculante comercial, registraron aumentos del rendimiento con significancia estadística comparado con el control, el aumento fue del 5%, 4.8% y 6.8%, respectivamente. Los tratamientos control e inoculado con la cepa E.sp.2.14 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, aunque la inoculación generó un aumento del 2.9%.

#### **Pergamino**

El rendimiento aumentó con la inoculación con las cepas E.sp.2.14 (1.4%), E.sp.1.24 (0.4%) y con el inoculante comercial (2.4%), pero sin significancia estadística con respecto al control. Por el contrario, en el tratamiento co-inoculación con las cepas aumentó un 2,7 %, y fue significativo.

En la Tabla 18 se presentan los resultados de rendimiento de las tres localidades en conjunto (10 ensayos). El análisis estadístico indica que entre los tratamientos inoculados con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 y los inoculados con el inoculante comercial no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, aunque se observó un aumento del rendimiento en los tratamientos inoculados con la cepa E.sp.2.14 (1,5%), cepa E.sp.1.24 (2,9%), con co-inoculación de las cepas (1,6%) y con el inoculante comercial (3,8%).

Se concluye que la inoculación con nuestras cepas estimula el crecimiento a campo, aumentando los rendimientos del maíz en un nivel ligeramente inferior al obtenido con el tratamiento de inoculación con el producto comercial con *P. fluorescens*. Cabe aclarar que las semillas utilizadas en los ensayos descritos tuvieron un tratamiento con el producto químico Acceleron, el cual no fue evaluado en su efecto sobre las cepas.

Con respecto a las evaluaciones de las variables fisiológicas en los ensayos de maíz se encontró que los tratamientos inoculados con las cepas e inoculadas con el producto comercial no exhibieron diferencias significativas (Tabla S8, S9 y S10).

### **5.2.3 Ensayos de inoculación de soja**

Los resultados de los rendimientos en soja se presentan en la Tabla 19.

#### **Ferré**

El tratamiento control registró el rendimiento más bajo (5538.1 Kg/ha), mientras que el tratamiento inoculado con la cepa E.sp.2.14 exhibió la respuesta más alta (5818 kg/ha). La inoculación con la mezcla de las cepas E.sp.2.14+E.sp.1.24, E.sp.1.24+Rizoliq y el tratamiento con Rizoliq registraron aumentos en el rendimiento, pero no fueron significativos comparados con el control.

Los tratamientos: E.sp.2.14+E.sp.1.24+rizoliq, E.sp.1.24 E.sp.2.14+Rizoliq y E.sp.2.14 exhibieron incrementos en el rendimiento del 2,9%, 3,9%, 3,1 y 5%%, respectivamente, siendo estadísticamente significativos comparados con el control.

**Tabla 17** Valores promedio de rendimiento en las localidades Junín, Ferré y Pergamino. Diferencias entre los tratamientos y el control.

| Tratamiento                       | Promedio del rendimientos de las campañas de siembra |                      |                   |                        |                      |                   |                        |                      |                   |
|-----------------------------------|--|----------------------|-------------------|------------------------|----------------------|-------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
|                                   | Localidad Ferré                                      |                      |                   | Localidad Junín        |                      |                   | Localidad Pergamino    |                      |                   |
|                                   | Rendimiento<br>(Kg/ha)                               | Aumento<br>(Kg/ha) * | Aumento<br>(%) ** | Rendimiento<br>(Kg/ha) | Aumento<br>(Kg/ha) * | Aumento<br>(%) ** | Rendimiento<br>(Kg/ha) | Aumento<br>(Kg/ha) * | Aumento<br>(%) ** |
| Control                           | 9494,5b  |                      |                   | 12296,1 a              |                      |                   | 11462,8 a              |                      |                   |
| <b>Inoculación:</b>               |  |                      |                   |                        |                      |                   |                        |                      |                   |
| E. sp. E. sp. 2.14                | 9491,6 b   | -2,8                 | -0,03             | 12659,9 a              | 363,8                | 2,96              | 11628,0 a              | 165,2                | 1,4               |
| E. sp. 1.24                       | 9801,4 c   | 306,9                | 3,15              | 12916,0 b              | 619,9                | 5,04              | 11505,5 a              | 42,7                 | 0,4               |
| E. sp. 1.24+E. sp. E. sp.<br>2.14 | 9171,7 a   | -322,7               | -3,31             | 12863,8 b              | 567,7                | 4,62              | 11766,8 b              | 304                  | 2,7               |
| Rizofos                           | 9667,6 c   | 173,1                | 1,77              | 13135,5 c              | 839,5                | 6,83              | 11741,9 a              | 279,1                | 2,4               |

Se aplicó análisis de varianza contrastando las medias con el test Tukey. Los subíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.01$ ).

(\*) Aumento del rendimiento (kilogramos por hectárea kg/ha).

(\*\*) Aumento porcentual del rendimiento.

**Tabla 18.** Valores promedio del rendimiento a campo de granos de maíz por hectárea en diferentes localidades Bonaerenses.

| Tratamiento                | Rendimiento (Kg/ha) | Aumento (Kg/ha) * | Aumento (%)** |
|----------------------------|---------------------|-------------------|---------------|
| Control sin<br>inoculación | 11084,4             |                   |               |
| <b>Inoculados:</b>         |                     |                   |               |
| E. sp. E. sp. 2.14         | 11259,9             | 175,4             | 1,58          |
| E. sp. 1.24                | 11407,6             | 323,2             | 2,92          |
| E. sp. 1.24+E. sp. 2.14    | 11267,4             | 183               | 1,65          |
| Rizofos                    | 11515               | 430,6             | 3,88          |

(\*) Aumento del rendimiento (kilogramos por hectárea kg/ha).

(\*\*) Aumento porcentual del rendimiento.

### **Junín**

El rendimiento en el caso de las combinaciones de E.sp.2.14+ E.sp.1.24+Rizoliq, y E.sp.1.24+Rizoliq registraron aumentos del 3,8% y 5,6%, respectivamente, con significancia estadística respecto al control. Contrariamente los rendimientos de los tratamientos inoculados con la cepa E.sp.2.14, E.sp.1.24, E.sp.2.14+ E.sp.1.24, E.sp.2.14+Rizoliq y con Rizoliq no mostraron significancia estadística.

### **Pergamino**

Los tratamientos inoculados con las cepas E.sp.1.24, E.sp.2.14+E.sp.1.24 y el tratamiento con Rizoliq, exhibieron aumentos estadísticamente significativo en el rendimiento comparados con el control, los aumentos fueron del 7,4%, 19,3% y 8,4%, respectivamente. Por el contrario, los tratamientos E.sp.2.14+E.sp.1.24+Rizoliq, E.sp.2.14 y E.sp.2.14+Rizoliq no presentaron diferencias significativas respecto del control, aunque generaron un aumento en el rendimiento.

Cuando se agruparon los rendimientos correspondientes a las tres localidades, la comparación de los respectivos promedios (9 ensayos) no reveló diferencias significativas respecto al control (Tabla 20), pero pudimos observar una tendencia a aumentar los rendimientos en los tratamientos inoculados con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24, con el inoculante comercial y sus respectivas variantes.

Podemos concluir que las cepas E. sp. 2.14, E.sp.1.24 estimulan el crecimiento de soja, lo cual se reveló en los valores de rendimiento de grano. En algunos casos, como en el tratamiento con la cepa E.sp.1.24 (4,3%) y las co-inoculación de las cepas (7.7%), se superaron los rendimientos obtenidos con el inoculante comercial a base de *Bradyrhizobium sp.* Estos resultados son auspiciosos para avanzar en la formulación de un producto de uso práctico para el agricultor, alternativo o complementario del uso de fertilizantes biológicos y químicos.

Entre los tratamientos E.sp.1.24+Rizoliq, E.sp.2.14+Rizoliq y E.sp.1.24+E.sp.1.24+Rizoliq, se registró algún tipo de sinergismo, por lo cual hay un menor rendimiento si se compara los tratamientos con las cepas e inoculante comercial aplicados de forma independiente. En la literatura se encuentran reportes de inoculación de bacterias PGPR con capacidad de generar aumentos en los rendimientos en cultivos de soja a campo [262]–[265], encontramos interesante y novedoso que la inoculación con nuestras cepas incrementan rendimientos en los cultivos ensayados.

Con respecto a las variables fisiológicas evaluadas, en Ferré resultó que las siguientes variables no presentaban diferencias significativas comparadas con el control: Número de nódulos en la raíz principal, número de nódulos raíces secundarias, número de nódulos totales, peso seco de los nódulos de corona, de raíz principal, secundaria y peso seco de los nódulos totales (Tabla S11). En cuanto a la variable número de plantas por metro lineal, se observó un mayor número de plantas en el tratamiento con inoculación de la mezcla E.sp.2.14+Rizoliq y el tratamiento con la cepa E.sp.2.14, siendo estadísticamente significativo comparado con el control. Las plantas inoculadas con la cepa E.sp.2.14, E.sp.1.24 y el tratamiento con la cepa E.sp.2.14+Rizoliq presentaron un mayor número de nódulos, siendo significativo respecto del control.

**Tabla 19.** Valores promedio de rendimiento de las campañas de siembra en soja en campos las localidades Junín, Ferré y Pergamino.

| Tratamiento                     | Promedio de Campañas localidad Ferré |                  |               | Promedio de Campañas localidad Junín |                  |               | Promedio de Campañas localidad Pergamino |                  |               |
|---------------------------------|--------------------------------------|------------------|---------------|--------------------------------------|------------------|---------------|--|------------------|---------------|
|                                 | Rendimiento (Kg/ha)                  | Aumento (Kg/ha)* | Aumento (%)** | Rendimiento (Kg/ha)                  | Aumento (Kg/ha)* | Aumento (%)** | Rendimiento (Kg/ha)                      | Aumento (Kg/ha)* | Aumento (%)** |
| Control sin inoculación         | 5538, 1a                             |                  |               | 4566,4 a                             |                  |               | 5228,4 a                                 |                  |               |
| <b>Inoculación:</b>             |                                      |                  |               |                                      |                  |               |  |                  |               |
| E.sp.1.24 + E.sp.2.14 + Rizoliq | 5700,1 b                             | 162              | 2,9           | 4740,8 b                             | 174,4            | 3,8           | 5274,5 a                                 | 46,1             | 0,9           |
| E. sp. 2.14                     | 5815,7 d                             | 277,6            | 5             | 4575,6 a                             | 9,3              | 0,2           | 5370,1 a                                 | 141,7            | 2,7           |
| E. sp. 1.24                     | 5752,1 c                             | 214              | 3,9           | 4638,2 a                             | 71,9             | 1,6           | 5613,53 b                                | 385,13           | 7,4           |
| E.sp.1.24 + E. sp. 2.14         | 5598,1 a                             | 60               | 1,1           | 4693,9 a                             | 127,6            | 2,8           | 6236,43 c                                | 1008,03          | 19,3          |
| E.sp.1.24 + Rizoliq             | 5572,0 a                             | 33,9             | 0,6           | 4822,7 c                             | 256,4            | 5,6           | 5247, 8a                                 | 19,43            | 0,4           |
| E.sp.2.14 + Rizoliq             | 5710,7 a                             | 172,6            | 3,1           | 4700,1 a                             | 133,7            | 2,9           | 5160 a                                   | -68,4            | -1,3          |
| Rizoliq*                        | 5630,1 a                             | 92               | 1,7           | 4633,3 a                             | 66,9             | 1,5           | 5666,3 b                                 | 437,9            | 8,4           |

Se aplicó análisis de varianza contrastando las medias con el test Tukey. Los subíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.01$ )

(\*) Aumento del rendimiento (kilogramos por hectárea kg/ha).

(\*\*) Aumento porcentual del rendimiento (en porcentaje).

**Tabla 20.** Valores promedio del rendimiento de soja en conjunto de las localidades

| Tratamiento               | Rendimiento (Kg/ha) | Aumento (kg/ha)* | Aumento (%)** |
|---------------------------|---------------------|------------------|---------------|
| Control sin inoculación   | 5110,9              |                  |               |
| <b>Inoculación:</b>       |                     |                  |               |
| E.sp.1.24 + 214 + Rizoliq | 5238,4              | 127,5            | 2,4           |
| E. sp. E. sp. 2.14        | 5253,8              | 142,8            | 2,7           |
| E. sp. 1.24               | 5334,6              | 223,6            | 4,3           |
| E.sp.1.24 + E. sp. 2.14   | 5509,4              | 398,5            | 7,7           |
| E.sp.1.24 + Rizoliq       | 5214,1              | 103,2            | 2             |
| E.sp.2.14 + Rizoliq       | 5190,2              | 79,3             | 1,5           |
| Rizoliq                   | 5309,8              | 198,9            | 3,8           |

(\*) Aumento del rendimiento (kilogramos por hectárea kg/ha).

(\*\*) Aumento del rendimiento (en porcentaje).

En Junín se encontró que la variable número de nódulos de la corona, exhibió aumento significativo en los tratamientos E.sp.2.14+E.sp.1.24+Rizoliq y el tratamiento con la cepa E.sp.2.14. (Tabla S12). Las variables número de nódulos en la raíz principal, número de nódulos raíces secundarias, número de nódulos totales, peso seco de los nódulos de corona, de raíz principal, secundaria, peso seco de los nódulos totales y número de plantas por metro lineal no se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

En Pergamino, las variables número de plantas, número de nódulos totales, peso seco de nódulos de raíz principal, secundaria y peso seco de nódulos totales no registraron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control (Tabla S13). Los tratamientos inoculados con la cepa E.sp.1.24 y el tratamiento con Rizoliq, presentaron un aumento en el número de nódulos de la corona, siendo estadísticamente significativos con respecto al control. El número de nódulos de raíz principal muestra un aumento significativo en los tratamientos con co-inoculación con las cepas E.sp.2.14+E.sp. 2.24, con la cepa E.sp.2.14 + Rizoliq, con la cepa E.sp.1.24 y el inoculante comercial Rizoliq. La variable número de nódulos de la raíz secundaria registro aumento significativo en el número de nódulos, en el tratamiento E.sp.2.14+E.sp.2.24+Rizoliq cuando se comparó con el control.



Por otra parte se observó un aumento significativo en el peso seco de los nódulos de la corona en los tratamientos con las cepas E. sp. 2.14+ E.sp.1.24 y en el tratamiento con la cepa E. sp. 2.14+ Rizoliq. Se puede concluir que las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 tienen la tendencia de aumentar el número de nódulos en soja, esto quizás se deba a una mayor área radicular, producto de la estimulación de las cepas, lo que favorecería un aumento de eventos de infección con sus simbioses *Bradyrhizobium sp*, conduciendo a la formación de un mayor número de nódulos. Este efecto ya ha sido reportado por Prakamhang *et al.* (2015) en ensayos de inoculación de soja con bacterias PGPR, donde observaron un aumento del número de nódulos y mayor peso, atribuido a un área radical superior, por la estimulación de las bacterias PGPR.

### **5.3 Conclusiones**

En este capítulo se han descrito los efectos de la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 sobre cultivos de interés agronómico, en dos ambientes de crecimiento, ambiente controlado y a campo. Los resultados evidencian que: La inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 aumentan diversos parámetros de crecimiento en tomate, trigo y alfalfa, cultivados en condiciones ambientales controladas. Los resultados encontrados soportan el rol estimulante de crecimiento, de las bacterias aplicadas sobre diferentes especies vegetales.

La inoculación de las semillas de trigo, maíz y soja tanto con la cepa E.sp.2.14 como con E.sp.1.24 y crecidas a campo, registraron aumentos del rendimiento de grano. Los resultados muestran en primer término la validación a campo de los rendimientos observados en el laboratorio.

En particular, para nuestro país no se han reportado ensayos de promoción de crecimiento de trigo, maíz y soja a campo con cepas del género *Enterobacter sp*. El análisis de los resultados del presente trabajo indican la interacción positiva entre las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 y trigo, maíz y soja, en las tres localidades, alcanzando aumentos de los rendimientos, en algunos casos significativos respecto a los controles y tratamientos con los inoculantes comerciales.

Se ha demostrado un interés creciente en el uso de biofertilizantes compuestos por microorganismos benéficos, que mejora el crecimiento de las plantas a

través del suministro de nutrientes, mantienen una buena salud y la productividad en los suelo [266]. Sin embargo, una discrepancia en los resultados de los rendimientos entre ensayos en laboratorio y a campo ha limitado su uso comercial generalizado, muy probablemente debido a la incapacidad de los inóculos para competir con la microflora nativa del suelo e incapacidad para adaptarse al microambientes de la zona rizosférica, esto limitaría la asociación entre las bacterias inoculadas y la raíz [147], [154], [267], [268] lo que conllevaría a la variabilidad en los resultados de los rendimientos en los cultivos a campo. También, es posible que la formulación del inoculante condiciones la eficiencia de las cepas. En este contexto podemos inferir que los resultados obtenidos en el aumento de rendimiento a campo, demuestra la capacidad de las cepas para alcanzar a establecer asociación con las raíces de las plantas, competir con las bacterias nativas del suelo y colonizar de forma efectiva sus tejidos, y de esta forma expresar su potencial de promoción de crecimiento en los cultivos estudiados. Al evaluar los rendimientos en las tres localidades en su conjunto, para cada cultivo, se encontró que la inoculación con las cepas e inoculante comercial no muestran diferencias estadísticamente significativas con el control, esto quizás se deba a la alta variabilidad que se registró en los rendimientos entre las localidades. La variabilidad y reproducibilidad de resultados a campo ha sido encontrado y descrito por otros autores. Sin embargo, es posible especular respecto a posibles factores. La variabilidad en el rendimiento estaría afectada por el nivel de P en los suelos ya que los mayores rendimientos se registran en la localidad de Pergamino, donde el P tiene una mayor concentración de 18,4 ppm, seguido de la localidad de Ferré, (13 ppm) y por último la localidad de Junín (4,7 ppm). Los rendimientos de los cultivos evaluados tienden a aumentar en los tratamientos inoculadas con las cepas. Tomado el conjunto de datos, se concluye que las cepas E.sp.2.24 y E.sp.1.24 tienen un gran potencial de bioestimulante para el uso comercial.

**CAPÍTULO VI**

**CARACTERIZACIÓN DE LA  
COMUNIDAD ENDÓFITA DE  
TRIGO MEDIANTE EL ANÁLISIS  
DEL ADN-*nifH***

## **Introducción**

La ocurrencia de una amplia diversidad de microorganismos endófitos diazotróficos asociados a cultivos de importancia agronómica ha sido descrita en varias publicaciones aplicando técnicas de secuenciación masiva, huella dactilar y cultivo dependientes. El análisis de las secuencias *nifH* sugiere que una importante proporción de estos endófitos se corresponden con microorganismos aún sin identificación taxonómica y/o no han sido cultivados *in vitro* [81], [122], [123], [269]–[275]. En estos estudios se encuentran rasgos interesantes en la abundancia y dominancia de la comunidad fijadora dentro de la endofítica [209], [270]. Por otra parte se ha reportado que estas comunidades son principalmente afectadas por factores tales como el tipo de suelo, el estado fenológico y nutricional de la planta, la fertilización química e inoculación con bacterias PGPR, indicando que son dinámicas y se adecúan a los diferentes cambios ambientales [131], [270], [273], [275]–[277].

Las metodologías independientes del cultivo celular han sido muy útiles para ahondar en el conocimiento sobre la estructura de la comunidad con potencialidad de fijar nitrógeno en ambientes naturales. La identificación de las secuencias *nifH* obtenidas a partir del ADN, permite aproximarnos a la diversidad de las comunidades de fijadores, y la definición del perfil de las comunidades endofíticas. Burbano *et al.* (2011) [93] estudiaron la estructura de la comunidad endófito activa en raíces de caña de azúcar a través del análisis de secuencias ADN-*nifH*, revelando que la mayor parte de los transcritos presentaron alta homología con el gen *nifH* de *Rhizobium rosettiformans*. En análisis de secuencias *nifH*, a partir del ADN de tejidos desinfectados superficialmente de arroz mostraron una amplia diversidad de genes *nifH* relacionados con Gama-, Beta-, Alfa-, y Deltaproteobacterias, Firmicutes, Cyanobacterias [209]. Se ha sugerido que el interior de los tejidos vegetales es un ambiente propicio para que se lleve a cabo la FBN, ya que contiene bajos niveles de oxígeno y relativamente alto en fuentes de carbono, siendo favorable para activar la enzima nitrogenasa y soportar los requerimientos nutricionales de los endófitos [31], [278]–[281]. Cabe destacar, que la presencia de secuencias *nifH* en el ADN no implica necesariamente que las mismas correspondan a bacterias activas en este proceso, ya que FBN es un proceso

fuertemente regulado, tanto a nivel transcripcional como al post-traduccionál [282].

En el presente capítulo se describen los resultados del estudio de secuencias *nifH* de la comunidad endofítica de trigo mediante las técnicas de RFLP y pirosecuenciación, efectos de la inoculación con bacterias PGPR y el sitio de cultivo.

### **Objetivos**

- ✓ Evaluar, mediante técnicas metagenómicas, los efectos de la inoculación con bacterias PGPR en la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en plantas de trigo.

### **Objetivos específicos**

- Investigar la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en plantas de trigo cultivadas a campo, evaluando los efectos de la inoculación con bacterias PGPR y sitio de cultivo.

## **6. Resultados y Discusión**

### **6.1 Consideraciones generales sobre la metodología experimental**

Con el propósito de evaluar el efecto de la inoculación de cepas PGPR en la comunidad endofítica de plantas de trigo creciendo a campo, se propuso el siguiente ensayo: en dos sitios, situados en la escuela agrotécnica Ferré y en el campo Las Alias en Junín, Provincia de Buenos Aires, se contemplaron dos tratamientos, 1- tratamiento co-inoculado con las cepas *Enterobacter* sp. 2.14 y E.sp.1.24, y 2- tratamiento control (sin inoculación). Se realizó un único muestreo a los 120 días post-inoculación, en la etapa fenológica llenado de grano. El ADN extraído de los tejidos desinfectados (tallo y raíz en conjunto) fueron analizados por RFLP y pirosecuenciación del gen *nifH*.

### **6.2 Selección de cebadores para la reacción de PCR**

Para el examen de la diversidad de los fijadores de nitrógeno por la técnica de RFLP, Poly *et al.* 2014) [131] sugieren los siguientes criterios en la selección de los cebadores *nifH*; que su uso permita amplificar un rango amplio de la diversidad de especies fijadoras de nitrógeno manteniendo especificidad para el grupo y que el tamaño del fragmento de amplificación resulte aceptable para permitir la obtención de perfiles distintivos de la comunidad de fijadores de nitrógeno.

Dentro de este contexto, Gaby y Buckley (2012) evaluaron 51 pares de cebadores universales y 23 específicos de grupos para la amplificación del gen *nifH* [283]. Los autores evaluaron la capacidad de amplificación *in silico*, encontrando que solo 15 de los 51 pares de cebadores universales presentaban la potencialidad de amplificar más del 90% de las secuencias *nifH* anotadas en la base de datos pública. El resto solo amplificaba menos del 50% de las mismas. Luego evaluaron experimentalmente la capacidad de amplificación de los 15 cebadores universales usando como molde ADN de suelo y de una colección de cepas fijadores de nitrógeno, encontrando que solo 3 pares de cebadores amplificaban satisfactoriamente genes *nifH* [283].

Teniendo en cuenta lo observado por estos autores y la experiencia acumulada en nuestro laboratorio, seleccionamos los cebadores PolF/PolR, 19F/*nifH3* y *nifH11/nifH22* (Tabla 21) para ensayar su eficiencia de amplificación. Varios autores han reportado el uso de estos cebadores en la amplificación de los

endófitos fijadores de nitrógeno de muestras ambientales [122], [162], [168], [284], [285].

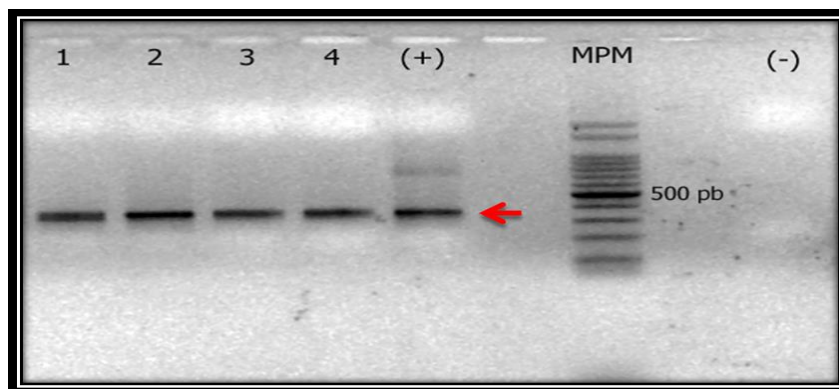
**Tabla 21.** Pares de cebadores evaluados para la amplificación del gen *nifH*

| Cebadores            | Posición <sup>a</sup> | Tamaño <sup>b</sup> | Referencia   |
|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| PolF/PolR            | 115-476               | <b>362</b>          | [122], [284] |
| 19F/nifH3            | 19-494                | <b>476</b>          | [286]        |
| <i>nifH11/nifH22</i> | 118-476               | <b>359</b>          | [286]        |

a. Posición del amplicón respecto al gen *nifH* de *A. vinelandii* (Genbank ACCN# M20568)

b. Tamaño del amplicón en pares de bases nucleotídicas esperado de acuerdo con el gen *nifH* de *Azotobacter vinelandii*.

Con los cebadores seleccionados, se realizó un análisis exploratorio utilizando como molde el ADN extraído de tejidos de plantas de trigo. La reacción de PCR, usando los cebadores PolF/PolR, resultó con baja eficiencia de amplificación. Seguidamente, a fin de aumentar la eficiencia de la reacción, se ensayaron variaciones de los parámetros que afectan la reacción PCR. Así se modificaron la temperatura de hibridación y la concentración de MgCl<sub>2</sub>. Dado que las modificaciones ensayadas no resultaron exitosas y considerando los estudios *in silico* de Gaby y Buckley (2012) donde muestran que este par de cebadores PolF/PolR cubre solo el 25% de la diversidad *nifH* [283], decidimos no utilizar los mismos. Posteriormente, se ensayó la PCR anidada con los cebadores 19F/nifH3 (1<sup>ra</sup> PCR) y *nifH11/nifH22* (2<sup>da</sup> PCR) de acuerdo a las condiciones descritas por Yeager *et al.* (2004) [166]. Con estos cebadores se obtuvo un producto único de amplificación con el tamaño esperado (359 pb) para el gen *nifH* (Figura 42) y con eficiencia suficiente (aproximadamente 50 ng/μl) para el estudio de la comunidad de endófitos fijadora de nitrógeno mediante la técnica de huella dactilar RFLP y pirosecuenciación.



**Figura 42. PCR anidada de *nifH*.** Amplificación por PCR anidada [166] del gen *nifH* a partir de ADN de trigo. Calles 1-Ferré no inoculado 2-(FC), 3-Ferré inoculado (FI\_co), 4-Junín no inoculado (JC), Junín inoculado (JI\_co), (+) y (-) indican los controles positivos (*Azotobacter vinelandii*) y negativo, respectivamente. En el margen derecho de la figura, la flecha indica el fragmento *nifH* de 359 pb. En el margen derecho se muestra la banda de 500pb del marcador de tamaño molecular (MPM) de 100pb (PB-L Productos Bio-Lógicos ®).

### 6.2.1 Perfiles de RFLP-*nifH* del pool de amplicones de endófitos fijadores de nitrógeno

En la detección de polimorfismos de ADN comúnmente se utilizan enzimas de restricción con sitios de reconocimiento de cuatro pares de bases debido a que esto incrementa la probabilidad de hallar dichos polimorfismos en una secuencia dada. La capacidad de discriminación y resolución de la técnica de RFLP aumenta con el uso de varias endonucleasas [107], [131], [287], [288]. Dentro de este grupo, las endonucleasas *MspI* y *HaeIII* han sido ampliamente utilizadas en el estudio de la diversidad del gen *nifH* en muestras ambientales [122], [130], [131], [286]. Asimismo, en nuestro laboratorio las endonucleasas *MspI* y *HaeIII* fueron utilizadas para examinar la diversidad de fijadores de suelo aplicando la técnica de T-RFLP, la cual permitió encontrar diferencias en la comunidad diazotrófica asociadas a prácticas agronómicas y profundidad del suelo [289]. Considerando estos antecedentes, en el presente análisis de RFLP-*nifH* utilizamos las endonucleasas *HaeIII* y *MspI*. Tomando como referencia los estudios mencionados anteriormente y las experiencias en nuestro laboratorio se tomó la decisión de utilizar la endonucleasas mencionadas anteriormente para la técnica de RFLP de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de trigo.

Con el propósito de evaluar la reproducibilidad del procedimiento usado para generar los RFLP se realizaron 3 repeticiones de cada muestra de ADN-*nifH* analizada y se realizaron las respectivas digestiones con las endonucleasas

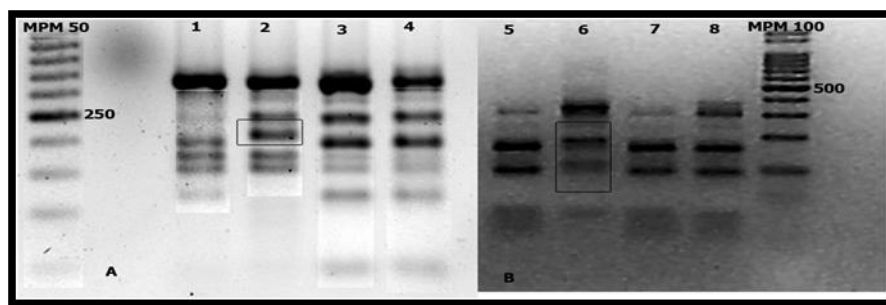


mencionadas. Los resultados fueron consistentes entre sí, esto confirma la reproducibilidad del procedimiento que adoptamos en nuestros estudios y le da robustez y confianza a las conclusiones obtenidas a partir de dichos datos.

### 6.3 Análisis de la comunidad endófitra de trigo mediante RFLP

Es esperable que la incubación con endonucleasas de ADN amplificado a partir de un molde complejo consistente en una mezcla de genomas presentes en una muestra ambiental genere un perfil complejo de fragmentos de restricción [122], [131], [162], [290]. El resultado obtenido a partir de las muestras de trigo indica que el ADN extraído de los tejidos desinfectados superficialmente, generó productos de amplificación *nifH* que presentaban varios sitios de reconocimiento para las enzimas ensayadas (Figura 43).

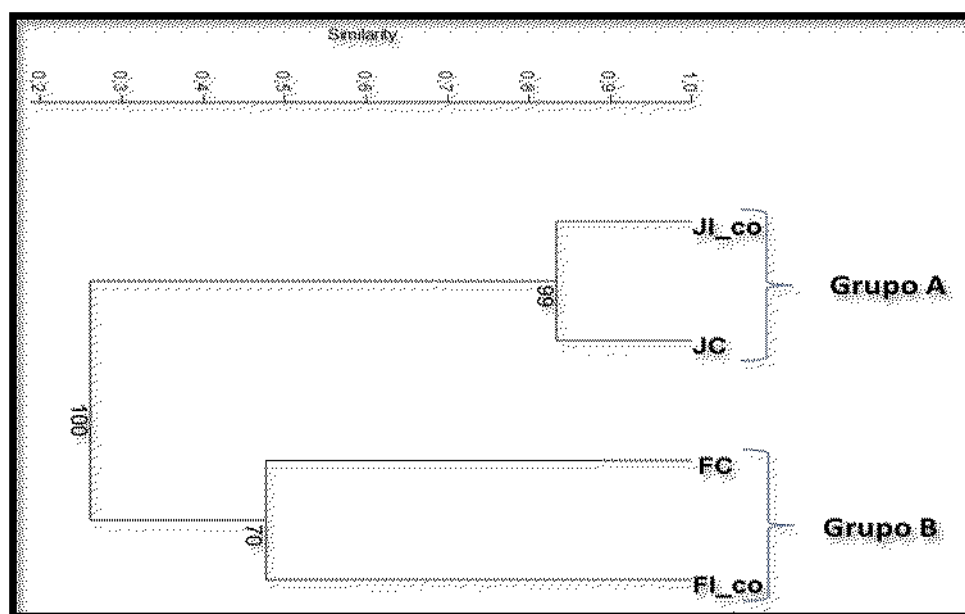
Los perfiles RFLP-*nifH* de trigo con las endonucleasas *MspI* y *HaeIII* están compuestos por fragmentos de tamaño variable entre los 50 pb y 359 pb (Figura 43). Las muestras de cada localidad presentan perfiles semejantes y comparables entre ellos. La localidad de Ferré sin inocular presenta el perfil más distintivo, con una banda diferencial de 100 pb en la digestión con *MspI* (Figura 43 A) y dos bandas de aproximadamente 150 y 200 pb, con *HaeIII* (Figura 43 B), mientras que las muestras de la localidad de Junín presentan bandas similares entre los tratamientos.



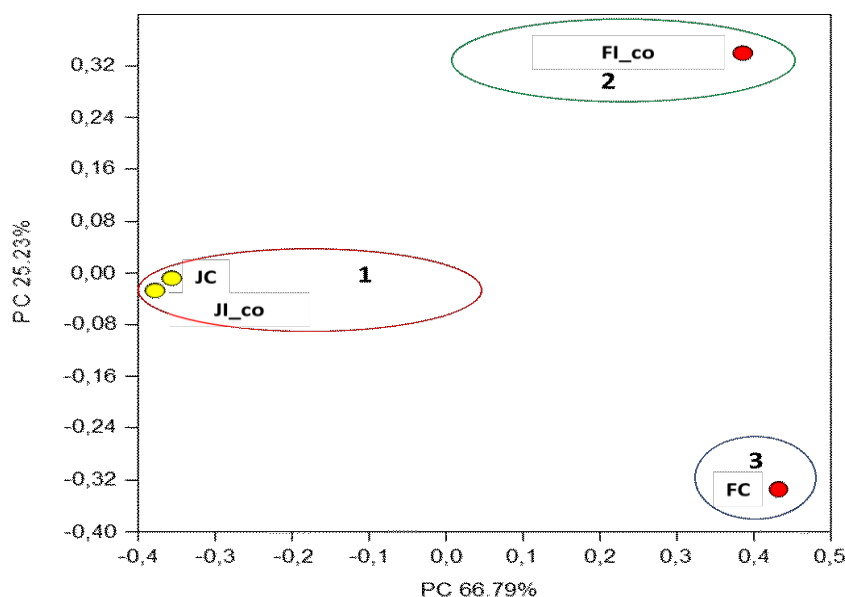
**Figura 43. Perfiles de digestión de amplicones *nifH* de endófitos de trigo.** Gel analítico de agarosa 1.5% mostrando las bandas obtenidas después de la incubación con las endonucleasas *MspI* (panel A) y *HaeIII* (panel B), respectivamente. Las calles 1-4 corresponden a los tratamientos FI\_co, FC, JC, JI\_co. En panel B las calles 5-8 corresponden a JC, FC, JI\_co, FI\_co. El rectángulo encierra a las bandas encontradas particularmente en la muestra FC.

Los resultados de los análisis de agrupamiento (UPGM) se presentan en la Figura 44. Se observa la formación de dos grupos, A y B que se corresponden con los respectivos lugares de muestreo, indicando que las comunidades endofíticas de trigo difieren entre los dos sitios de cultivo (Junín-Ferré). El

grado de similitud entre los dos tratamientos de Ferré es menor al 50%, mientras que entre las muestras de Junín es superior al 80% (Figura 44). Resultados similares se observaron aplicando un análisis de ordenación (PCoA) (Figura 45). En el patrón de distribución de los diferentes tratamientos se forman 3 grupos bien definidos; en el primero encontramos agrupados los tratamientos de Junín, mientras, que los tratamientos de Ferré se encuentran formando dos grupos separados entre sí. La cercanía en el plano de los tratamientos de Junín indica un alto grado de similitud entre sus comunidades por lo que se puede inferir que la inoculación con las cepas PGPR no alteró la estructura de la comunidad. Contrariamente, los tratamientos de la localidad de Ferré se encuentran distanciados en el plano indicando alta divergencia en sus comunidades, lo que indicaría una alteración de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno debido a la inoculación con las bacterias PGPR.



**Figura 44. Análisis de agrupamiento basado en el coeficiente de similitud Bray-Curtis utilizando la matriz de RFLP-*nifH*.** En el dendrograma UPGMA de los perfiles RFLP del gen *nifH* se realizó a partir de las matrices obtenidas de la digestión con las endonucleasas MspI y HaeIII de forma conjunta. La nomenclatura JC, JI\_co hace referencia a las plantas cultivadas control e inoculadas, respetivamente de la localidad de Junín y FC, FI\_co hace referencia las plantas cultivadas control e inoculadas, respetivamente de la localidad de Ferré.



**Figura 45. Análisis de coordenadas principales (PCoA) calculados a partir de la matriz obtenidas de las imágenes RFLP-*nifH* de endófitos de trigo y usando Bray Curtis.** Las matrices construidas con el conjunto de los productos de la digestión con las endonucleasas *HaeIII* y *MspI*. La nomenclatura JC, JI\_co hace referencia a las plantas cultivadas control e inoculadas, respetivamente de la localidad de Junín y FC, FI\_co hace referencia las plantas cultivadas control e inoculadas, respetivamente de la localidad de Ferré.

Podemos concluir que la composición de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de trigo es afectada principalmente por el sitio de cultivo, ya que las comunidades son diferentes en los dos sitios de cultivo analizados (Junín-Ferré). Asimismo, nuestros resultados indicarían que el efecto de la inoculación es dependiente del sitio, ya que se observa un mínimo efecto en Junín, mientras que, en la localidad de Ferré la inoculación afectó fuertemente la estructura de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno. Sin embargo, considerando que son ensayos a campo y por ende presentan variables ambientales no controladas, no podemos descartar que en la localidad de Ferré haya existido algún otro factor, no considerado en nuestro ensayo, que afecte a la comunidad endofítica.

Reiter *et al.*(2003) [162] utilizaron RFLP para estudiar las comunidades endófitas fijadoras de nitrógeno de batata, encontrando una gran diversidad de endófitos fijadores de nitrógeno en las diferentes variedades analizadas. Mientras que Neves *et al.*(2017) [275] demostraron que la comunidad endófito de pino fue afectada por el sitio geográfico donde se realizaron los muestreos. Los cambios composicionales de las comunidades asociadas a las plantas son atribuidas a las características de los suelos que determinan las comunidades

bacterianas presentes en ese ambiente y que luego migran a las raíces de las plantas para colonizarlas tanto de forma externa como interna.

A partir de los estudios mencionados y de nuestros datos de las comunidades endofíticas fijadoras de nitrógeno de trigo, el análisis de RFLP es útil para revelar la diversidad microbiana de la comunidad endofítica y detectar cambios en los perfiles de las comunidades promovidos por variables tales como la inoculación de bacterias PGPR y el sitio de cultivo.

#### **6.4 Pirosecuenciación del gen *nifH* de la comunidad de endófitos de trigo**

La pirosecuenciación de los amplicones *nifH* amplificados a partir del ADN extraído de las cuatro muestras de trigo (sitios Ferré y Junín, tratamientos co-inoculados y control) resultó en un total de 91860 lecturas. Estas secuencias, fueron procesadas siguiendo el protocolo informático descrito en Capítulo II y previamente aplicado en nuestro laboratorio [120], [121], [289].

Luego de la eliminación de secuencias de baja calidad, quimeras, secuencias cortas y corrimientos de marcos de lectura, se obtuvo una base primaria curada que consistió de 25099 lecturas totales y 6669 secuencias aminoacídicas únicas. Estas secuencias fueron agrupadas en 1911 unidades operacionales (OTUs) adoptando el umbral de 98% de similitud a nivel aminoacídico. Aunque el valor umbral del 98% similitud para establecer OTUs es relativamente alto comparado al valor utilizado en otros estudios, fue considerado aceptable en nuestros estudios ya que las secuencias de los genes codificadores de proteínas presentan un alto grado de similitud a nivel de especie [291]. Además, fue conveniente mantener consistencia con estudios previos en nuestro laboratorio en el análisis de las comunidades en suelos de la Provincia de Buenos Aires [120], [121].

El número de secuencias por tratamiento fue normalizado utilizando el comando `sub.sample` de Mothur. Se eliminaron los OTUs representados por una secuencia, los clasificados dentro del cluster 4, correspondientes a secuencias *nifH* parálogas, y aquellos que no fue posible clasificar con el programa ARB. El análisis de las secuencias *nifH* de trigo resultó en un total de 534 OTUs y 1802 secuencias por tratamiento.

### 6.4.1 Abundancia y distribución de los OTUs

La abundancia de los OTUs de la base de datos presentó una significativa variación entre ellos, pocos OTUs presentaron alta abundancia, sólo el 0.5% de ellos ( $n=10$ ) superó el número de 200 secuencias por OTU, mientras que el 39% presentaron solo una secuencia (Figura 46). Este tipo de perfil de distribución de abundancias relativas, en el cual se evidencia la predominancia de grupos “raros” fue reportado en diferentes estudios de muestras ambientales analizadas por pirosecuenciación [120], [121], [274], [292]–[294] y pone de manifiesto la capacidad de esta técnica para revelar las especies menos abundantes, que en nuestro análisis conforman más del 90% de la población. Asimismo, se debe tener en cuenta que la tecnología de pirosecuenciación presenta sus errores con tasas de hasta el 3% [295]. Teniendo en cuenta estas limitaciones y siguiendo criterios de estudios previos de otros autores y de nuestro laboratorio, decidimos excluir del análisis aquellos OTUs cuya representatividad sea menor a dos secuencias considerando que podrían corresponder a posibles errores de la tecnología utilizada [46], [120], [274], [296], [297].

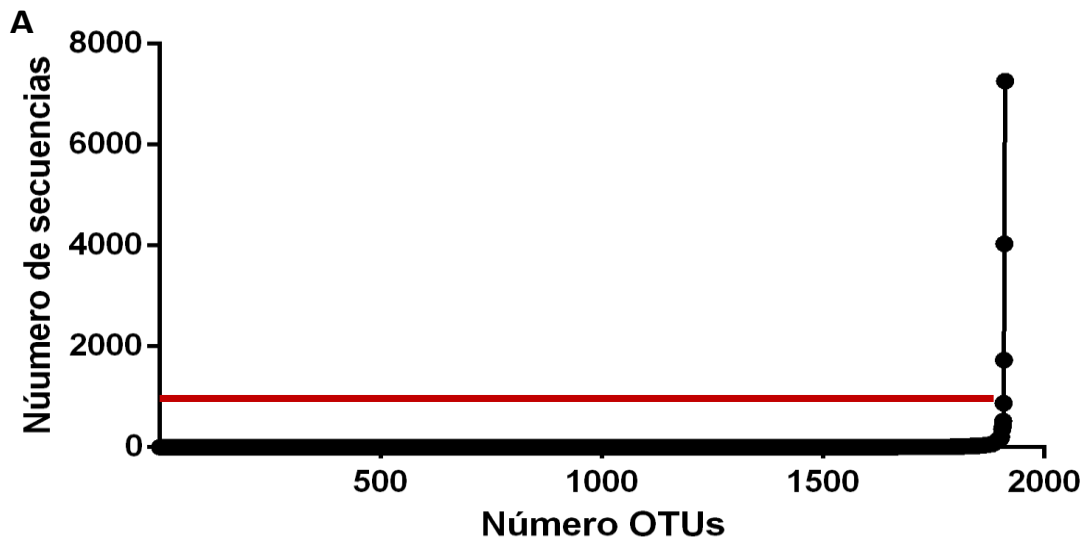


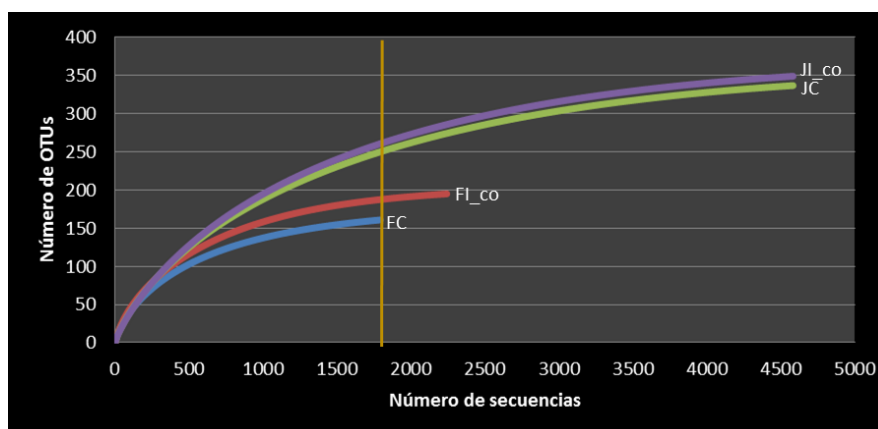
Figura 46. Abundancia de secuencias para los 1911 OTUs en trigo. La abundancia se cuantificó como el número de secuencias por OTU. La línea horizontal separa a los OTUs que presentaron más de 200 secuencias.

### 6.4.2 Estimación de la diversidad y de la riqueza de la comunidad fijadora de nitrógeno

Con el fin de evaluar de la diversidad y la riqueza de las secuencias *nifH* se utilizaron los estimadores de riqueza  $S_{Chao1}$  y de diversidad Shannon-Wiener

(H'). Los índices de riqueza proporcionan información cuantitativa del número de especies presentes en la comunidad, mientras que los índices de diversidad indican la abundancia de especies y su distribución en la comunidad [298]. Las curvas de rarefacción son otro estimativo de la riqueza que permite comparar muestras con diferente número de secuencias y visualizar el grado de cobertura alcanzado en la secuenciación [140].

En la Figura 47 se presentan las curvas de rarefacción de los OTUs originados en relación al número de secuencias de cada tratamiento. Se observa que si bien las muestras no alcanzan su valor máximo y constante en el número de OTUs, todas las curvas exhiben una tendencia asintótica. Por otra parte, el estimado de riqueza no paramétrico  $RC_{Chao-1}$  (Tabla 22), muestra que todos los tratamientos alcanzan valores mayores al 90 %, lo que estaría indicando que se alcanzó a secuenciar una proporción importante de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de trigo. Considerando un valor de corte de 1802 secuencias, correspondiente a la muestra con menor número de secuencias (FC), podemos observar que los tratamientos de Junín, inoculado y control, presentan el mayor número de OTUs en comparación con las muestras de Ferré.



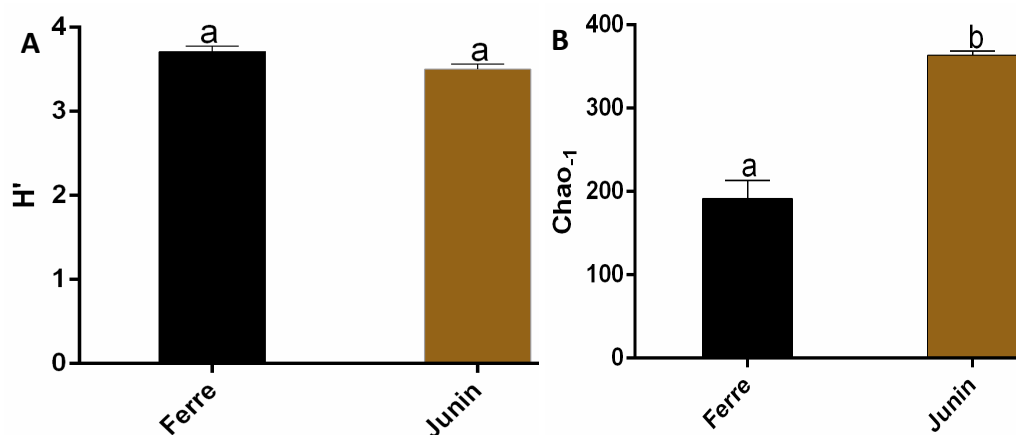
**Figura 47. Estimación de la riqueza de OTUs de endófitos diazotófos de trigo por medio de curvas de rarefacción.** La línea vertical indica el punto en la curva correspondiente al menor número de secuencias (1802) de la muestra FC. Las curvas de rarefacción se construyeron utilizando el método de re-muestreo sin reemplazo, mediante la ejecución del comando rarefacción. single en el entorno Mothur.

**Tabla 22. El estimador de riqueza (Chao-1) y diversidad Shannon-Wiener (H').** Se calcularon a partir de la biblioteca *nifH* de endófitos de trigo con OTUs definidos al 98% de similitud a nivel de aminoácidos.

|                      | Localidad de Ferré |       | Localidad Junín |       |
|----------------------|--------------------|-------|-----------------|-------|
|                      | FC                 | FI_co | JC              | Jl_co |
| SeqN                 | 1802               | 2253  | 4690            | 4593  |
| SeqNn                | 1802               | 1802  | 1802            | 1802  |
| Sob                  | 161                | 195   | 338             | 350   |
| H'                   | 3.668              | 3.757 | 3.459           | 3.534 |
| Chao-1               | 176                | 206.8 | 367             | 360.1 |
| RC <sub>Chao-1</sub> | 91                 | 94    | 92              | 97    |

**SeqN**, número de secuencias por muestra, **SeqNn**, número de secuencias normalizado por muestra, **Sobs**, número de OTUs detectados a un nivel de distancia filogenética del 2%, **RC**, cobertura relativa calculada como el número de OTUs dividido por la riqueza estimada (SChao1).

De manera similar, el análisis de varianza simple (One way ANOVA) muestra el efecto del sitio sobre la riqueza endofítica (Figura 48-B). Las secuencias de Ferré presentaron valores de Chao-1 significativamente mayores ( $r^2= 0.98$ ;  $p=0,0083$ ) comparados con los de Junín. Por el contrario la diversidad (H') no varía significativamente entre sitios ( $r^2=0,86$ ;  $p= 0,7$ ) (Figura 48-A). Por otra parte, cuando se consideró la variable inoculación analizando los dos sitios como réplicas, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros (H':  $r^2=0,72$   $p= 0,1$ ; Chao-1:  $r^2=0,19$   $p= 0,6$ ). Comparando los tratamientos dentro de cada sitio, observamos que los valores de diversidad y riqueza son similares dentro de cada sitio, excepto en la localidad de Ferré, donde los valores de riqueza (Chao-1) son ligeramente más altos en el tratamiento inoculado comparado con el control (Tabla 22). Sin embargo no es posible analizar estadísticamente este efecto debido a la ausencia de réplica.



**Figura 48. Efecto de los sitios de muestreo sobre la diversidad (H') panel A y Riqueza (Chao1) panel B en comunidad endófitas fijadoras de nitrógeno de trigo. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).**

Concluyendo, la diversidad de la comunidad diazotrófica endofítica de trigo no parece ser afectada por el sitio o la inoculación, mientras que la riqueza de la misma es afectada por el sitio. En investigaciones previas se ha encontrado que la inoculación no parece afectar la diversidad o riqueza de la comunidad toda, sino específicamente la abundancia de algunos grupos. En este sentido Zhihua *et al.* (2017) [276] encontraron que la inoculación con *Azospirillum* sp. B510 no modifica la diversidad endofítica de plantas de arroz, pero estimula una mayor abundancia de algunos filotipos bacterianos. Asimismo, García *et al.* (2010) [299] reportan que la inoculación con *Azospirillum* brasiliense modifica la composición pero no la diversidad de la comunidad rizosférica de trigo.

Neves *et al.* (2017) evaluaron los efectos del sitio de cultivo en la composición microbiana de endófitos de pino, indicando que riqueza y diversidad están principalmente asociadas a la localización geográfica del cultivo, este efecto es atribuido a las condiciones ambientales de cada lugar y al tipo de suelo que condicionan las comunidades bacterianas, las cuales posteriormente colonizan los tejidos internos de las raíces las plantas [275]. Podemos inferir por nuestros resultados que la riqueza de la comunidad endófitas fijadoras de N<sub>2</sub> de trigo se encuentra afectada por las diferentes condiciones microambientales y características edáficas del sitio del cultivo.

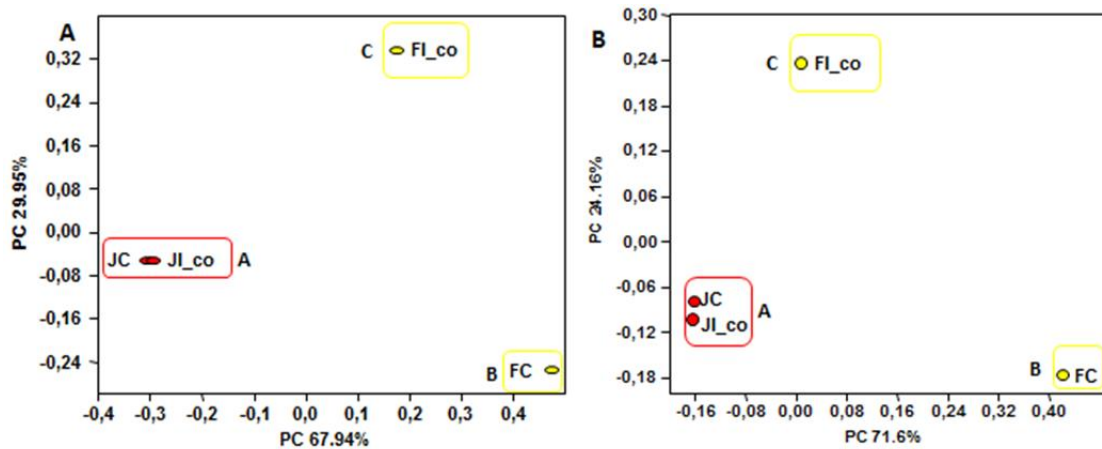
#### **6.4.3 Patrón de diversidad beta de la comunidad endófitas fijadoras de nitrógeno de trigo**

Para comparar la estructura de las comunidades endófitas fijadoras de nitrógeno de los distintos tratamientos y localidades ( $\beta$  diversidad), aplicamos



dos criterios, uno de ellos consistió en la aplicación de la medida de similitud Bray-Curtis usando la matriz de abundancias relativas de los OTUs *nifH*, en el otro análisis se aplicó la medida de distancia *weighted* UniFrac entre pares de muestras, la cual utiliza las distancias filogenéticas entre los OTUs y sus abundancias relativas [300], [301].

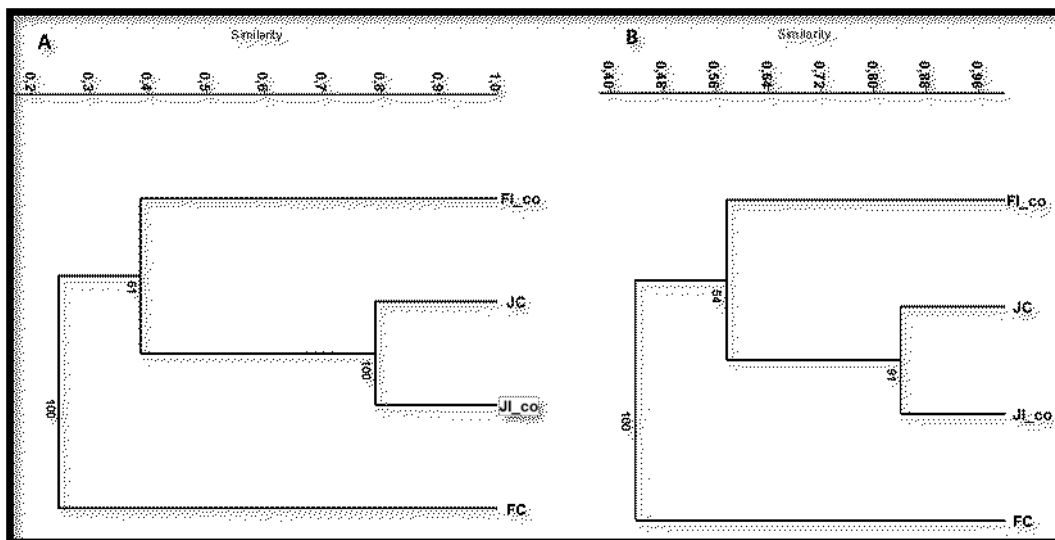
Como se observa en los PCoA resultantes, los dos análisis de similitud composicional mostraron el mismo ordenamiento de los tratamientos (Figura 49 A y B). Por otra parte, en ambos criterios se explica una alta variabilidad de los datos en el componente principal (PC1) con valores del 67.94 % y 71.6 % para el análisis Bray-Curtis y *weighted* UniFrac, respectivamente.



**Figura 49. Análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de la abundancia de los OTUs usando Bray Curtis (A), y la abundancia de los OTUs y sus relaciones filogenéticas usando *weighted* UniFrac (B).** Los círculos coloreados en rojo pertenecen a la localidad de Junín y en amarillo para la localidad de Ferré. La nomenclatura JC, JI\_co hace referencia a las plantas cultivadas control e inoculadas, respetivamente de la localidad de Junín y FC, FI\_co hace referencia las plantas cultivadas control e inoculadas, respetivamente de la localidad de Ferré.

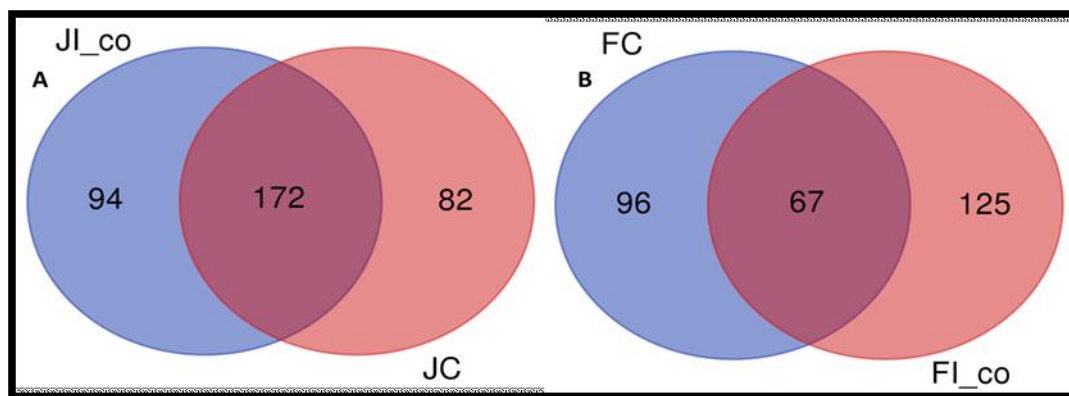
Las divergencias en el plano conformaron tres grupos referenciados como **A**, **B** y **C**. Los dos tratamientos de Junín aparecen agrupados (grupo **A**) y separados de los tratamientos de Ferré, indicando que las comunidades endofíticas fijadoras de  $N_2$  de las plantas de trigo de Junín son altamente similares entre sí, y distintas de las comunidades presentes en Ferré. Analizando las matrices de distancia en un análisis de agrupamiento UPGMA, se pudo observar la similitud entre los tratamientos de Junín es mayor al 80% (Figura 50). Este ordenamiento permite deducir que la comunidad endofítica es afectada por el sitio del cultivo, y la inoculación no altera la composición de la comunidad endofítica en Junín. Por el contrario, los tratamientos de la localidad de Ferré

se separan del grupo de Junín y entre sí, formando los dos grupos restantes (grupos B y C). Por lo que se puede inferir un cambio en la estructura de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en la localidad de Ferré como consecuencia de la inoculación.



**Figura 50. Análisis de agrupamiento entre las comunidades endófito fijadoras de nitrógeno de trigo.** El grado de similitud de las comunidades de los distintos tratamientos y localidad se visualizan en los dendrograma resultante del análisis de agrupamiento UPGMA realizado con el programa Mothur para *weighted* UniFrac y Bray-Curtis en Past. En el panel **A** muestra el dendrograma utilizando Bray-Curtis y en el panel **B** se muestra el dendrograma utilizando *weighted* UniFrac.

Los resultados del análisis de Venn soportan la evidencia del efecto de la inoculación en las comunidades. Así, los tratamientos de la localidad de Junín comparten 172 OTUs (Figura 51-A) mientras, que los tratamientos de la localidad de Ferré solo comparten 67 OTUs (Figura 51-B).



**Figura 51. Diagrama de Venn que grafica el número de los OTUs compartidos entre los tratamientos de Ferré (A) y Junín (B).**

Lundberg *et al.* (2012[272]) analizaron el microbioma de raíces de *Arabidopsis thaliana* en plantas cultivadas en dos suelos de características físico-químicas diferentes, encontrando que la composición de la comunidad endofítica fue principalmente afectada por el tipo de suelo. Esto abre el interrogante sobre cómo el suelo y sus características físicas y químicas se encuentran influenciando la composición de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de trigo. Los suelos de Junín con una textura limoso-gruesa (serie Junín) se encuentran excesivamente drenados en comparación con los de Ferré, los cuales presentan una textura franco-limoso-fina (serie rojas) [159]. Por otra parte, en sus propiedades químicas estos suelos son similares en valores de pH, NO<sub>3</sub>, N-Org, N-Total y carbono orgánico pero difieren en los niveles de P, observándose valores significativamente más altos en Ferré (21,8 ppm) en comparación con los de Junín (2 ppm). (Tabla S14).

Concluyendo, el sitio de cultivo es el principal factor que se encuentra afectando la composición de la comunidad endofítica de trigo tanto en las abundancias relativas como en sus componentes filogenéticos. En las plantas de Ferré también se observa un efecto por la inoculación, específicamente la desaparición de algunos componentes (OTUs) presentes en las plantas no inoculadas. Por el contrario, en Junín no se observan diferencias composicionales por la inoculación. Es interesante observar que este resultado es coincidente con los obtenidos con análisis RFLP.

De acuerdo con Mallon *et al.* (2015) [261] la introducción de microorganismos en un ambiente se considera exitosa cuando causa un impacto suficiente para generar cambios en la estructura de la comunidad original. La resistencia de un sistema a la invasión es el resultado de la diversidad microbiana presente. Nuestro resultado demostraría que la introducción fue exitosa en Ferré, mientras que por el contrario, en Junín la ausencia de alteración podría deberse a que no hubo establecimiento de las cepas inoculadas o alternativamente que la estructura de la comunidad endofítica presente fue más estable y resistente al efecto de la inoculación.

#### **6.4.4 Asignación taxonómica a las secuencias *nifH* de endófitos de trigo**

En esta sección se presenta la asignación taxonómica de las secuencias *nifH* que fueron determinadas anteriormente. Para esto se adoptó la clasificación de

secuencias *nifH* propuesta por Zehr *et al.* (2014) [177] consistente en un agrupamiento en *clusters* (grupos) y *subclusters* (sub-grupos). Brevemente, el *cluster I* comprende las secuencias *nifH* de las nitrogenasas convencionales (Fe-Mo), principalmente de miembros de los fila Proteobacteria, Cianobacteria, ciertos Firmicutes (*Paenibacillus*) y Actinobacteria (*Frankia*). En el *cluster II* se agrupan las secuencias de nitrogenasas alternativas (Fe-Fe y Fe-V) y las pertenecientes a las arqueas metanogénicas, mientras que en el *cluster III* se encuentran secuencias *nifH* de bacterias anaeróbicas estrictas, incluyendo Clostridia y reductoras de sulfato. Las secuencias pertenecientes al *cluster IV* no se consideran en el análisis debido a que comprende las secuencias parálogas de *nifH*.

En la Tabla 23 se resume la distribución de los filotipos aplicando este criterio de clasificación a nuestra base de datos. Encontramos como predominantes secuencias de los *subclusters* 1J/1K (47.65%) principalmente relacionadas con el orden Rhizobiales, 1E (19.08%) relacionadas con *Paenibacillus*, 3 relacionadas con los órdenes Clostridiales y Desulfovibrionales (17.64%) y 1B (10.94%) relacionadas con cianobacterias. Los *subclusters* 1A (*Geobacter* y *Anaeromyxobacter*), 1G (Pseudomonadales y Enterobacteriales) y 1P (Rhodocyclales) comprendieron menos del 4% de las secuencias. No se detectaron secuencias relacionadas con *nifH* de nitrogenasas alternativas o de arqueas metanogénicas (Cluster II).

#### **6.4.4.1 Distribución de los subclusters *nifH* en las comunidades de los tratamientos la comunidad de endófitos**

La distribución de los *subclusters* en relación con los tratamientos y sitios de muestreo se muestran en la Figura 52. Se encontró que los *subclusters* 1J/1K (Rhizobiales y Rhodospirillales) y 1E (*Paenibacillus*) son mayoritarios en todas las muestras, excepto en el tratamiento control de Ferré. El orden Rhizobiales se encuentra reportado en varios trabajos como uno de los grupos más abundantes de la comunidad endofítica en general, y en particular de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno (*nifH*) [122], [123], [123], [209], [270], [272], [275].

Algunos *subclusters* presentaron distribución diferencial por sitio/tratamiento. Las secuencias del *subcluster* 3 (Clostridiales y Desulfovibrionales) se

encontraron principalmente en los suelos de Ferré, siendo el grupo mayoritario en el tratamiento control (58.15%) y presentando menor valor (11,67%) en el tratamiento inoculado. En contraste, los *subclusters* 1G (Pseudomonadales y Enterobacteriales) y 1P (no cultivadas relacionadas con Rhodocyclales) se encuentran en mayor proporción (11, 68%) y exclusivamente en el tratamiento inoculado de Ferré (0,3%), respectivamente.

Por otra parte, el *subcluster* 1B (Cianobacteria) si bien estuvo presente en todos los tratamientos, se encuentra mayormente representado en los tratamientos de la localidad de Junín (JC 20,7% y JI\_co 19,2%). De manera similar, las secuencias del subcluster 1A, muy abundantes en el suelo y mayormente relacionadas con *Geobacter* y *Anaeromyxobacter*, se encontraron en mayor proporción en las plantas crecidas en Junín (JC 3,1% y JI\_co 2,5%).

Resumiendo, la inoculación con bacterias PGPR está modificando la abundancia de las secuencias *nifH* de los *subclusters* 1G y 3B en la localidad de Ferré, y los grupos propios de este sitio son los *subclusters* 1G, 1P y 3, entretanto la distribución de los *subclusters* entre los tratamientos de Junín no difieren entre sí, este sitio se caracteriza por mayor presencia de los *subclusters* 1B y 1E que la localidad Ferré. El *subclusters* 1J/1K tiene una representación significativa en todos los tratamientos y localidades.

Estos resultados indican la existencia de una diversidad apreciable de bacterias fijadoras de nitrógeno, con una clara predominancia de ciertos grupos en el caso de los dos sitios de cultivo.

**Tabla 23.** Asignación filogenética de las secuencias *nifH* encontradas en trigo

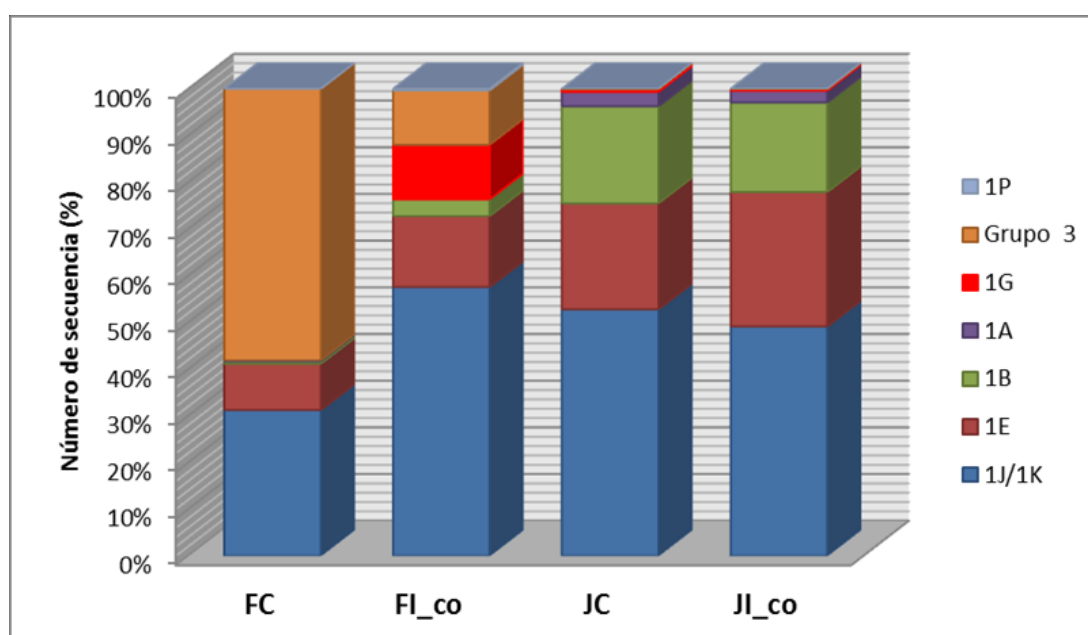
| Cluster/<br>Subcluster | Nº sec.<br>(%) | Nº OTUs<br>(%) | Filo              | Orden-género*  |
|------------------------|----------------|----------------|-------------------|--|
| I<br>1A                | 1,4            | 3,18           | Delta-            | <i>Pelobacter, Geobacter y Anaeromyxobacter</i>  |
| 1B                     | 10,94          | 21,34          | Cyanobacteria     | Nostocales ( <i>Nostoc, Anabaena, Cylandrospermopsis</i> )   |
| 1E                     | 19,08          | 19,11          | Firmicutes        | Paenibacillus  |
| I<br>1G                | 3,15           | 4,3            | Gamma-            | <i>Pseudomonas, Brenneria</i> (Enterobacteriales), <i>Thiocystis</i> (Chromatiales)                        |
| 1J/1K                  | 47,65          | 38,2           | Alfa-             | Rhizobiales ( <i>Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium</i> ) y Rhodospirillales ( <i>Azospirillum</i> ) |
| 1P                     | 0,08           | 0,18           | Beta-             | Rhodocyclales  |
| III<br>3               | 17,64          | 13,67          | Firmicutes, Delta | <i>Acetivibrio, Clostridium, Desulfovibrio y Desulfobacterium</i>  |

\* Orden o género de las secuencias más cercana a las secuencias predominantes del *subclusters*

Se ha propuesto que el suelo, sus propiedades físico-químicas y microbiológicas, así como el estado fenológico y nutricional de la planta influyen sobre la estructura de la comunidad endófito [273], [275], [303]. Lundberg *et al.* (2012)[272] analizan la distribución de los grupos taxonómicos de la comunidad endofítica en plantas de *Arabidopsis thaliana* encontrando que la misma está fuertemente influenciada por el tipo de suelo y por la capacidad de la planta para reclutar bacterias en la zona rizosférica, las que luego ingresan a los tejidos internos. Además, demuestran que varios grupos

taxonómicos se encuentran comúnmente tanto en suelo como formando parte de la comunidad endófito (*Bradyrhizobiaceae*, *Rhodospirillaceae* y *Burkholderiaceae*).

A partir de nuestros resultados y lo reportado en la literatura, se puede concluir que la comunidad endófito fijadora de nitrógeno es afectada por diferentes cambios en el ambiente circundante a la raíz de las plantas trigo (tipo de suelo e inoculación de bacterias PGPR) y estos factores modularían la presencia y abundancia de las poblaciones diazotróficas en los diferentes sitios de cultivo del trigo.



**Figura 52.** Distribución de filotipos nifH en la comunidad de los diferentes tratamientos.

#### **6.4.4.2 Clasificación taxonómica de los OTUs más abundantes en trigo**

Considerando que los 17 OTUs más abundantes (con más de 100 secuencias) representan una proporción importante (60.8%) de la base de datos, se realizó la asignación filogenética (Figura 53.A) y su distribución en los diferentes tratamientos (Figura 53.B). Las relaciones filogenéticas de los OTUs se analizaron utilizando la base de datos de referencia de secuencias *nifH* de Zehr *et al.*(2014) [177]. A continuación, se describen los OTUs más abundantes en cada uno de los *subclusters nifH* observados en trigo.

### **Subclusters 1J/1K**

Los OTUs 0, 2, 11 y 15, clasificados dentro del *subclusters 1J/1K* se encontraron relacionados con secuencias del orden Rhizobiales, particularmente con las especies *Rhizobium etli* (OTUs 0 y 2, 99% de similitud) y *Bradyrhizobium sp.* (OTUs 11 y 15, 99% de similitud). Los cuatro OTUs se encontraron presentes en todos los tratamientos, siendo los OTUs relacionados con *Rhizobium etli* los más abundantes en la comunidad endófito de trigo. Los OTUs relacionados con *Bradyrhizobium sp.* fueron más abundantes en los suelos de Ferré (Figura 53 panel B).

Los rizobios son bacterias capaces de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con plantas leguminosas [270]. Nuestros resultados indicarían que el orden Rhizobiales no solo está asociado a las plantas en dicha simbiosis sino que parece ser un componente importante de la comunidad endofítica. Existe extensa referencia a la presencia de rizobios como endófitos de especies de interés agronómico. Se ha observado que especies de los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* parecen ser componentes importantes de la comunidad endófito diazotrófica en plantas de arroz, caña de azúcar, trigo y batata [130], [209], [270], [273].

### **Subcluster 3**

6 OTUs abundantes fueron clasificados dentro del *subcluster 3*. Dos de ellos (OTUs 18 y 19) se encontraron relacionados con el orden Clostridiales, presentando mayor similitud (89%) con la secuencia *nifH* de *Cellulosilyticum sp.* mientras que los cuatro restantes (OTUs 4, 5, 17 y 6) se encontraron relacionados con secuencias del orden Desulfovibrionales, presentando la mayor similitud (90%) con la secuencia *nifH* de la especie *Desulfobacterium autotrophicum*. Las secuencias clasificadas dentro de este *subcluster* fueron detectadas exclusivamente en las muestras de la localidad de Ferré. Por otra parte, los OTUs relacionados con el orden Clostridiales (18 y 19) solo se detectaron en el tratamiento inoculado, e inversamente los OTUs tipo Desulfovibrionales fueron propios del tratamiento control, siendo el grupo mayoritario en este tratamiento. El análisis de componente principal utilizando la matriz de abundancia de los *subclusters* (Figura S3) mostró que la presencia



de este *subcluster* es determinante para la separación de los tratamientos FC y FI\_co en la gráfica.

Estos resultados indican que los filotipos *nifH* tipo Clostridiales y Desulfovibrionales están siendo afectados por el sitio del cultivo, y que en determinadas condiciones (como las dadas en Ferré) son componentes predominantes de la comunidad endofítica vegetal de trigo. Estas son poblaciones heterótrofas, dependientes de altas concentraciones de nutrientes, los suelos de Ferré presentan valores superiores de P (21,8 ppm) en relación a Junín (2 ppm). Por otra parte, como fuera descrito en secciones anteriores, los suelos de Junín están excesivamente drenados, lo que no promovería las condiciones necesarias para estimular grupos aneróbicos. Los suelos de Ferré, si bien no están mal drenados, presentan una textura franco-limoso-fina que podría promover procesos reductivos localizados. Asimismo, estos filotipos están siendo afectados por la práctica de la inoculación, la cual parece estar ejerciendo un efecto de reemplazo de poblaciones, Desulfovibrionales por Clostridiales, que viven en condiciones similares (mismo nicho), dado que las especies de ambos órdenes son en su mayoría anaeróbios estrictos.

El *subcluster* 3 contiene diversos linajes *nifH* en su mayoría anaeróbios obligados, incluyendo géneros como, *Clostridium*, *Treponema*, *Desulfovibrio*, *Chlorobium*, y arqueas metanogénicas como *Methanosarcina barkeri* [173]. Los mismos fueron encontrados formando parte de la comunidad diazotrófica potencial en diferentes ambientes [122], [304], [305]. Se ha observado que secuencias *nifH* relacionadas con la especie *Desulfovibrio gigas* son predominantes en raíces de arroz [170]. Asimismo, Ferrando *et al.* (2015) [122] reportaron que filotipos *nifH* relacionados con los órdenes Clostridiales y Desulfovibrionales son significativamente más abundantes en plantas de arroz bajo condiciones de inundación.

### **Subcluster 1B**

Los OTUs abundantes 7, 3 y 10 fueron clasificados dentro del subcluster 1B y se encontraron relacionados con el orden Nostocales, presentando mayor similitud (99%) con la secuencia *nifH* de *Nostoc sp* T09, bacteria endófito de raíces coraloides [306]. Los OTUs 1B se encontraron exclusivamente en

plantas de Junín y se presentan distribuidos equitativamente y en altas proporciones en ambos tratamientos, control (20,7%) e inoculado (19,1%).

Las cianobacterias son bacterias fotosintetizadoras oxigénicas, aeróbicas, pueden fijar N<sub>2</sub> en vida libre en diferentes ambientes como suelos áridos, ambientes acuáticos y agua de deshielo [173], [307], [308], o asociadas con plantas y microorganismos [309]. Son componentes endófitos de varias especies de interés agronómico como arroz, papa, chontaduro, trigo, tomate, maíz y en cultivos forestales con pino [275] [81], [122], [269], [310]–[313]. En nuestro laboratorio Calderoli *et al.* (2016) [289] reportan al orden Nostocales como uno de los grupos diazotróficos abundantes, asociados principalmente al estrato superficial de suelos agrícolas de la región pampeana argentina. Spencer y Linnquist (2014)[314] reportaron en ensayos a campo con arroz que la aplicación de P de forma superficial incrementaban de 4 a 8 veces la presencia de cianobacterias. Resultados similares fueron reportados en aguas contaminadas con productos industriales que contenían altas concentraciones de P [315], [316]. La abundancia de cianobacterias también se encontró relacionada con los valores de pH del suelo [317]. Nuestros resultados no son coincidentes con estas relaciones, los suelos analizados presentan valores de pH similares y las cianobacterias se encontraron presentes en el suelo con menor cantidad de P (Junín 2 ppm; Ferré 21,8 ppm). Sin embargo varios de los reportes acerca de la abundancia de cianobacterias y su relación con factores condicionantes en el suelo se relacionan con cianobacterias en vida libre, en nuestro ensayo las mismas están en su estado endófito, por ende podría existir algún factor microambiental dentro de las plantas de Junín que esté promoviendo la presencia del grupo.

Concluyendo, nuestros resultados indican que una población relacionada con *Nostoc* puede ser un componente importante de la comunidad diazotrófica endofítica de trigo y que su presencia está condicionada por el sitio de cultivo de las plantas.

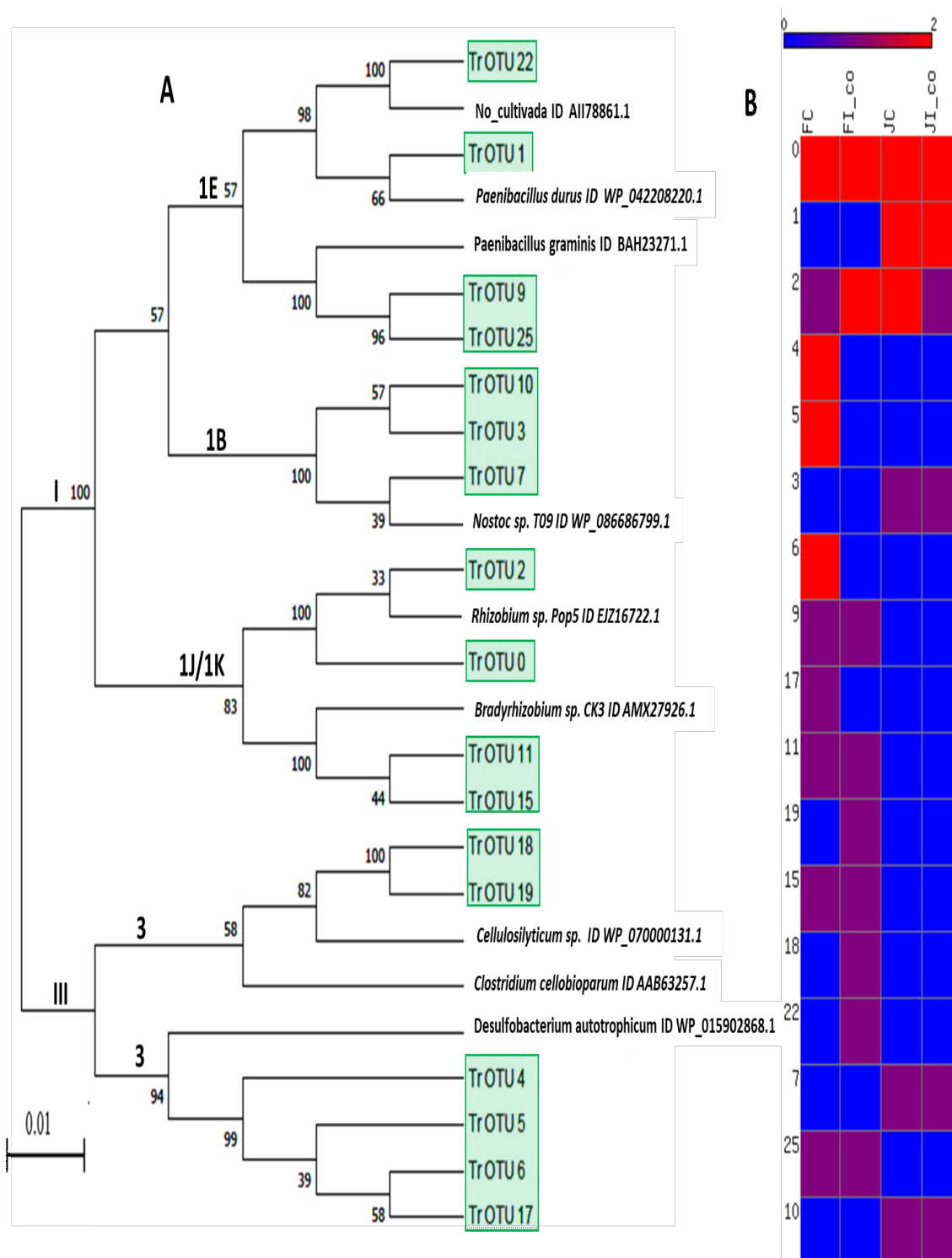
### **Subcluster 1E**

Los OTUs 1, 22, 9 y 25 fueron clasificados dentro del subcluster 1E y relacionados con secuencias *nifH* del género *Paenibacillus* mostrando los mayores valores de similitud con *Paenibacillus durus* (OTU 1, 95%),

*Paenibacillus graminis* (OTUs 9 y 25, 99%) y con una secuencia no cultivada endófito de plantas de arroz sometidas a inundación [122] (97%) (OTU 22). El OTU 1 es el filotipo más abundante del *subcluster* y se encontró principalmente en Junín, el resto de los OTUS fueron observados principalmente en la localidad de Ferré. En relación a los tratamientos, excepto uno (OTU 22) los filotipos 1E no presentaron diferencias de abundancia por tratamiento. Estos resultados indican que la abundancia de los filotipos 1E depende del sitio de cultivo de las plantas y no es afectada por la inoculación con las bacterias PGPRs ensayadas.

El género *Paenibacillus* comprende más de 89 especies, son bacterias anaerobias facultativas formadoras de endospora, Gram positivas, que se encuentran en distintos ambientes [76], [318]–[320]. Se podría definir al género *Paenibacillus* como un grupo ubicuo entre la comunidad endófito de diferentes especies vegetales, encontrándose en semillas de trigo [273], arroz [122], [321] y plantas micropropagadas de álamos, alerce y abeto [322], así como formando parte de la comunidad fijadora de N en arroz, batata y maíz [122], [270], [323]

Podemos concluir, que similar a lo observado en otras especies vegetales, el género *Paenibacillus* es un componente importante de la comunidad endófito potencialmente fijadora de N en trigo, y que su abundancia es principalmente afectada por el sitio de cultivo.



**Figura 53. Relación filogenética de los OTUs abundantes presentes en la comunidad endófito de trigo (panel A) y distribución en los diferentes tratamientos (Panel B).** Se presentan los OTUs abundantes (cajas verdes) y las secuencias más cercanas de la base de datos nifH. En el Panel B se presenta en gráfico tipo *heatmap* la distribución relativa de cada OTU en los diferentes tratamientos. La paleta de colores vira de azul, indicando los valores más bajos, a rojo, indicando los valores mayores. El árbol de filogenia se construyó en el programa MEGA con secuencias aminoacídicas parciales de *nifH* usando el método *Neighbour-Joining* y un bootstrap de 1000 réplicas.

## 6.5 Conclusiones

Nos propusimos caracterizar la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de plantas de trigo. La hipótesis de trabajo consistió en asumir que las bacterias fijadoras de nitrógeno son un conjunto diverso y que esa diversidad podría ser afectada por la inoculación con cepas PGPR o por el sitio de cultivo. La extracción de ADN de los tejidos fue satisfactoria en cuanto a la calidad y cantidad lo que nos permitió obtener un pool de moléculas de ADN representativa de la comunidad la cual se utilizó para amplificar por PCR el gen *nifH* para su posterior análisis.

El análisis de RFLP sobre productos de PCR -*nifH* de trigo fue una herramienta útil y efectiva para evaluar la presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno provenientes de los tejidos internos de trigo. Asimismo, esta técnica fue eficiente para revelar cambios de la comunidad endófitas por el sitio de cultivo y por la inoculación de bacterias PGPR (en la localidad de Ferré PCoA y UPGM).

La pirosecuenciación de los amplicones de ADN-*nifH* resultó en una base de datos representativa de la comunidad endofítica potencialmente fijadora de N en trigo. La aplicación de diversas herramientas informáticas al análisis y curado de estos datos primarios resultó en una biblioteca de calidad aceptable para encarar estudios comparativos los cuales nos permitieron llegar a los resultados que se resumen a continuación.

Encontramos que la diversidad de la comunidad diazotrófica endofítica de trigo no fue afectada por las variables ensayadas, el sitio de cultivo o la inoculación, mientras que la riqueza de la misma es afectada por el sitio.

Por otra parte, describimos la asociación filogenética de los grupos más abundantes en la base de datos ADN-*nifH* de endófitos de trigo. Este análisis demostró que las secuencias *nifH* predominantes se asociaron a los *subclusters* 1J/1K (Alfaproteobacteria orden Rizhobiales), 1E (Firmicutes género *Paenibacillus*), 3 (Deltaproteobacterias y Firmicutes, órdenes Clostridiales y Desulfovibionales), 1B (Cyanobacteria orden Nostocales).

Algunas de las secuencias halladas presentaron baja homología con secuencias de especies cultivables (*subcluster* 3), lo que indica que componentes potencialmente importantes en la fijación de N aún no han sido estudiados.

Los OTUs *nifH* más abundantes de la comunidad endófito de trigo presentan una diversidad filogenética importante la cual es principalmente afecta por el sitio de cultivo de las plantas. Algunos filotipos fueron ubicuos (1J/1K) mientras otros se hallaron asociados principalmente al sitio de cultivo, los *subcluster* 3 y 1B solo se encontraron en Ferré y Junín, respectivamente, mientras que en el subcluster 1E el efecto del sitio es dependiente del OTU. En relación con el tratamiento, la inoculación se encuentra afectando pocos filotipos, principalmente los clasificados en el subcluster 3, en los cuales se observa un efecto de reemplazo de poblaciones, Desufovibrionales por Clostridiales.

Concluyendo, la metodología de pirosecuenciación aplicada fue apropiada para evaluar la composición, riqueza y diversidad de la comunidad endófito fijadora de N de trigo y los efectos que provoca el sitio de cultivo y la inoculación de las bacterias PGPR.

# **CAPÍTULO VII**

## **CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD ENDÓFITA DE TOMATE MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL ADN-nifH**

**Objetivos**

- ✓ Evaluar los efectos de la fertilización química en la comunidad endófito fijadora de nitrógeno de tomate, aplicando técnicas metagenómicas.

**Objetivos específicos**

- Investigar la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en tomate cultivado bajo el sistema de agricultura protegida y evaluar los efectos de la fertilización química y estado fenológico de la planta.



## **7 Resultados y Discusión**

### **7.1 Algunas consideraciones generales sobre la metodología experimental.**

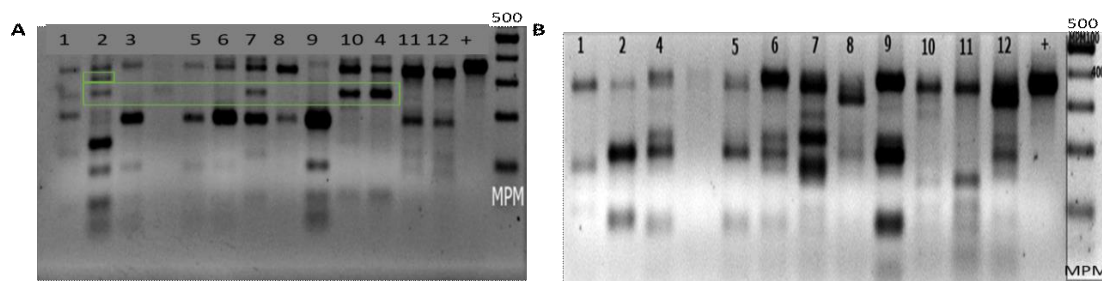
Con el propósito de evaluar la comunidad endofítica de tomate y el efecto de la fertilización química bajo el sistema de agricultura protegida (invernáculos) se encaró el siguiente ensayo: los plantines de tomate fueron implantados en suelo del invernáculo, los mismos fueron sometidos a dos tratamientos, - Tratamiento fertilizado (**fert**): plantines regados con solución nutritiva consistente en N (150ppm), P (80ppm) y K (80ppm), y – Tratamiento control (**cont**): plantines regados con agua. Se tomaron tres muestras en los siguientes tiempos: 1-. En la etapa de plantin al momento de su implantación en suelo (**ant**); 2-. A los 60 días de la implantación en suelo; 3-. A los 90 días de la implantación del suelo. Cada tratamiento fue realizado por duplicado. Resumiendo, se ensayaron dos tratamientos, con tres puntos de muestreo, y dos replicas biológicas en cada tratamiento, lo que concluye en un total de 10 muestras (2 réplicas del tiempo 1 + 2 tratamientos x 2 muestreos x 2 réplicas). Se aclara que en el tiempo 1 de muestreo (**ant**) hay un solo tipo de muestras ya que son los plantines antes de la implantación a suelo y no fueron sometidos a ningún tratamiento.

Las muestras fueron nombradas de la siguiente forma: El primer número correspondiente a la repetición, las abreviaturas (**ant**, **cont** y **fert**) corresponden al tratamiento y el segundo número corresponde al tiempo de muestreo, por ejemplo en la abreviatura **1-fert\_3**; **1** indica primera repetición; **fert** indica tratamiento con fertilización y **3** indica el tercer muestreo (90 días de implantados). Las plantas fueron cosechadas y sometidas a desinfección superficial de los tejidos. A partir del pool de raíces y tallos desinfectados se realizó la extracción de ADN y posterior amplificación por PCR de gen *nifH*. Los amplicones *nif* fueron analizados por RFLP y pirosecuenciación, como fue descrito en la sección Materiales y Métodos.

## 7.2 Análisis comparativo de las poblaciones endófitas fijadoras nitrógeno mediante RFLP

El análisis por RFLP de las secuencias *nifH* se realizó para detectar cambios en los perfiles de la comunidad endófitas fijadora de N<sub>2</sub> de tomate producto de la transferencia de los plantines a suelos y fertilización química en los diferentes estados fenológicos del cultivo.

Los amplicones *nifH* fueron incubados con las endonucleasas *MspI* y *HaeIII*, lo cual resultó en varios fragmentos de tamaños en el rango entre 359 pb a 50 pb. (Figura 54). Las digestiones con las endonucleasas se realizaron por duplicado obteniéndose perfiles-*nifH* similares entre las réplicas técnicas lo que pone de manifiesto la reproducibilidad del método.



**Figura 54. Perfiles en gels de agarosa de la digestión de amplicones *nifH* de endófitos tomate.** Foto de un gel analítico de agarosa 1.5% mostrando las bandas obtenidas después de la incubación con las endonucleasas *MspI* y *HaeIII*. En el panel **A** se muestran los perfiles-*nifH* con la endonucleasa *MspI*, en el panel **B** se muestra los perfiles-*nifH* con la endonucleasa *HaeIII*. Las calles corresponden a: 1-2 primer muestreo (1-ant\_1, 2-ant\_1), 3, 4 segundo muestreo control (1-cont\_2, 2-cont\_2), 5 y 6 segundo muestreo fertilizado (1-fert\_2, 2-fert\_2), 7, 8, 11,12 tercer muestreo control (1-cont\_3, 2-cont\_3) sembradas por duplicado, 9-10 tercer muestreo fertilizado (1-fert\_3 y 2-fert\_3) (+) Control positivo con *Azotobacter vinelandii*.

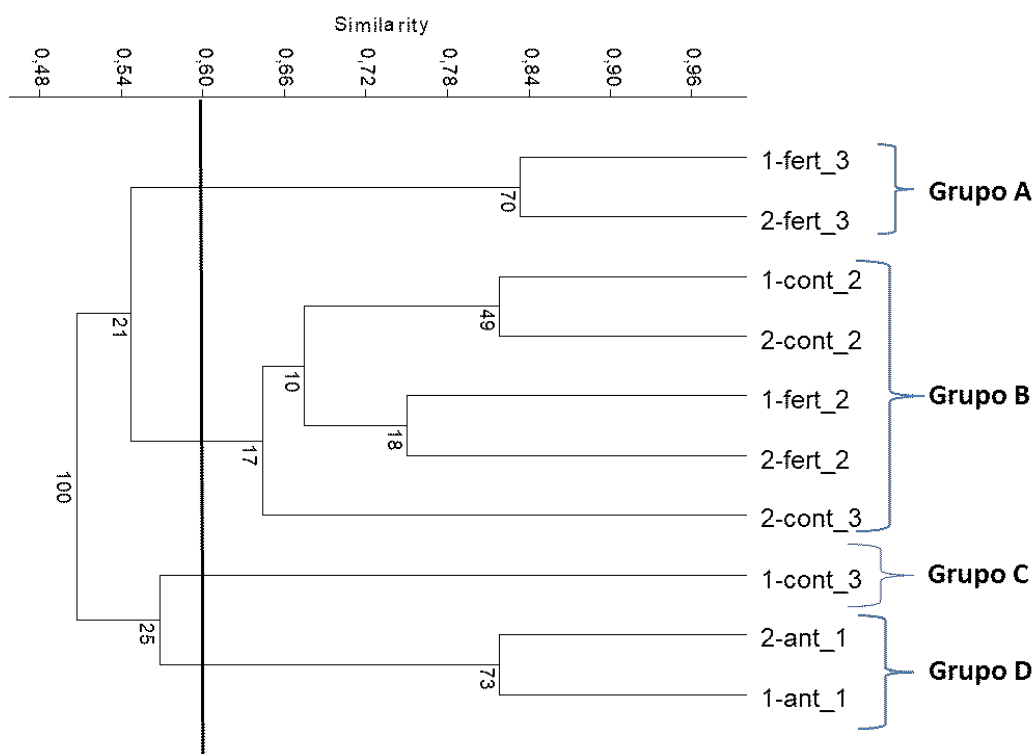
Se realizó un análisis de conglomerado mediante el método de agrupamiento UPGMA y análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre matrices de similitud basadas en las distancias de Bray-Curtis. Ambos análisis mostraron ordenaciones similares de las muestras (Figura 55 y Figura S3).

En la Figura 55 se presentan los resultados del análisis de agrupamiento. Considerando un valor de corte de 60% de similitud, se observó la formación de cuatro grupos, referidos como **A**, **B**, **C** y **D**. Las muestras previas a la implantación al suelo se separan en una rama conformando el grupo **D**. En **B** se encuentran todas las muestras del segundo muestreo, tratamientos control y fertilizado. En el tercer muestreo se separan los tratamientos, las plantas fertilizadas se ubican en una rama separada del resto de las muestras formando el grupo **A**. Las plantas control de este muestreo se encuentran

separadas entre sí, una réplica se encuentra en una rama única dentro del grupo **B** y la otra separada sola conformando el grupo **C**. Solo en esta muestra se observa esta separación, en el resto de las muestras las réplicas biológicas se agruparon entre sí con valores altos (> al 72%) de similitud, lo que aporta confiabilidad a las relaciones observadas.

Resumiendo, los perfiles RFLP-*nifH* se separan principalmente por los tiempos de muestreo, indicando que los estados fenológicos de la planta están ejerciendo un efecto marcado en la comunidad endofítica. Los mayores cambios se observan entre el primer muestreo (plantines antes a transferir a suelo) y los muestreos subsiguientes. Asimismo se observa que la fertilización química provocó cambios a largo plazo, ya que se observa una alteración del perfil de la comunidad endofítica en las plantas fertilizadas del tercer muestreo. Las semillas poseen una población endógena que puede ser beneficiosa para la germinación así como para los estadios más tempranos del desarrollo vegetal. Verma et al. (2001) [236] reportaron una diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de semillas de arroz entre las que se encuentran predominantemente las especies *Pantoea agglomerans* y *Klebsiella pneumoniae*. En este aspecto, las plantas de tomate presentan una amplia variedad de bacterias endofíticas. Xia et al. (2015)[324] encontraron los filos Firmicutes y Proteobacterias como grupos predominantes de la comunidad endofítica de semillas de tomate, observando más de 30 especies bacterianas como *Bacillus cereus*, *Burkholderia gladioli*, *Pseudomonas sp.* y *Paenibacillus sp.*. Por otra parte, también en semillas de tomate pero analizando las poblaciones endofitas fijadoras de nitrógeno se encontraron las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* [325].

Es posible que la mayor parte de las poblaciones que aparecen en nuestros plantines (antes que se transfieran a suelo), sean transmitidas desde la semilla, y se vaya modificando con la colonización de los grupos microbianos que se encuentran en el suelo y llegan a la rizósfera. Otros autores reportaron que la colonización de los tejidos internos depende de la comunidad nativa del suelos y de la capacidad de la planta para reclutar miembros de la comunidad desde la zona de la rizosfera para luego ingresar a los tejido internos [209], [272], [326].



**Figura 55.** Análisis de agrupamiento basado el coeficiente de similitud Bray-Curtis utilizando las matrices RFLP-*nifH*. La línea vertical celeste en el dendrograma, indica el valor de corte de similitud, a partir del cual se dividen los tres grupos principales.

Prakamhang *et al.*(2009)[124] reportan en el análisis del gen *nifH* de la comunidad endófitas de arroz, indicando que la fertilización nitrogenada altera la comunidad de fijadores de nitrógeno, además detectaron disminución en la expresión del gen *nifH* en los tratamientos con fertilización nitrogenada. Rebekah *et al.* (2016)[273] analizando la comunidad endofítica de trigo mediante RFLP observaron cambios en la estructura de la misma por efecto del fertilizante, las dosis utilizadas y el estado fenológico de la planta.

Podemos concluir que la estructura de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de tomate parece estar afectada por el estado fenológico de la planta, el pasaje a suelo y la fertilización química, indicando que es una comunidad dinámica que responde a los diferentes cambios ambientales.

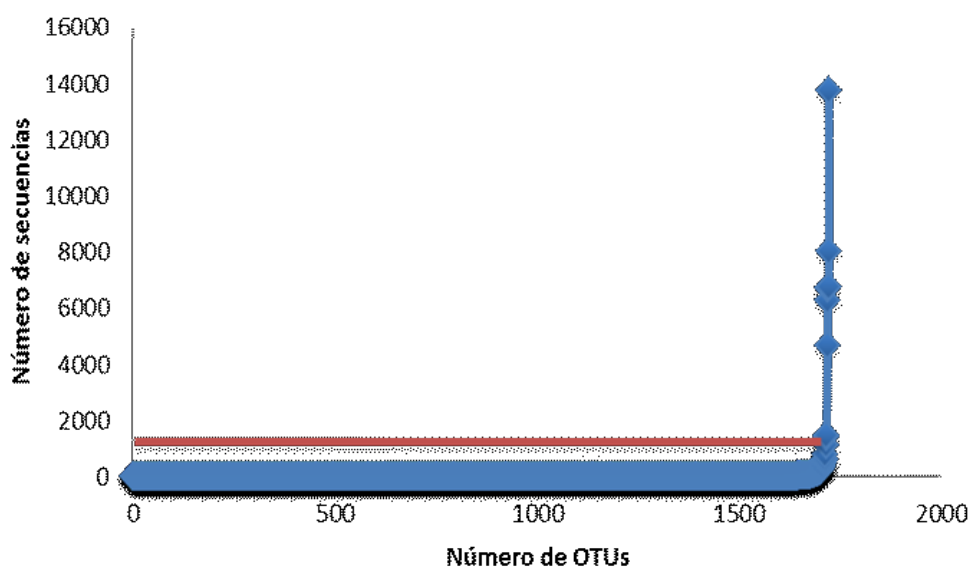
### 7.3 Pirosecuenciación del gen *nifH* de endófitos de tomate

La pirosecuenciación del gen *nifH* a partir del ADN extraído de plantas desinfectadas de tomate generó un total de 1.276.602 lecturas, las cuales fueron procesadas para obtener una base de datos de secuencias ADN-*nifH* de alta calidad aplicando los mismos criterios aplicados para las secuencias de

trigo y descriptos en Materiales y Métodos. La base de datos curada resultó en 73674 secuencias, las mismas fueron agrupadas con una similitud de 98% a nivel aminoacídico, resultando en la formación de 1724 OTUs. La abundancia de secuencias por muestra fue normalizada, posteriormente se eliminaron los 19 OTUs que no revelaron ninguna afiliación con la base de datos *nif*. Finalmente se obtuvo un total de 1264 OTUs, 2138 secuencias por muestra.

### 7.3.1 Abundancia y distribución de los OTUs.

La distribución de la abundancia de los OTUS, medida en número de secuencias *nifH*, se presenta en la Figura 56. Los OTUs mostraron una significativa variación en las abundancias de secuencias, observándose que solo el 1,2% de los OTUs superaron el número de 200 secuencias, 0,6% se encuentran en el rango 100 a 195, 9,2% están en el rango de 10-100 secuencias y más del 89% se encuentran representados por menos de diez secuencias. Este tipo de perfil de distribución en el que la mayoría de las secuencias se concentra en pocos OTUs y la mayor parte de los OTUs presentan pocas secuencias, comúnmente denominados "raros", fue observado en el análisis de pirosecuenciación de endófitos de trigo descrito anteriormente y reportados en diferentes trabajos de secuenciación masiva con muestras ambientales [120], [121], [292], [293].

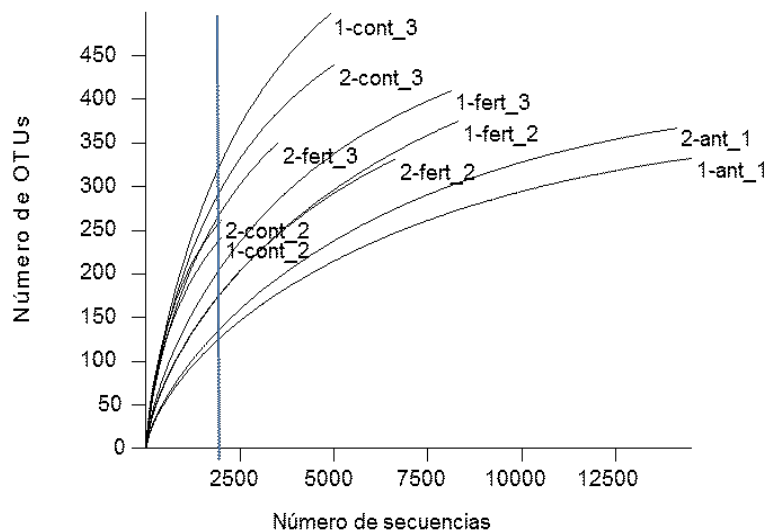


**Figura 56. Abundancia de secuencias para los 1724 en tomate.** La abundancia se cuantificó como el número de secuencias por OTU. La línea horizontal separa a los OTUs que presentaron más de 200 secuencias.

### 7.3.2 Estimación de la diversidad y la riqueza de la comunidad fijadora de nitrógeno.

En la Figura 57 se presentan las curvas de rarefacción de los OTUs originados en relación al número de secuencias de cada muestra. El valor de corte de 2138 secuencias corresponde a la muestra con menor número de secuencias (1-cont\_2). En este punto de corte, las muestras del primer muestreo (1-ant\_1 y 2-ant\_1) presentan los menores valores de OTUs, mientras que los mayores valores se alcanzan en el tercer muestreo de las plantas no fertilizadas (1-cont\_3 y 2-cont\_3). Esto indicaría que la riqueza de la comunidad diazotrófica se incrementa luego del pasaje a suelo y decrece por la fertilización en los últimos estadíos del cultivo (tercer muestreo).

Se observa que ninguna de las muestras alcanzó la asíntota de la curva, indicando que el esfuerzo de secuenciación no abarca el total de la diversidad endofítica presente en tomate. Sin embargo, los valores del estimador de  $RC_{Chao-1}$  se encuentran entre 58% a 74%, revelando que el análisis revela una proporción importante de la diversidad presente en las muestras (Tabla 24).



**Figura 57. Estimación de la riqueza de OTUs de endófitos diazotrófos de tomate por medio de curvas de rarefacción.** La línea vertical indica el punto en la curva correspondiente al menor número de secuencias (2138) de la base de datos correspondiente a la muestra 1-cont-2. Las curvas de rarefacción se construyeron utilizando el método de re-muestreo sin reemplazo, mediante la ejecución del comando `rarefaction.single` en el entorno Mothur. Las abreviaturas cont, fert y ant indican tratamientos control, con fertilización química y antes de transferir al suelo, respectivamente. Los números antes y después de la abreviatura indican la réplica y el tiempo de muestreo, respectivamente.

En la Tabla 24 se presentan los valores medios de las réplicas biológicas correspondientes a los estimadores de diversidad ( $H'$ ), riqueza (Chao-1), SeqN, SeqNn, Sob y  $RC_{\text{Chao-1}}$ .

**Tabla 24. Estimadores de riqueza (Chao-1) y diversidad Shannon-Wiener ( $H'$ ).** Se calcularon a partir de la biblioteca *nifH* de endófitos de tomate con los OTUs definidos al 98% de similitud de las secuencias aminoacídicas.

|  | ant_1            | cont_2           | fert_2           | cont_3           | fert_3           |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>SeqN</b>                            | 14463,5          | 2165,5           | 7627,5           | 5112,5           | 5997,5           |
| <b>SeqNn</b>                           | 2138             | 2138             | 2138             | 2138             | 2138             |
| <b>Sob</b>                             | 252              | 200              | 229              | 329              | 253              |
| <b><math>H'</math></b>                 | 2,5 <sub>a</sub> | 4,1 <sub>c</sub> | 2,6 <sub>a</sub> | 3,5 <sub>b</sub> | 3,0 <sub>a</sub> |
| <b>Chao<sub>-1</sub></b>               | 342 <sub>a</sub> | 324 <sub>a</sub> | 364 <sub>a</sub> | 583 <sub>b</sub> | 383 <sub>a</sub> |
| <b><math>RC_{\text{Chao-1}}</math></b> | 74               | 61               | 63               | 58               | 68               |

**SeqN**, número de secuencia por muestra, **SeqNn**, número de secuencia normalizado por muestra, **Sobs**, número de OTUs detectados a un nivel de distancia filogenética del 2%,  **$RC_{\text{SChao-1}}$** , cobertura relativa calculada como el número de OTU dividido por la riqueza estimada. Las abreviaturas cont, fert y ant indican tratamientos control, con fertilización química y antes de transferir al suelo, respectivamente. Los números después de la abreviatura indican el tiempo de muestreo. Para evaluar significancia estadística de las variaciones se aplicó la prueba de Tukey; letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

El menor valor de diversidad  $H'$  se observó en el primer muestreo mientras que las plantas control del segundo muestreo presentaron el mayor valor (Tablas 35). La transferencia de los plantines al suelo provoca un aumento de la diversidad de endófito fijadora de nitrógeno, lo que podría estar asociado a la capacidad de las raíces de tomate de reclutar poblaciones del suelo a la zona rizosférica y de allí al interior de los tejidos. Por otra parte, los valores de las plantas control fueron significativamente mayores que el resto de las plantas (cont\_2:  $r^2=0,99$   $P= 0,0010$ ; cont\_3:  $r^2=0,99$   $P= 0,0028$ ) indicando un efecto negativo de la fertilización en la diversidad endofítica. Asimismo, la disminución significativa de la diversidad entre las plantas control del segundo muestreo y tercer muestreo sugiere un efecto dado por el estado fenológico de la planta ( $r^2=0,98$   $P= 0,0082$ ).

En cuanto a la riqueza estimada por Chao-1 se observa que los valores de las plantas sin fertilización del tercer muestreo son significativamente mayores ( $r^2=0.98$  y  $P= 0,03$ ) a los de las plantas fertilizadas (Tabla 35). Este resultado

es similar a lo observado con las curvas de rarefacción e indica que la fertilización afecta negativamente la riqueza endofítica.

Podemos concluir que la diversidad y riqueza de la comunidad endofítica varía en las diferentes etapas del cultivo, en respuesta a cambios ambientales (pasaje a tierra), al estado fenológico de la planta, y al efecto de la fertilización química.

En varias especies vegetales se ha reportado que la diversidad de las bacterias endofíticas va cambiando con los estados fenológicos de las plantas [303]. Por otra parte, se ha reportado que la fertilización nitrogenada puede afectar negativamente la estructura y actividad de la comunidad endofita fijadora de nitrógeno. Tan *et al.* (2003)[237] examinaron el impacto de la fertilización en las poblaciones diazotróficas de raíces de arroz encontrando efectos marcados en la composición de la comunidad dentro de los 15 días posteriores a la aplicación del fertilizante. Asimismo, Prakamhang *et al* (2009) [124] analizaron plantas de arroz a campo observaron que la diversidad y la actividad de los fijadores de nitrógeno son afectadas negativamente por la aplicación de fertilizante. En este mismo sentido Ramírez *et al.* (1999)[327] encontraron que la fertilización nitrogenada disminuye la colonización de tejidos de caña de azúcar por *Acetobacter diazotrophicus*.

### **7.3.3 Patrón de diversidad beta de la comunidad endofita fijadora de nitrógeno de tomate**

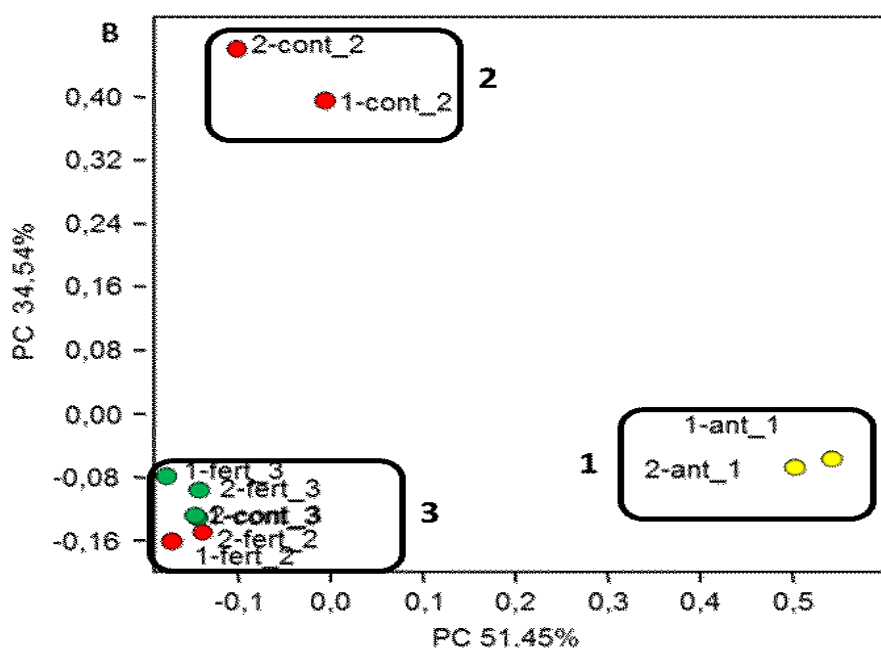
La estructura de las comunidades endofíticas de los distintos tratamientos ( $\beta$  diversidad) fue comparada utilizando los criterios descritos previamente en trigo. Se aplicó la medida de similitud Bray-Curtis usando la matriz de abundancias relativas de los OTUs *nifH*, y la medida de distancia *weighted* UniFrac utilizando las distancias filogenéticas entre los OTUs y sus abundancias relativas. Ambos criterios de análisis mostraron ordenamientos similares en el plano (Figura 58 y Figura S4). Se observa que, similar a lo observado con el análisis de FRLP, las réplicas biológicas de cada muestra se encuentran cercanas en el plano, indicando una alta reproducibilidad de los resultados.

Los gráficos muestran la formación de los siguientes grupos bien separados en el plano cartesiano: 1- las muestras del primer muestreo, 2- las plantas no



fertilizadas del segundo muestreo, 3- las plantas fertilizadas del segundo muestreo y el tercer muestreo de ambos tratamientos.

Este ordenamiento demuestra el cambio marcado de la composición de la comunidad endofítica por efecto del pasaje a tierra. Asimismo, la separación de las plantas fertilizadas y no fertilizadas del segundo muestreo sugiere que la fertilización química afecta la composición endofítica en las primeras etapas del cultivo.



**Figura 58. Análisis de coordenadas principales (PCoA) calculados a partir de la abundancia de los OTUs y sus relaciones filogenéticas usando weighted UniFrac.** Los círculos coloreados en amarillo, rojo y verde pertenecen al primer, segundo y tercer muestreo respectivamente. Las abreviaturas cont, fert y ant indican tratamientos control, con fertilización química y antes de transferir al suelo, respectivamente. Los números antes y después de la abreviatura indican la réplica y el tiempo de muestreo, respectivamente.

Prakamhang *et al.* (2009) [124] reportaron que el perfil de la comunidad endofítica de arroz es modificado cuando las mismas son sometidas a fertilización nitrogenada. Asimismo, Wemheuer *et al.* (2016) [328] encontraron que la fertilización provoca cambios significativos en la composición de la comunidad endofítica de *Dactylis glomerata L.*, *Festuca rubra L.* y *Lolium perenne L.*

#### **7.3.4 Asignación taxonómica de las secuencias *nifH* de endófitos de tomate.**

La asignación taxonómica de los diferentes OTUs se realizó utilizando la clasificación de secuencias *nifH* propuesta por Zehr *et al.* (2014) [177].

En la Tabla 25 se resume la distribución de los filotipos ADN-*nifH* de los endófitos de tomate. Encontramos que las secuencias están distribuidas en los clusters I y III. Predominaron secuencias del *subcluster* 1J/1K (68,67%), relacionadas a las clases Alfa, Betaproteobacterias y Nitrospira, particularmente a los órdenes Rhizobiales, Rhodospirillales, Burkholderiales y Nitrospirales, seguido de los subclusters 1A (11,25 %), 1G (8.41%), que se encuentran relacionados filogenéticamente con la clase Delta (*Pelobacter*, *Geobacter* y *Anaeromyxobacter*) y Gammaproteobacterias (Enterobacteriales) respectivamente. Los subclusters 3 (anaerobios estrictos asociados a Deltaproteobacterias y Firmicutes), 1B (Cyanobacteria), 1E (Paenibacillus), 1O (Chromatiales), y 1P (Rhodocyclales) se encuentran en baja proporción llegando sumados a nomás del 4% de las secuencias totales. No se encontraron grupos taxonómicos relacionados con los *clusters* II y IV que esta relacionados filogenéticamente a secuencias *nifH* de arqueas y secuencias paralogos respectivamente.

En nuestros resultados encontramos como grupos predominantes secuencias relacionadas con el Phylum Proteobacteria, en especial de las clases Alfa- y Beta y Gammaproteobacteria. Varios de los filotipos 1J/1K que aparecen en nuestros tratamientos fueron observados previamente como predominantes en la comunidad microbiana asociada a endófito de tomate. Romero *et al.* (2014) [294] encontraron como grupo predominante el orden Rhizobiales tanto en hoja como en raíz, mientras que el resto de los grupos se distribuyó de acuerdo al tejido, en hoja fueron abundantes los filos Gamma (*Enterobacteriaceae* y *Xanthomonadaceae*) y Betaproteobacteria (Rhodocyclales), mientras que en raíz se encontraron principalmente Deltaproteobacteria (Myxococcales). Por otra parte, Tian *et al.* (2017) [329] analizando los endófitos de raíz de tomate encontraron Gammaproteobacteria (Pseudomonadales, Enterobacteriales y Xanthomonadales), Alfaproteobacteria (Rhizobiales), Betaproteobacteria (Burkholderiales) y Firmicutes (Bacillales) como grupos predominantes.

### **7.3.5 Distribución de los subclusters nifH de la comunidad de endófitos en distintas etapas de cultivo de tomate.**

En la Figura 59 se presenta la distribución de los *subclusters* en relación con los tratamientos y tiempo de muestreo. El *subclusters* 1J/1K (Rhizobiales, Rhodospirillales, Burkholderiales y Nitrospirales), estuvo bien representado en todas las muestras, siendo predominante en todos los tratamientos y muestreos (42%-94%) luego del pasaje al suelo.

El *subcluster* 1A, relacionado con secuencias de *Pelobacter*, *Geobacter* y *Anaeromyxobacter*, es el grupo predominante (51,4%) en las muestras previas al pasaje al suelo, mientras en el resto de las muestras casi no está representado (< 3%). Por el contrario, el subcluster 3 no se detectó en los plantines antes del pasaje a suelo, encontrándose presente en todas las muestras restantes sin presentar asociación con ningún tratamiento.

El *subcluster* 1E (*Paenibacillus*) se encontró presente en todos los muestreos, presentando mayor abundancia en las plantas fertilizadas (3,5% 2<sup>do</sup> muestreo y 7,3% 3<sup>er</sup> muestreo) comparadas con las plantas control (3% 2<sup>do</sup> muestreo y 0.2% 3<sup>er</sup> muestreo). Con similar distribución, el *subcluster* 1B (Cyanobacteria) presentó la mayor abundancia en el tratamientos con fertilización (5% 2<sup>do</sup> muestreo y 2% 3<sup>er</sup> muestreo) y no se detectó en las plantas control.

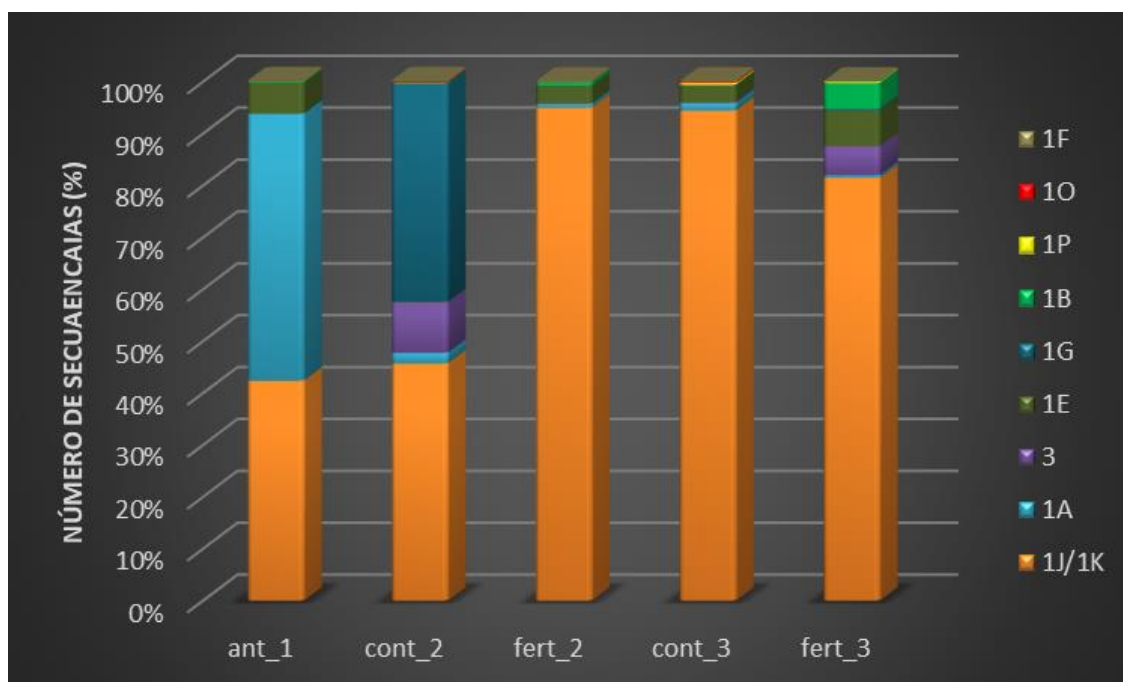
En algunos subclusters no se encontró relación con ninguna de las variables analizadas como por ejemplo el *subcluster* 1G (Enterobacteriales) el cual aparece presentando una abundancia significativa (42.0%) pero en una única muestra (segundo muestreo de las plantas no fertilizadas).

Estos resultados estarían indicando que en plantas de tomate la transferencia a suelo está asociada a un cambio en la estructura de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno. Por ejemplo, la transferencia de los plantines a suelo provoca el incremento del grupo 1J/1K, la aparición de los *subclusters* 1G y 3, y la disminución de los grupos 1A y 1E. Por otra parte, la fertilización química tiene un efecto sobre la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno incrementando la abundancia de los *subcluster* 1B y 1E, mientras que 1G desaparece.

**Tabla 25.** Asignación filogenética de las secuencias *nifH* endofíticas de tomate.

| Cluster | Subclusters | Nº sec.<br>(%) | Nº OTUs<br>(%) | Filo                  | Orden-genero*   |
|---------|-------------|----------------|----------------|-----------------------|---|
|         | 1A          | 11,25          | 8,28           | Delta                 | <i>Pelobacter, Geobacter y Anaeromyxobacter</i>                   |
|         | 1B          | 1,24           | 2,21           | Cyanobacteria         | Nostocales, Oscillatoriales                                       |
|         | 1E          | 3,99           | 9,18           | Firmicutes            | <i>Paenibacillus</i>  |
|         | 1G          | 8,41           | 7,04           | Gamma                 | Enterobacteriales   |
| I       | 1J/1K       | 71,69          | 68,67          | Alfa-Beta-Nitrospirae | Rhizobiales, Rhodospirillales,<br>Burkholderiales y Nitrospirales |
|         | 1O          | 0,098          | 0,55           | Gamma                 | Chromatiales  |
|         | 1F          | 0,028          | 0,31           | Epsilonproteobacteria | Arcobacter  |
|         | 1P          | 0,11           | 0,63           | no cultivable         | No cultivable   |
| III     | 3           | 3,15           | 3,32           | Firmicutes, Delta     | Acetivibrio, Clostridium,<br>Desulfovibrio y Desulfobacterium     |

\*Orden o género cercano a las secuencias de los *subclusters* presentes en la base de datos.



**Figura 59.** Distribución de filotipos *nifH* de la comunidad de endófitos de tomate. Las abreviaturas indican: **ant\_1** primero muestreo plantas antes de transferir a suelos, **cont\_2** plantas control y **fert\_2** plantas con fertilización química segundo muestreo, **cont\_3** plantas control y **fert\_3** plantas con fertilización química tercer muestreo.

Concluyendo, las comunidades endofíticas fijadoras de nitrógeno son dinámicas en el tiempo y están siendo afectadas por la aplicación exógena de nutrientes. Las plantas luego del pasaje al suelo, desarrollan una interacción con la población rizosférica que conduce a la modificación de la estructura endofítica variando el perfil cualitativamente como cuantitativamente en sus grupos taxonómicos por el régimen de fertilización y estado fenológico.

### 7.3.6 Clasificación taxonómica de los OTUs más abundantes

Con el propósito de analizar las relaciones filogenéticas de los 24 OTUs más abundantes (con más de 100 secuencias), se construyeron árboles de filogenia utilizando la base de datos de referencia de secuencias *nifH* de Zehr *et al.*, (2014)[177]. Estos OTUs representan una proporción importante (75.2%) de la base de datos ADN-*nifH* de tomate.

Se observaron algunos OTUs ubicuos entre tratamientos y muestreos (OTUs 1, 13, y 128) así como otros que se encontraron asociados al pasaje a suelo, tiempos de muestreo o a los tratamientos. Por ejemplo, los OTUs 11 y 35 se encuentran asociados al primer muestreo, mientras que los OTUs 2, 8, 32, 163, 124, 974, 982, 1226, se encuentran principalmente en el segundo y tercer

muestreo, indicando una asociación con el pasaje a suelo. Por otra parte, los OTUs 64, 216, 67, 24, 107 se encuentran asociados al segundo muestreo de las plantas control, mientras que los OTUS 25 y 974 estuvieron presentes en el tercer muestreo del mismo tratamiento, indicando un efecto del tratamiento y estado fenológico de la planta. Por el contrario, el OTU 1336 está asociado a un único tratamiento, plantas fertilizadas, independiente del tiempo de muestreo.

En la Figura 60 se muestra la relación filogenética de los OTUs dominantes dentro de la base de datos ADN-*nifH* y su proporción en cada uno de los muestreos y tratamientos. A continuación, se describen las relaciones encontradas en los *subclusters nifH* con mayor representación en nuestra base de datos, 1J/1K, 1A, 1G y 1E.

#### **-Subcluster 1J/1K**

Doce de los veinticuatro OTUs abundantes fueron clasificados dentro del *subclusters* 1J/1K. Siete de ellos se relacionaron con una similitud de 94% a secuencias de bacterias no cultivables de la rizosfera (OTU 982, 163, 127, 1226, 214, 974 y 32) y lejanamente (<90%) con la especie *Leptospirillum ferrodiazotrophum* del orden Nitrospirales. Estos OTUs no fueron detectados en las plantas previas al pasaje a tierra pero estuvieron presentes a partir del segundo muestreo en todos los tratamientos, la mayoría de ellos distribuidos en forma equitativa. Asimismo, los 3 OTUs relacionados con el orden *Burkholderiales*, similares a *Burkholderia xenovorans* (100%, OTU 2) y *Burkholderia sp.* (99%, OTU 8 y 49) tampoco estuvieron presentes en las plantas previas al pasaje al suelo, sin embargo en este caso la distribución en el resto de las muestras es diferencial por tiempo de muestreo y tratamiento. Los mismos se encontraron en baja proporción en las plantas control del segundo muestreo pero son abundantes en el tercer muestreo de estas plantas y en las plantas fertilizadas de ambos muestreos. Por otra parte, los OTUs relacionados al orden Rhizobiales, OTU 1 y 128, similares (99%) a la especie *Rhizobium etli* se encontraron en todas las muestras, pero presentan una distribución diferencial opuesta al grupo de OTUs *Burkholderiales*, con una mayor proporción en las muestras previas al pasaje a tierra y en el primer

muestreo de las plantas sin fertilizar, indicando que el grupo es afectado negativamente por la fertilización y por el estado fenológico de la planta.

Las especies cultivadas encontradas relacionadas con estos Otus han sido previamente reportadas como endófitas de plantas. *Leptospirillum ferrodiazotrophum* se desarrolla oxidando al hierro ferroso y es conocido por su amplia distribución en depósitos de minerales y lixiviados de las minas [330]. Sin embargo también ha sido reportado como endófitos en especies del género *Populus* [331]. El género *Rhizobium* se encuentra reportado como uno de los grupos predominantes de endófitos de batata, papa, trigo, cebada y en otras especies vegetales por lo que se puede considerar ubicuo entre las comunidades endofíticas [251], [270], [271], [274], [275], [329], [332]–[336].

Las especies del género *Burkholderia* se encuentran comúnmente asociadas a los vegetales, como endófitas, rizosféricas y con características de promoción de crecimiento en cultivos de trigo, maíz, soja caña de azúcar, tomate entre otros [337]–[341]. Es interesante destacar que en trabajos previos estos filotipos no aparecen como componentes abundantes de la comunidad fijadora de N del suelo, potencial o activa (Collavino *et al.*: [121] Calderoli *et al.* [289]) lo que parecería indicar que cobra un rol fundamental como diazótrofa durante la asociación con la planta.

Se concluye que la transferencia de los plantines a suelo incorpora un grupo significativos de bacterias fijadoras de nitrógeno a los tejidos internos de las plantas de tomate. En este sentido Yang *et al.* (2017)[334] encontraron diferencias significativas en la composición del microbioma de endófitos de plantas de cebada crecidas en condiciones de asepsia y plántulas que crecieron en suelo no estéril, concluyeron que el suelo modifica fuertemente la comunidad endofítica, afectando particularmente ciertos grupos taxonómicos como las familias Enterobacteriaceae y Paenibacillaceae, los cuales disminuyeron en plantas crecidas en suelo y Actinobacteriaceae y Rhizobiaceae, los cuales se incrementan en esa condición.

### **Subcluster 1G**

Los OTUs abundantes de este *subcluster* (OTUs 64, 216, 107 y 24) presentaron similitud mayor similitud (94%) con la especie *Dickeya dadantii* del

orden Enterobacteriales. Estos filotipos solo fueron detectados en el segundo muestreo de las plantas no fertilizadas. La presencia de este *subcluster* es determinante para la separación de los tratamientos control y fertilizado del segundo muestreo (Figura S4).

La mayor parte de las especies de *Dickeya* son patógenos de un amplio rango de cultivos y causan la podredumbres blandas [342]. Se observó que el *subcluster* 1G se relaciona también con secuencias de *Pectobacterium atrosepticum* y *Paantoea* sp. las cuales son comúnmente encontrados como patógenos de plantas. Dada estas relaciones, y considerando el concepto de bacterias endófitas el cual indica que son bacterias que no causan daños aparentes en las plantas [342], [343], estos filotipos no deberían considerarse componentes endofíticos de tomate. Sin embargo, la similitud encontrada es baja (94%) por lo que no se puede confirmar su clasificación como patógenas.

#### **- Subcluster 1A**

Los OTUs abundantes clasificados dentro del *subcluster* 1A (OTUs 35 y 13) se encuentran relacionados con secuencias de *Geobacter lovleyi*. Estos OTUs presentan la mayor abundancia en las plantas antes del pasaje a suelo, en el resto de las muestras se encuentran presentando valores mayores en las plantas sin fertilizar comparadas con las fertilizadas. El análisis de componente principal mostró que la presencia de este subcluster fue determinante para la separación del primer muestreo de los otros muestreos junto con el subcluster 1J/1K (Figura S4).

Las especies del género *Geobacter* son anaeróbicas facultativas, con importancia en la biorremediación, oxidación de compuestos orgánicos y de ciertos metales acoplado a la reducción disimilativa de sulfato de hierro (III) [344]. Se ha propuesto que su capacidad para fijar N<sub>2</sub> les proporciona una ventaja adaptativa a ambientes con escasos nutrientes [244]. Además, la capacidad de los representantes de este clado para utilizar el oxígeno como aceptor alternativo de electrones le da ventajas competitivas en condiciones óxicas/anóxicas [345]. Secuencias nifH relacionadas con este grupo de bacterias se encuentra descrito como componentes abundantes en la comunidad fijadora, potencial y activa, de suelos agrícolas de la pampa



argentina [121]; [120]. Asimismo, Sessitsch *et al.* (2012)[209] detecta a esta población en el metagenoma de endófitos de arroz y destaca que estas bacterias son propias del suelo, encontrándolas como un grupo novedoso entre las bacterias endófitas.

Nuestros resultados indican son filotipos probablemente transmitidos desde la semilla que son afectados negativamente por la fertilización y que pueden estar siendo condicionados por las condiciones presentes en el suelo.

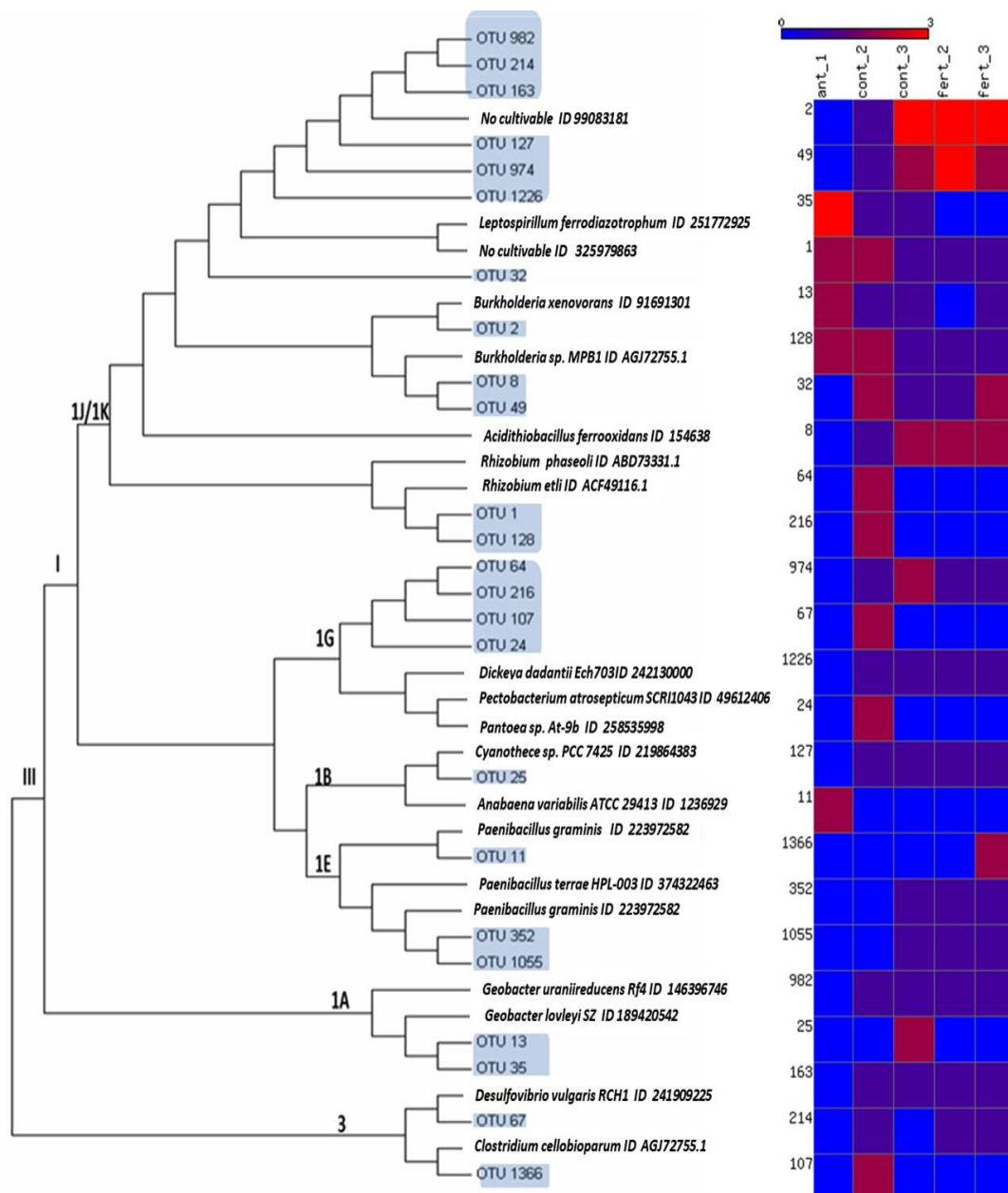
### **-Subcluster 1E**

Los OTUs abundantes de este *subcluster* presentaron similitud con secuencias de *Paenibacillus massiliensis* (99%, OTU 11) y *Paenibacillus graminis* (OTUS 352 y 1055). El OTU 11 solo se detectó en el primer muestreo, por el contrario los OTUS 352 y 1055 no se detectan en estas muestras y están presentes en el tratamiento con fertilización del segundo muestreo, y en el tercer muestreo de ambos tratamientos. El género *Paenibacillus* comprende más de 89 especies, son bacterias anaerobia facultativa formadora de endospora, Gram positiva [346], no patógena y se localizan en distintos ambientes,[76], [318]–[320], este género se ha reportado en varios trabajos como endófito de trigo, arroz y otras especies vegetales [81], [122], [273]. Nuestros resultados nos permiten inferir que una parte de la población 1E se encuentra en la semilla (*Paenibacillus massiliensis*) y es afectado negativamente cuando se transfiere las plantas a suelo, mientras que otra población (*Paenibacillus graminis*) se ve favorecida por la fertilización química y es afectada por el estado fenológico de la planta.

Resumiendo, en esta sección se ha encarado la asociación filogenética de los 24 OTUs que se encontraron en mayor proporción en la base de datos *nifH*-ADN, y su distribución en los diferentes tratamientos y muestreos. Este análisis demostró que las secuencias *nifH* predominantes se asociaron a los *subclusters nifH* 1J/1K (Alfa-, Betaproteobactreias y Nitrospira y bacterias no cultivables), 1G (*Dickeya* considerada como fitopatógeno), 1A (*Geobacter* considerada como bacterias de suelos), 1E (*Paenibacillus*) 1B (Cianobacteria) y 3 (Clostridiales y Desulfovibrionales). Esto indicaría que nuestro análisis reveló tanto filotipos asimilables a especies cultivadas, como filotipos nuevos que

presentaron alta similitud solo con secuencias *nifH* metagenómicas o no cultivables detectadas en otros ambientes naturales. Cabe destacar que las secuencias con baja similitud con especies cultivables representan el 9,6% de base datos.

Asimismo, se observaron algunos componentes abundantes que fueron ubicuos así como otros que se encontraron asociados al pasaje a suelo, tiempos de muestreo o a los tratamientos analizados (fertilizado y no fertilizado) (Figura 60).



**Figura 60. Relación filogenética de los OTUs predominantes de endófitos de tomate.** Los OTUs abundantes (recuadros color azul) presentaron más 100 secuencias *nifH*. Los *clusters* canónicos de *nifH* se indican sobre las ramas principales representan los *subclusters* y *clusters* en número romano. En el margen derecho de la figura se graficó el *heatmap* con la distribución relativa de cada OTU entre los distintos muestreos y tratamientos. Se muestran los

porcentajes de confianza superiores a 50% y un bootstrap 1000 repeticiones. El árbol de filogenia se construyó en MEGA7 con secuencias aminoacídicas parciales de *nifH* usando el método Neighbour-Joining.

### **Conclusiones**

Se caracterizó la comunidad endófitica fijadora de N de tomate considerando tres variables, la transferencia de los plantines al suelo, la fertilización química y el estado fenológico de la plantas. El análisis RFLP permitió revelar cambios en el perfil de las comunidades endófitas por las tres variables analizadas, indicando que las comunidades endofíticas fijadoras de nitrógeno son dinámicas en el tiempo.

La pirosecuenciación de los amplicones de ADN-*nifH* resultó en una base de datos representativa de la comunidad endofítica potencialmente fijadora de N en tomate. Encontramos que la comunidad diazotrófica de tomate encierra un alto grado de diversidad, la cual es afectada por la implantación de los plantines en suelo, fertilización química y el desarrollo de la planta en el suelo (estado fenológico). En cuanto a la riqueza de la misma, se observa que la fertilización química y estado fenológico provocó cambios a largo plazo (tercer muestreo) sobre este parámetro.

Por otra parte, describimos la asociación filogenética de los grupos más abundantes en la base de datos ADN-*nifH* de endófitos de tomate. Un componente importante (9,6% del total de la base de datos) de secuencias halladas presentaron muy baja homología con secuencias de especies cultivables (*subcluster* 1J/1k), lo que indica que componentes potencialmente importantes en la fijación de N aún no han sido estudiados y representarían contribuciones significativas sobre el conocimiento de la comunidad y su dinámica en el desarrollo de las planta.

Los OTUs *nifH* más abundantes de la comunidad endófitica de tomate presentan una diversidad filogenética importante. Algunos de estos grupos se acomodan y distribuyen en las distintas condiciones como transferencia a suelo de los plantines, fertilización y estado fenológico.

Concluyendo, las metodologías aplicadas, FRLP y pirosecuenciación permitieron evaluar las diferentes propiedades de la comunidad endófitica fijadora de N de tomate, su composición, riqueza y diversidad, analizando la dinámica de esta comunidad en las diferentes condiciones ambientales tales

como transferencia de los plantines a suelo, fertilización química y estado fenológico de la planta.

# ***Conclusiones generales***

Una de las limitantes más importantes de la producción agrícola es la disponibilidad de nutrientes en el suelo, los cuales son esenciales para el desarrollo de la planta. El alto costo económico del uso de fertilizantes y fungicidas de origen químico, como asimismo su impacto en los agroecosistemas, instala a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal como una alternativa comparativamente ventajosa. Se les asigna un rol clave en la asimilación de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y en el buen estado fitosanitario [347]. En este marco conceptual de agricultura sustentable, es importante explorar la naturaleza en su diversidad de microorganismos PGPR, y examinar el rol e impacto sobre la productividad de cultivos de interés agronómico.

En este trabajo de tesis doctoral se utilizaron dos estrategias para evaluar las bacterias con características PGPR. Una de ellas consistió en la evaluación de dos aislamientos bacterianos en sus actividad PGPRs, rizocompetencia y efecto de la inoculación en cultivos de interés agronómico. En la otra estrategia se examinó la diversidad de la potencial comunidad endofítica fijadora de nitrógeno, aplicando técnicas metagenómicas, y sobre la misma se evaluó el efecto de la inoculación con cepas bacterianas (E.sp.2.14 y E.sp.1.24), el sitio de cultivo, la fertilización química y estado fenológico de la planta

Dos aislamientos identificados como 2.14 y 1.24 aislados de suelos de Corrientes, con demostrada propiedad de promoción del crecimiento de poroto, fueron objeto de un análisis amplio, evaluando *in vitro* algunos rasgos de promoción de crecimiento de plantas, y extendiendo la evaluación de la respuesta a la inoculación de otras especies vegetales. Aplicamos dos criterios de análisis para demostrar la capacidad de las cepas para fijar nitrógeno atmosférico, por un lado se demostró la presencia genómica de secuencias homólogas al gen *nifH* y por otro lado se observó el desarrollo en un medio libre de nitrógeno fijado. No obstante estas evidencias, los resultados de ensayos de inoculación no indicaron un incremento de contenido de nitrógeno foliar, aunque las plantas mostraron aumentos en varios parámetros de crecimiento. Estos resultados indicarían que la mayor acumulación de biomasa no se explicaría por la actividad de fijación biológica de nitrógeno sino por otros efectores que estimulan el crecimiento. Sessitsch *et al.* (2012) [81] informaron

que solo una minoría de los diazotrofos asociados a raíz, son activos desde el punto de vista de expresión nif-génica. Por otro lado, resultó interesante identificar secuencias nif en el genoma de nuestros aislamientos, teniendo en cuenta que el genoma de la cepa *Enterobacter* 638 carece de los genes nif [231]. Esto indica que la capacidad de FBN es variable entre las cepas de *Enterobacter* sp. y aún en los casos que posean esa capacidad, la misma no asegura que se expresa en asociación con la planta. Por otro lado, Bruto *et al.* (2014)[224] examinaron la distribución de genes relacionados con la promoción de crecimiento en un conjunto diverso de bacterias promotoras, encontrando secuencias nif en el genoma de 18 especies alejadas taxonómicamente comparadas entre sí. Estos autores, proponen que en algunos casos –como por ejemplo el caso de los genes nif- la presencia de ciertos genes de promoción resultaron de la transferencia lateral. Es probable que el nivel de actividad fijadora por parte de nuestros aislamientos, les permite desarrollar y multiplicar pero, no acumulan amonía para ser secretado y asimilado por la planta para su crecimiento. Aún, ese nivel de sostenimiento de crecimiento bacteriano, es un proceso energéticamente caro, se ha estimado el uso de entre 8 y 30 moléculas de glucosa por molécula de nitrógeno fijado [348], mientras que se ha indicado que el suelo es un medio pobre en fuente de carbono disponible.

La determinación *in vitro* de actividades enzimáticas asociadas a rasgos de promoción de crecimiento, resultó negativa para un conjunto diverso de enzimas. Estas enzimas han sido asociadas a distintas funciones tales como antagonismo del crecimiento fúngico, producción de fitohormonas etc. El resultado negativo de ACC deaminasa en nuestras cepas está de acuerdo con la ausencia del gen *aca* en el genoma de la cepa *Enterobacter* sp. 638 [349]. Sin embargo, contrariamente Naveed *et al* (2014) [350]. mostraron que el aislamiento de maíz, asignado a la especie *Enterobacter* sp. resultó activo en ACC desaminasa. En conjunto, estos resultados nos indican que la propiedad de expresar actividad ACC desaminasa es variable entre especies del género *Enterobacter* sp. Respecto a las otras enzimas líticas ensayadas *in vitro*, nos fue interesante observar que nuestros aislamientos no expresaron actividad de celulasas y pectinasas, en este mismo sentido también fue negativa la

anotación de genes codificantes de degradación de celulosa en el genoma de *Enterobacter* sp. 638. Estas enzimas fueron señaladas como protagonistas en la entrada a la planta de bacterias endofíticas. Recientemente, conforme a la expectativa de encontrarlas en la comunidad de microorganismos endofíticos, Sessitsch *et al.* (2012) [81] reportaron una relativa abundancia de genes asociados a celulosas, pectinasas etc. en el metagenoma de la comunidad de arroz. Esto sugiere que las enzimas son importantes y quizás necesarias para alcanzar el interior del tejido vegetal pero es una propiedad redundante en el caso de bacterias PGPR que actúan asociadas a la rizosfera. Más aún, Reinhold-Hurek *et al.* (2006) [89] encontraron que las celulasas se activan cuando entran en contacto con las raíces de arroz para degradar la pared celular e ingresar a los tejidos. En general, estas observaciones nos permiten concluir la adopción de cierta cautela al interpretar los resultados *in vitro* sobre la determinación de enzimas líticas, como indicadores asociados a buenos promotores de crecimiento.

Se ha indicado que la producción de biofilm por PGPR, permite protegerlas de las condiciones ambientales extremas tales como alta salinidad, concentraciones de tanino, pH extremo, metales pesados, depredación y competencia con las poblaciones nativas del suelo [229],[222]. En este trabajo demostramos que las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 forman biofilm tanto sobre superficies abióticas como sobre superficies de la raíz de tomate y trigo. Esta capacidad le puede ser favorable para lograr colonizar la rizosfera, en particular la superficie radical, aún en condiciones de suelos con propiedades extremas. De acuerdo con lo observado, et al (2014) [351], describió que aislamientos de *Enterobacter* sp. con propiedades promotoras de crecimiento exhiben una relativa mejor capacidad de formación de biofilm. Esto indica que la conservación de los determinantes de producción de biofilm en PGPRs resulta favorable para las etapas de establecimiento y colonización del rizoplaneo vegetal. Una pregunta que surge, cuya respuesta merece ser encarada, evaluaría el rol de síntesis de polisacáridos por las bacterias, su efecto sobre la formación de biofilm y consecuentemente sobre la interacción con la planta.

Nuestros aislamientos mostraron antagonismo contra un hongo patógeno para trigo. Si bien, este resultado y los otros sobre la caracterización de propiedades de los aislamientos no nos permiten identificar el posible mecanismo por el cual



las bacterias ejercen el antagonismo, concluimos que el resultado negativo de enzimas líticas induce a especular que el mecanismo podría resultar de la producción de compuestos antibióticos o producción de quitinasas. De cualquier manera, el resultado es auspicioso para el uso de los aislamientos en el biocontrol de enfermedades fúngicas de cultivos de interés agronómico.

En este trabajo presentamos dos líneas de evidencias para proponer que la asociación entre nuestros aislamientos y las plantas, es a través de la colonización de la rizosfera. En un conjunto de ensayos, encaramos la observación microscópica de tejidos inoculados con nuestros aislamientos en la búsqueda de imágenes sobre la colonización. Con este propósito, la utilización de marcadores reporteros incorporados a plásmidos, resultó útil para revelar la localización de las células en observaciones microscópicas de explantos vegetales.

Por otro lado, examinamos cuantitativamente el número de células asociadas al rizoplasma y/o al interior tisular, después de la inoculación con los aislamientos PGPR. Este análisis fue realizado sobre tomate y trigo. Los recuentos de bacterias en los extractos de tejido desinfectado no fueron los esperados para la localización de bacterias en la parte interna de los tejidos mientras, que en los tejidos no desinfectados se registró un número importante de células de las cepas. Esto fue interpretado como una asociación localizada en la superficie radical y sus vecindades. En conjunto, estos resultados y los de las observaciones microscópicas fueron coincidentes. Encontramos que células bacterianas fueron visualizadas dispuestas en filas sobre la superficie de la raíz de ambos cultivos, predominantemente en la unión de las células de la epidermis y en la zona de pelos radicales. En raíces y tallos desinfectados superficialmente y en cortes transversales no se detectó la presencia de las cepas. Los resultados nos dieron suficiente datos para concluir que las cepas no residen en el interior de los tejidos de trigo y tomate sino que se encuentran asociadas a la superficie de la raíz.

Se reconoce que las bacterias PGPR pueden enfrentar diferentes desafíos durante su permanencia en suelo tales como la depredación por microfauna, acción de antibióticos y enzimas líticas, y por las características intrínsecas de los suelos que afectan la capacidad para colonizar las raíces condicionando negativamente la respuesta de estimulación del crecimiento de plantas.

Nuestros ensayos usando suelo para evaluar el curso de sobrevivencia de las cepas en el curso del tiempo indicaron que logran establecerse en el suelo. Habiendo demostrado la estabilidad poblacional en suelo, el resultado es interesante porque podría extrapolarse a las condiciones naturales, con potencialidad para que interactue con el cultivo desde el momento de implantación hasta varias semanas desde su introducción en suelo.

Encontramos necesario evaluar las cepas en otros suelos con propiedades edáficas tales como pH extremo, diferentes grados de compactación, granulación y agregados, y diferentes niveles de nutrientes químicos. En este sentido, la realización de ensayos semejantes pero en suelos contrastantes en sus componentes físico-químico, validará y generalizará los resultados descritos.

Por otra parte se observaron los efectos de la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 en cultivos de interés agronómico bajo dos sistemas de crecimiento: ambiente controlado y a campo. En tomate, trigo y alfalfa cultivados en ambiente controlado, los resultados evidencian que la inoculación con las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 está asociada al aumento de diversos parámetros de crecimiento y biomasa. Estos resultados muestran ubicuidad de la propiedad PGPR de nuestros aislamientos dado que promueven el aumento de crecimiento en diversas especies vegetales.

El nivel de aumento de productividad asociado a la inoculación con nuestras cepas fue comparable a los resultantes de inocular con otras reconocidas especies bacterianas promotoras de crecimiento en ensayos a campo. Estos resultados validan los obtenidos en laboratorio. Entendemos que la robustez de los ensayos a campo está dado por la repetición de los mismos en campañas sucesivas. Observamos resultados positivos en varios de los ensayos, aunque encontramos también ocasionalmente efectos negativos sobre la productividad en algunas campañas, esta variabilidad que generalmente se encuentra en ensayos a campo realizados por otros autores y cultivares, podría ser asignado a la dependencia de la combinación de suelo y condiciones climáticas [352].

Encontramos relevante ensayar la inoculación de estos cultivos en zonas donde los suelos presenten limitación de nutrientes, variantes en materia orgánica, contenido alto de aluminio o hierro y pH extremo. Teniendo en cuenta que E.sp.2.14 y E.sp.1.24 fueron aislados de suelos de Noreste de Argentina,

con características extremas en pH y alto nivel de aluminio, sería esperable una satisfactoria respuesta en tales suelos [46].

Nuestros estudios fueron realizados en diversas especies vegetales representativas de las gramíneas, solanáceas y fabáceas, resultando en una respuesta positiva a la inoculación con nuestros aislamientos. Estos resultados son novedosos, amplían el espectro de especies vegetales sobre las cuales las cepas E.sp.2.14 y E.sp.1.24 actúan promoviendo el crecimiento. Tomados los resultados descritos, no identificamos un factor determinante de la capacidad promotora de crecimiento, podemos concluir que estas cepas actúan en la rizosfera a través de probablemente una combinación de algunas de las propiedades de promoción, por ejemplo la producción de ácido indol acético, solubilización de fósforo etc. Se propone un modelo en el cual las bacterias colonizan -atraídas por quimio-atractivos del exudado radical- ciertas zonas preferenciales de la raíz, donde la producción de fitohormonas estimula el aumento de aparato radical que permite explorar una mayor región del suelo y aumentar la capacidad de absorción de nutrientes. La capacidad de fijación de nitrógeno favorecía a las bacterias inoculadas en la sobrevivencia y competencia con la población residente.

Creemos que los resultados de los primeros capítulos de este trabajo de tesis representa un aporte significativo al conocimiento de bacterias promotoras de crecimiento, hacia la generación de una alternativa en el manejo de los cultivos de trigo, maíz y soja. Posiblemente estos resultados puedan extrapolarse a zonas del país con características similares y también a otras con características alejadas de las ensayadas. Estamos advertidos que una proyección hacia el uso comercial de estas cepas, encuentra necesario realizar ensayos pertinentes que permitan evaluar su potencial patógeno para humanos.

El estudio de las comunidades endófitas fijadoras de nitrógeno aplicando métodos independientes del cultivo en laboratorio, permite obtener una visión amplia de la diversidad de esa comunidad bacteriana, proveer información útil para desarrollar políticas dirigidas a preservar el ambiente, y aseguren la explotación sustentable de los agroecosistemas.

El estudio de la comunidad fijadora de nitrógeno comprendió el enfoque metagenómico en el cual se encaró la amplificación del gen *nifH* usando com

ADN templado al extraído de tejido desinfectado. Encontramos que la aplicación de la técnica de RFLP del gen *nifH*, nos permitió revelar diferencias en la estructura de la comunidad endofítica fijadores de nitrógeno potenciales (ADN-*nifH*) de plantas de trigo y tomate sometidas a fertilización química, inoculación con bacterias PGPR, sitio de cultivo y estado fenológico de las planta.

Los resultados obtenidos en trigo de los análisis de agrupamiento (UPGM), utilizando las matrices de Bray-Curtis, indican que el factor inoculación de bacterias PGPR no alteran los perfiles RFLP de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno, aunque los tratamientos de la localidad de Ferré tienen una menor similitud que los tratamientos de la localidad de Junín, mientras que el factor de evaluación sitio de cultivo, alteran la estructura de la comunidad, porque los tratamientos forman dos grupos y están relacionados con los sitios de cultivo (Junín-Ferré). En el PCoA, se observó que los tratamientos divergen por el sitio de muestreo (Junín y Ferré), a su vez los tratamientos de la localidad de Ferré forman dos grupos, lo que indicaría que la inoculación de las bacterias PGPR están alterando la comunidad de endófitos fijadores de nitrógeno. Mientras que en Junín los tratamientos se encuentran agrupados y esto indica que las inoculaciones de las PGPR no altera la comunidad.

En el análisis de agrupamiento, UPGM y PCoA, de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de tomate se observaron marcados cambios en la estructura de la comunidad por efectos de la siembra de los plantines en el suelo. Estos resultados revelan que una parte de la comunidad fijadora de nitrógeno del suelo tiene la capacidad de ingresar a los tejidos vegetales internos y colonizarlos. Por otra parte se puede especular que los perfiles de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de las plantas en ausencia de suelos provienen de microflora de las semillas. Se observó que los perfiles se ven afectados por la aplicación de la fertilización química al separar los tratamientos control y los tratamientos con fertilización química.

Con los datos obtenidos podemos inferir que la técnica de “*fingerprints*” RFLP-*nifH* es útil para evaluar los cambios en los perfiles de la comunidad endofítica fijadora de nitrógeno de trigo y tomate de los efectos ocasionados por sitio cultivo, inoculación de bacterias PGPR y fertilización química.

Basado en la pirosecuenciación de secuencias *nifH*, obtenidas a partir de la amplificación del gen *nifH* de la comunidad endofítica de tomate y trigo encaramos la tarea de identificar a los grupos taxonómicos candidatos potenciales en la fijación de N<sub>2</sub>.

Se analizó en trigo el efecto de la inoculación de las bacterias PGPR donde se observó que la diversidad diazotrófica y la riqueza no son afectadas por inoculación de las bacterias PGPR. Por el contrario el sitio de cultivo tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la riqueza, pero no sobre la diversidad.

Estos datos revelan que la diversidad y la riqueza no son afectadas por la inoculación de las bacterias PGPR, mientras que el sitio cultivo afecta la riqueza de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno.

Encontramos diferentes grupos taxonómicos que colonizan los tejidos internos de trigo, resultando interesante detectar la presencia de los filotipos *nifH* relacionados filogenéticamente Alfacaproteobacteria, Firmicutes Delta-Gammaproteobacteria, cyanobacterias y un grupo de bacterias no cultivables. Dentro de estos grupos se encontró que los filotipos más abundantes están relacionados a los géneros: Rhizobiales, Clostridiales, Desulfovibrionales, Bacillales y Nostocales.

Por otro lado, se observó que los filotipos Clostridiales, Desulfovibrionales son propios de la localidad de Ferré y estos filotipos alternan su abundancia con la inoculación con las cepas PGPR. En la localidad de Junín se encontró el orden *Nostocales* como propio de esa localidad y la inoculación con las bacterias PGPR no altera su abundancia, mientras que se comparten los orden Rhizobiales y géneros *Paenibacillus* entre las localidades. Los filotipos encontrados han sido reportados como bacterias que se encuentran predominantes tanto como saprófitos del suelo o como endofíticas, sustentando la propuesta que el suelo es el principal reservorio de las bacterias endófitas.

Los datos de pirosecuenciación del gen *nifH* de la comunidad de tomate mostraron aumento significativo de la diversidad cuando las plantas fueron transferidas a suelos, lo que estaría revelando el gran aporte de las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo. Este resultado es interesante y novedoso porque demuestra que la población endofítica es dinámica en el tiempo, variando y

modificándose desde su implantación en suelo. Por otra parte, se observó que la fertilización química tiene un efecto negativo sobre la diversidad de la comunidad endofítica diazotrófica de tomate, mostrando la sensibilidad de la misma a factores exógenos al ambiente.

La transferencia de los plantines a suelo no altera el indicador de riqueza, aunque la fertilización química y el estado fenológico se encontraron asociados a variaciones de la riqueza, aumentando de manera significativa. Por lo que podemos inferir que la fertilización química y estado fenológico de la plantas facilitan la colonización de los tejidos internos de algunos grupos bacterianos. Por ejemplo, en el estadio de plantines, previo a la transferencia al suelo encontramos los grupos taxonómicos predominantes Alfaproteobacteria y Deltaproteobacteria. Cuando estos plantines se transfieren a suelo el grupo de las Deltaproteobacteria aparece reducido a una mínima expresión, contrariamente aparece el grupo Gammaproteobacterias. Además hay un aumento del grupo de las Alfaproteobacterias. En este sentido Yang *et al.* [334] encontraron diferencias significativas en la composición del microbioma de endófitos de cinco cultivares de cebada crecidas en condiciones de asepsia y en plántulas cultivadas en suelo no estéril, lo cual les permitió concluir que el suelo está asociado a modificaciones de estructura de la comunidad endofítica que se encuentra en las semillas, particularmente sobre los grupos taxonómicos Enterobacteriaceae y Paenibacillaceae, los cuales disminuyeron su abundancia en plantas crecidas en suelo, mientras que los grupos taxonómicos Actinobacteriaceae y Rhizobiaceae se vieron favorecidos aumentando su abundancia. En plantas sin fertilizar y plantas fertilizadas, los grupos taxonómicos Gama, Firmicutes, Delta son afectados negativamente por la fertilización química, mientras que el grupo de las Alfaproteobacteria y Cyanobacteria aumenta su abundancia. Cómo la estructura poblacional es modificada por efectores ambientales es un aspecto de interés para avanzar en nuestro conocimiento sobre endófitos.

Dentro de los grupos más abundantes encontramos un grupo de bacterias no cultivables que representa el 9,6% de toda la base de datos y no están reportadas como endófitas de tomate. Este grupo de bacterias no cultivables aparece después de la transferencia a suelos, lo que demuestra una interacción entre población del suelo y la planta.

Detectamos un grupo de bacterias relacionadas filogenéticamente a patógenos de plantas, el cual no correspondería ser asignado a bacterias endofíticas, o alternativamente la asignación filogenéticamente de este grupo es imprecisa y requiere revisión.

Encontramos interesante revelar una población endófito con un alto grado de diversidad, sugiriendo que el tamaño de la población endófito es relativamente grande. Los resultados conlleva a proponer y extender los estudios con preguntas más precisas sobre algunos grupos específicos, por ejemplo los relacionados con microorganismos no cultivados y con los microorganismos que residen en las semillas tales como los emparentados con *Geobacter sp.*

Este trabajo documenta y demuestra los efectos de la inoculación de bacterias PGPR, localización geográfica del cultivo, y fertilización química sobre la diversidad de comunidades diazotroficas e identifica asociaciones con algunos grupos taxonómicos. Esto abre nuevas avenidas para investigaciones sobre la biología de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en ambientes específicos. Aspectos relacionados con los procesos de entrada y colonización de los tejidos internos de la planta continúan siendo interrogantes con respuestas parciales. Resulta esencial aumentar el número de muestras analizadas, y extender estos análisis a otras especie vegetales para disponer una visión amplia que permita confirmar la ocurrencia de ciertos filotipos *nifH* de particular interés. Concluimos que las características edafoclimáticas, fertilización química afectan significativamente la estructura de la comunidad fijadora de nitrógeno. Además, encontramos que la distribución de algunos grupos filogenéticos se encuentran asociados a características particulares del sitio cultivo y la fertilización química, lo cual representa una característica potencialmente útil para su uso futuro como marcador sensible a los cambios ambientales.

# Material Suplementario



**Tabla S1.** Rendimiento y pureza de ADN del tejido de trigo y tomate. Las mediciones se realizaron con el espectrofotómetro Nanodrop.

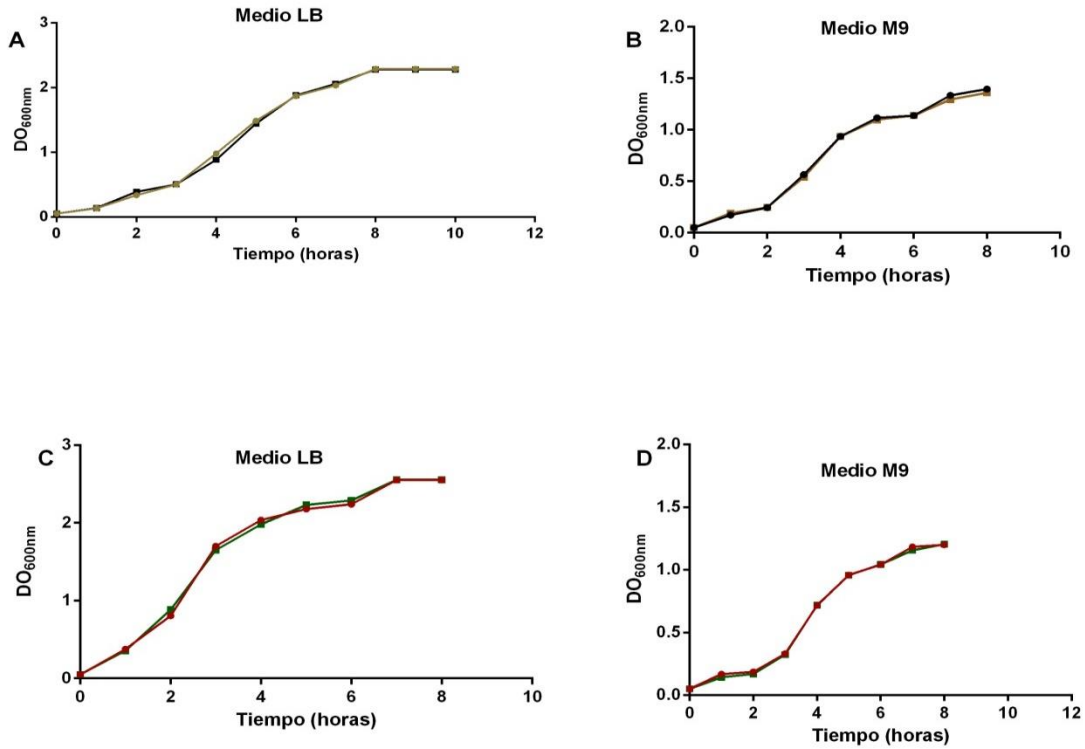
| <b>Abreviatura</b> | <b>Rendimiento<br/>(DNA ng/ul )</b> | <b>A260/280</b> | <b>A260/230</b> |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| JC                 | 50                                  | 2,1             | 1,6             |
| Jl_co              | 56,6                                | 1,9             | 0,9             |
| FC                 | 25                                  | 1,9             | 0,5             |
| Fl_co              | 31,5                                | 2,2             | 1,1             |
| 1-ant_1            | 31,5                                | 2               | 1,6             |
| 2-ant_1            | 45,5                                | 1,8             | 1,8             |
| 1-cont_2           | 25                                  | 1,9             | 0,9             |
| 2-cont_2           | 31,5                                | 1,9             | 1,1             |
| 1-fert_2           | 56                                  | 2,1             | 1,6             |
| 2-fert_2           | 63,8                                | 1,9             | 0,9             |
| 1-cont_3           | 50                                  | 1,9             | 0,5             |
| 2-cont_3           | 56,6                                | 2               | 1,6             |
| 1-fert_3           | 32,1                                | 1,8             | 1,8             |
| 2-fert_3           | 66                                  | 2,1             | 1,6             |

**Tabla S2.** Matriz de RFLP-*nifH* de la comunidad endófito de trigo. La matriz comprende la sumatoria de la matriz obtenida a partir con la endonucleasa *HaeIII* y *MspI*.

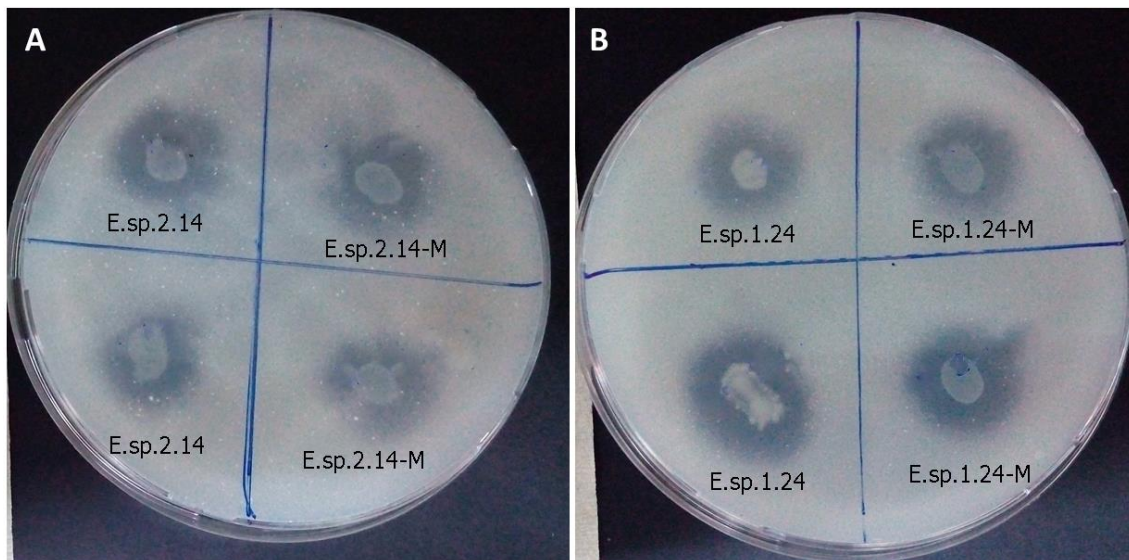
| JC | FC | Jl_co | Fl_co |
|----|----|-------|-------|
| 1  | 2  | 1     | 2     |
| 0  | 2  | 0     | 1     |
| 2  | 0  | 2     | 1     |
| 1  | 0  | 0     | 2     |
| 0  | 2  | 0     | 0     |
| 1  | 0  | 2     | 1     |
| 0  | 1  | 0     | 2     |
| 1  | 0  | 1     | 0     |
| 0  | 1  | 0     | 1     |
| 0  | 1  | 0     | 0     |
| 0  | 0  | 0     | 1     |
| 0  | 0  | 0     | 1     |

**Tabla S3.** Matriz de RFLP-*nifH* de la comunidad endófito de tomate. La matriz comprende la sumatoria de la matriz obtenida a partir con la endonucleasa *HaeIII* y *MspI*

| 1-ant_1 | 2-ant_1 | 1-cont_2 | 2-cont_2 | 1-fert_2 | 2-fert_2 | 1-cont_3 | 2-cont_3 | 1-fert_3 | 2-fert_3 |
|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0       | 0       | 1        | 4        | 3        | 1        | 0        | 1        | 2        | 2        |
| 4       | 2       | 3        | 1        | 1        | 3        | 1        | 3        | 1        | 1        |
| 0       | 0       | 0        | 0        | 0        | 1        | 3        | 0        | 1        | 1        |
| 1       | 1       | 2        | 3        | 1        | 3        | 2        | 2        | 0        | 0        |
| 1       | 0       | 0        | 0        | 2        | 1        | 0        | 2        | 1        | 3        |
| 1       | 1       | 2        | 2        | 1        | 1        | 2        | 1        | 3        | 0        |
| 1       | 1       | 2        | 0        | 1        | 3        | 0        | 0        | 1        | 1        |
| 1       | 1       | 0        | 1        | 1        | 0        | 1        | 2        | 1        | 1        |
| 1       | 1       | 2        | 2        | 0        | 0        | 1        | 1        | 0        | 0        |
| 2       | 2       | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        | 0        | 1        | 1        |
| 1       | 1       | 2        | 1        | 3        | 2        | 0        | 2        | 0        | 1        |
| 0       | 0       | 1        | 2        | 1        | 2        | 0        | 0        | 1        | 1        |
| 0       | 1       | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 1        | 3        | 3        |
| 1       | 1       | 1        | 1        | 0        | 1        | 0        | 0        | 2        | 2        |



**Figura S1. Curvas de crecimiento cepas transformadas y cepas silvestre.** Panel **A** medio de cultivo LB y cepas *E.sp.2.14* (curva color café) y *E.sp.2.14-M* (Curva color negro), en panel **B** idéntico a panel A con medio mínimo M9, en paneles **C** y **D** idéntico a A-B con las cepas *E.sp.1.24* (Curva color rojo) y *E.sp.1.24-M* (curva color verde).



**Figura S2. Actividad solubilizadora de fosfato de las cepas *E. sp. 2.14* (A) y *E. sp. 1.24* (B) y sus mutantes.** En **A-B**: Se muestra la actividad solubilizadora como halos claros (zona traslucida) de las cepas salvajes y cepas marcadas con el gen GFP.

**Tabla S4.** Actividad solubilizadora de fosfatos en medio NBRIP con las cepas E. sp. 2.14, E. sp. 1.24 y sus variantes isogénicas.

| Cepas       | IS (mm)* |       |       |       |        |
|-------------|----------|-------|-------|-------|--------|
|             | Día 2    | Día 4 | Día 6 | Día 8 | Día 10 |
| E.sp.2,14   | 1,30     | 1,71  | 2,00  | 2,11  | 2,25   |
| E.sp.2.14-M | 1,33     | 1,66  | 2,03  | 2,09  | 2,03   |
| E.sp.1.24   | 0,97     | 1,73  | 2,19  | 2,07  | 2,09   |
| E.sp.1.24M  | 0,88     | 1,72  | 2,18  | 2,08  | 2,08   |

\*el índice de solubilización (IS) fue calculado como la diferencia entre diámetro del halo de solubilización y el diámetro de la colonia.

**Tabla S5.** Evaluación de parámetros fisiológico en ensayos de trigo inoculados con las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en campo de Ferré.

| Tratamiento             | Número  |                     |                    | Pesos frescos (g)   |                   | Peso seco (g)      |                  |
|-------------------------|---------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|
|                         | Plantas | Espigas             | Macollos           | Macollos            | Espigas           | Macollos           | Espigas          |
| Control sin inoculación | 291     | 403,6 <sub>b</sub>  | 646,7 <sub>a</sub> | 464, 5 <sub>a</sub> | 1705 <sub>a</sub> | 112 <sub>a</sub>   | 654 <sub>a</sub> |
| <b>Inoculación:</b>     |         |                     |                    |                     |                   |                    |                  |
| E. sp. 1.24             | 317, 7  | 439,3 <sub>b</sub>  | 622,7 <sub>a</sub> | 417, 9 <sub>a</sub> | 1758 <sub>a</sub> | 92 <sub>a</sub>    | 631 <sub>a</sub> |
| E. sp. 1.24+E. sp. 2.14 | 307, 7  | 423,6 <sub>b</sub>  | 636,0 <sub>a</sub> | 464, 9 <sub>a</sub> | 1728 <sub>a</sub> | 117 <sub>a</sub>   | 654 <sub>a</sub> |
| E.sp.2.14               | 302, 7  | 277, 3 <sub>a</sub> | 973,3 <sub>b</sub> | 628 <sub>b</sub>    | 1743 <sub>a</sub> | 160,8 <sub>c</sub> | 635 <sub>a</sub> |
| Rizofos                 | 305, 3  | 421,5 <sub>b</sub>  | 704,8 <sub>b</sub> | 471, 6 <sub>a</sub> | 1758 <sub>a</sub> | 122,2 <sub>b</sub> | 545 <sub>a</sub> |

Los subíndices (a, b y c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.01$ ) aplicando el test de Tukey y (a, a) sin significancia estadística.

**Tabla S6.** Evaluación de parámetros fisiológico en ensayos de trigo inoculados con las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en campo de Junín.

| Tratamiento             | Número  |         |          | Peso fresco (g) |         | Peso seco (g) |         |
|-------------------------|---------|---------|----------|-----------------|---------|---------------|---------|
|                         | Plantas | Espigas | macollos | Macollos        | Espigas | Macollos      | Espigas |
| Control sin inoculación | 308,9   | 411,1   | 963,4    | 375             | 2066,7  | 111,2         | 620     |
| <b>Inoculación:</b>     |         |         |          |                 |         |               |         |
| E. sp. 1.24             | 306,2   | 406,2   | 930,7    | 464,7           | 1916    | 109,6         | 684     |
| E. sp. 1.24+E. sp. 2.14 | 307,6   | 404,9   | 968,7    | 438,9           | 1832    | 112           | 634     |
| E.sp. 2.14              | 317,8   | 419,1   | 948      | 429,8           | 2057,3  | 108,4         | 796     |
| Rizofos                 | 306,7   | 432,9   | 906,7    | 398,3           | 1970,7  | 86,6          | 644     |

**Tabla S7.** Evaluación de parámetros fisiológico en ensayos de trigo inoculados con las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en campo de Pergamino.

| Tratamiento             | Número  |         |          | Peso fresco (g) |          | Peso seco (g) |          |
|-------------------------|---------|---------|----------|-----------------|----------|---------------|----------|
|                         | Plantas | Espigas | Macollos | Macollos        | Macollos | Macollos      | Macollos |
| Control sin inoculación | 298,7   | 523,1   | 661,1    | 434,7           |          |               | 80,8     |
| <b>Inoculación:</b>     |         |         |          |                 |          |               |          |
| E. sp. 1.24             | 304     | 526,7   | 709,8    | 497,3           |          |               | 86       |
| E. sp. 1.24+E. sp. 2.14 | 300     | 544     | 661,3    | 489,3           |          |               | 94,4     |
| E.sp.2.14               | 294,2   | 496,4   | 659,3    | 400             |          |               | 65,2     |
| Rizofos                 | 296,9   | 520,4   | 666,9    | 484             |          |               | 83,2     |

**Tabla S8.** Evaluación de parámetros fisiológicos de maíz inoculado con las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en campo localidad de Ferre.

| Tratamiento                    | Número  |         | Peso fresco (g) |      | Peso seco (g) |      |
|--------------------------------|---------|---------|-----------------|------|---------------|------|
|                                | Plantas | Espigas | Parte aérea     | Raíz | Parte Aéreo   | Raíz |
| Control sin inoculación        | 8,3     | 7,6     | 50,8            | 9,4  | 8,7           | 4,2  |
| <b>Inoculación:</b>            |         |         |                 |      |               |      |
| E. sp. E. sp. 2.14             | 8,6     | 7,5     | 50,1            | 9    | 8,6           | 4,6  |
| E. sp. 1.24                    | 8,8     | 8,2     | 51,9            | 8,1  | 8,4           | 4,1  |
| E. sp. 1.24+E. sp. E. sp. 2.14 | 9,2     | 8,4     | 47,3            | 8,61 | 6,9           | 3,5  |
| Rizofos                        | 8,3     | 7,9     | 47,3            | 9,1  | 9             | 5,3  |

**Tabla S9.** Evaluación de parámetros fisiológicos de maíz inoculado con las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 localidad de Junín.

| Tratamiento                    | Número      |             | Peso fresco (g) |      | Peso seco (g) |      |
|--------------------------------|-------------|-------------|-----------------|------|---------------|------|
|                                | Plantas (m) | Espigas (m) | parte aérea     | Raíz | Parte aérea   | Raíz |
| Control sin inoculación        | 9,78        | 8,2         | 84,6            | 11,2 | 12,4          | 4,9  |
| <b>Inoculación:</b>            |             |             |                 |      |               |      |
| E. sp. E. sp. 2.14             | 8,56        | 8           | 91,6            | 10,7 | 13,3          | 5,5  |
| E. sp. 1.24                    | 9,33        | 9           | 67,8            | 11,8 | 11,3          | 4,8  |
| E. sp. 1.24+E. sp. E. sp. 2.14 | 9           | 8,2         | 78,5            | 12   | 11,9          | 5,1  |
| Rizofos                        | 8,8         | 8,4         | 77,6            | 10,2 | 13,4          | 5,9  |

**Tabla S10.** Evaluación de parámetros fisiológicos de maíz inoculado con las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 localidad de Pergamino.

| Tratamientos            | Número  |         |
|-------------------------|---------|---------|
|                         | Plantas | Espigas |
| Control sin inoculación | 9,2     | 7,9     |
| <b>Inoculación:</b>     |         |         |
| E. sp. E. sp. 2.14      | 9,2     | 8,3     |
| E. sp. 1.24             | 9,2     | 8,3     |
| E. sp. 1.24+E. sp. 2.14 | 8,8     | 8,5     |
| Rizofos                 | 9,2     | 8,1     |

Las abreviaturas: control sin inoculación; tratamiento inoculado con: cepa E. sp. E. sp. 2.14, E. sp. 1.24, Co-inoculación de cepa E. sp. 2.14+E. sp. 1.24 y Rizofos inoculante comercial base de *Pseudomonas fluorescens*.

**Tabla S11.** Evaluación de parámetros fisiológico de inoculación de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en soja a campo localidad de Ferre.

| Tratamiento                 | Nº de plantas | Número de nódulos |                |                 |       | Peso seco de nódulos |                |                 |       |
|-----------------------------|---------------|-------------------|----------------|-----------------|-------|----------------------|----------------|-----------------|-------|
|                             |               | Corona            | Raíz Principal | Raíz Secundaria | Total | Corona               | Raíz principal | Raíz secundaria | Total |
| Control sin inoculación     | 32, 8a        | 0, 2a             | 4,4            | 15,5            | 39,9  | 0,01                 | 0,03           | 0,08            | 0,2   |
| <b>Inoculación:</b>         |               |                   |                |                 |       |                      |                |                 |       |
| E. sp. 1.24 + 214 + Rizoliq | 33, 6a        | 0, 2a             | 5,6            | 13,2            | 37,7  | 0,02                 | 0,04           | 0,06            | 0,2   |
| E. sp. E. sp. 2.14          | 34,5b         | 0,5b              | 4              | 10,2            | 29,2  | 0,006                | 0,04           | 0,05            | 0,1   |
| E. sp. 1.24                 | 33, 3a        | 0,5b              | 5,4            | 13,6            | 39    | 0,002                | 0,03           | 0,06            | 0,1   |
| E. sp. 1.24 + 214           | 32, 8a        | 0, 3a             | 5,7            | 14,9            | 41,5  | 0,003                | 0,04           | 0,06            | 0,2   |
| E. sp. 1.24 + Rizoliq       | 32a           | 0, 2a             | 4,5            | 13,5            | 36,2  | 0,003                | 0,04           | 0,06            | 0,2   |
| E. sp. 2.14 + Rizoliq       | 35,4c         | 0,5b              | 6,4            | 10,4            | 34,6  | 0,018                | 0,05           | 0,06            | 0,1   |
| Rizoliq                     | 31, 9a        | 0, 3a             | 4,8            | 11,1            | 32,4  | 0,007                | 0,03           | 0,06            | 0,2   |

Los subíndices a, b indican la significancia estadística y a, a sin significancias estadística. Se aplicó análisis de varianza contrastando las medias con el test Tukey ( $p > 0.01$ ).

**Tabla S12.** Evaluación de parámetros fisiológico de inoculación de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en soja a campo localidad de Junín.

| Tratamiento                 | N° de plantas | Número de nódulos |                |                 |       | Peso seco de los nódulos |                |                 |       |
|-----------------------------|---------------|-------------------|----------------|-----------------|-------|--------------------------|----------------|-----------------|-------|
|                             |               | Corona            | Raíz Principal | Raíz Secundaria | Total | Corona                   | Raíz principal | Raíz secundaria | Total |
| Control sin inoculación     | 33,8          | 0,1 a             | 1,6            | 3,8             | 16,1  | 0,005                    | 0,01           | 0,03            | 0,11  |
| E. sp. 1.24 + 214 + Rizoliq | 34            | 0,16b             | 1,1            | 2,4             | 10,7  | 0,003                    | 0,01           | 0,02            | 0,12  |
| E. sp. E. sp. 2.14          | 32,7          | 0,27b             | 1              | 2,9             | 12,3  | 0,004                    | 0,01           | 0,02            | 0,11  |
| E. sp. 1.24                 | 33,8          | 0,9 a             | 1,6            | 4,2             | 17,1  | 0,004                    | 0,01           | 0,03            | 0,09  |
| E. sp. 1.24 + 214           | 34,1          | 0, 1a             | 2,2            | 5,2             | 21,9  | 0,002                    | 0,01           | 0,03            | 0,11  |
| E. sp. 1.24 + Rizoliq       | 34,7          | 0, 1a             | 1,9            | 5               | 20,5  | 0,002                    | 0,01           | 0,03            | 0,11  |
| E. sp. 2.14 + Rizoliq       | 34            | 0, 1a             | 1,2            | 2,6             | 10,9  | 0,002                    | 0,01           | 0,02            | 0,12  |
| Rizoliq                     | 32,8          | 0, 1a             | 2,1            | 4,1             | 18,6  | 0,007                    | 0,01           | 0,02            | 0,14  |

Los subíndices a, b indican la significancia estadística y a, a sin significancias estadística. Se aplicó análisis de varianza contrastando las medias con el test Tukey ( $p > 0.01$ ).



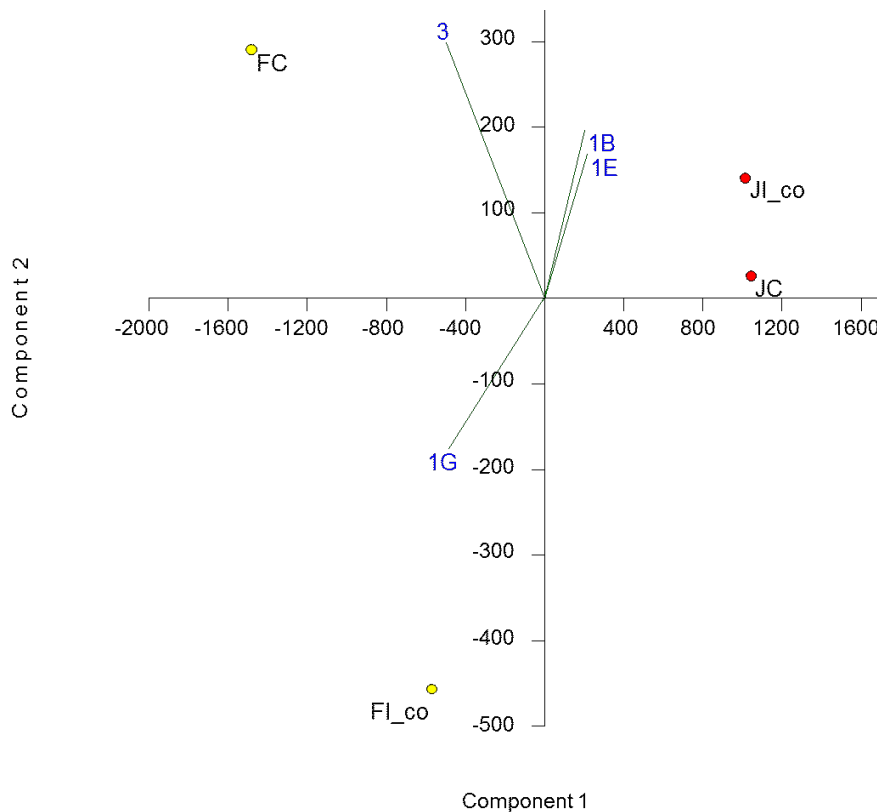
**Tabla S13.** Evaluación de parámetros fisiológico de inoculación de las cepas E. sp. 2.14 y E. sp. 1.24 en soja a campo localidad de Pergamino.

| Tratamiento                 | N° plantas | Número de nódulos |                |                 |       | Peso seco de los nódulos |                |                 |       |
|-----------------------------|------------|-------------------|----------------|-----------------|-------|--------------------------|----------------|-----------------|-------|
|                             |            | Corona            | Raíz Principal | Raíz Secundaria | Total | Corona                   | Raíz principal | raíz secundaria | Total |
| Control sin inoculación     | 36, 7a     | 2, 5a             | 6, 9a          | 20,3b           | 29,7  | 0,0 a                    | 0,1            | 0,08            | 0,1   |
| <b>Inoculación:</b>         |            |                   |                |                 |       |                          |                |                 |       |
| E. sp. 1.24 + 214 + Rizoliq | 34, 7a     | 0, 5a             | 13b            | 21,2b           | 34,7  | 0,0 a                    | 0,1            | 0,07            | 0,1   |
| E. sp. E. sp. 2.14          | 38, 7a     | 1, 1a             | 8, 2a          | 18, 5a          | 27,8  | 0,0 a                    | 0,1            | 0,14            | 0,2   |
| E. sp. 1.24                 | 36a        | 0, 5a             | 11,9b          | 12, 4a          | 24,8  | 0,0 a                    | 0,1            | 0,08            | 0,2   |
| E. sp. 1.24 + 214           | 34a        | 0, 6a             | 11,2b          | 13, 4a          | 25,2  | 0,01b                    | 0,1            | 0,07            | 0,1   |
| E. sp. 1.24 + Rizoliq       | 37, 3a     | 0,9b              | 8, 8a          | 16, 5a          | 26,2  | 0, 0a                    | 0,1            | 0,08            | 0,1   |
| E. sp. 2.14 + Rizoliq       | 35, 3a     | 5, 6a             | 10,7b          | 15, 3a          | 31,6  | 0,02b                    | 0,1            | 0,1             | 0,2   |
| Rizoliq                     | 34,6b      | 1,2b              | 15,6b          | 13, 2a          | 30    | 0, 0a                    | 0,1            | 0,07            | 0,1   |

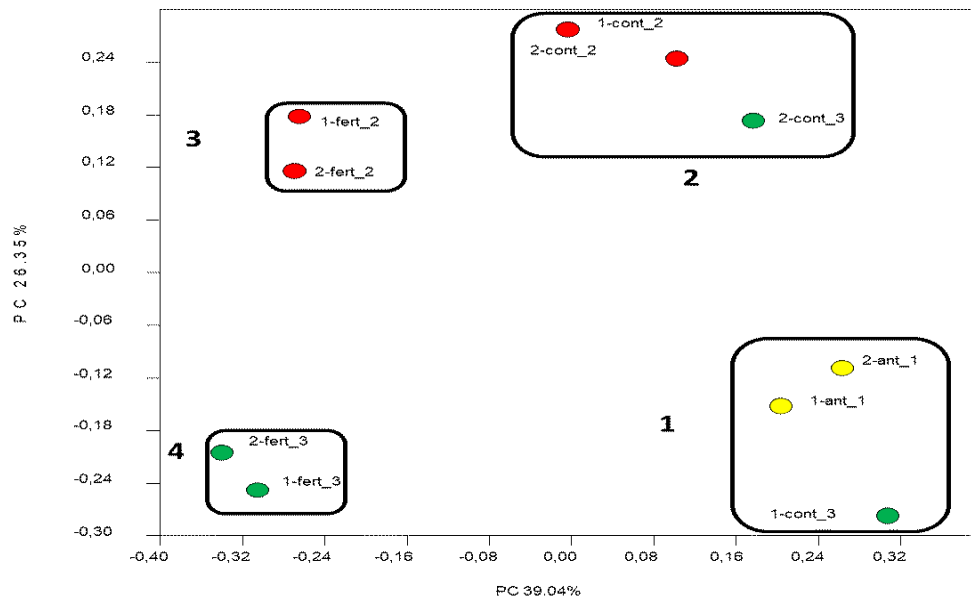
Los subíndices a, b indican la significancia estadística y a, a sin significancias estadística. Se aplicó análisis de varianza contrastando las medias con el test Tukey ( $p>0.01$ ).

**Tablas S14.** Análisis químico los suelos de las localidades de Junín y Ferré campaña de siembra 2013-214

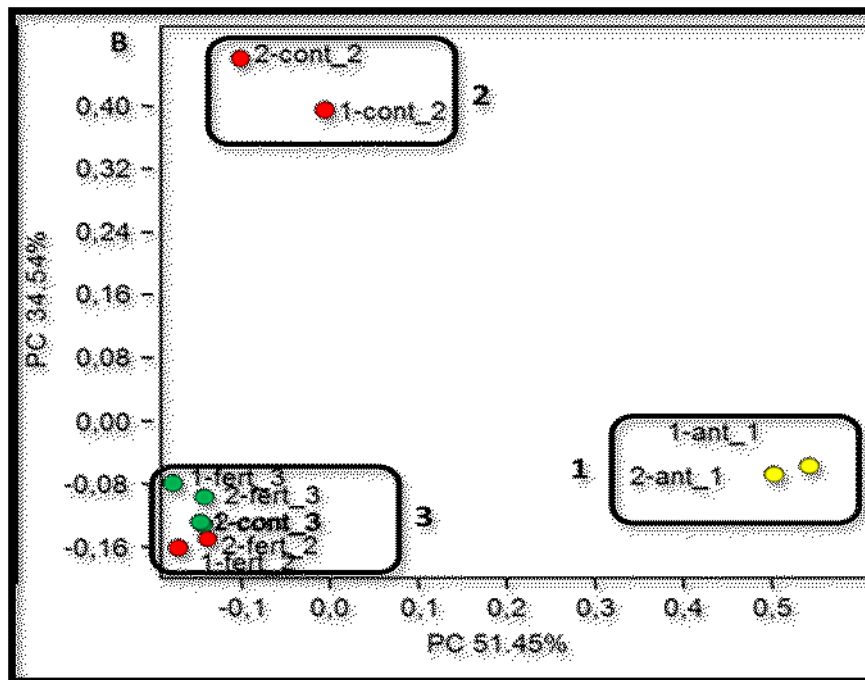
|       | pH  | NO <sub>3</sub> | P-Bray | N-Org | N-Total | Carbono |
|-------|-----|-----------------|--------|-------|---------|---------|
| Junín | 5,5 | 6,6             | 2      | 2,5   | 0,14    | 1,4     |
| Ferré | 5,7 | 6,3             | 21,8   | 3     | 0,14    | 1,7     |



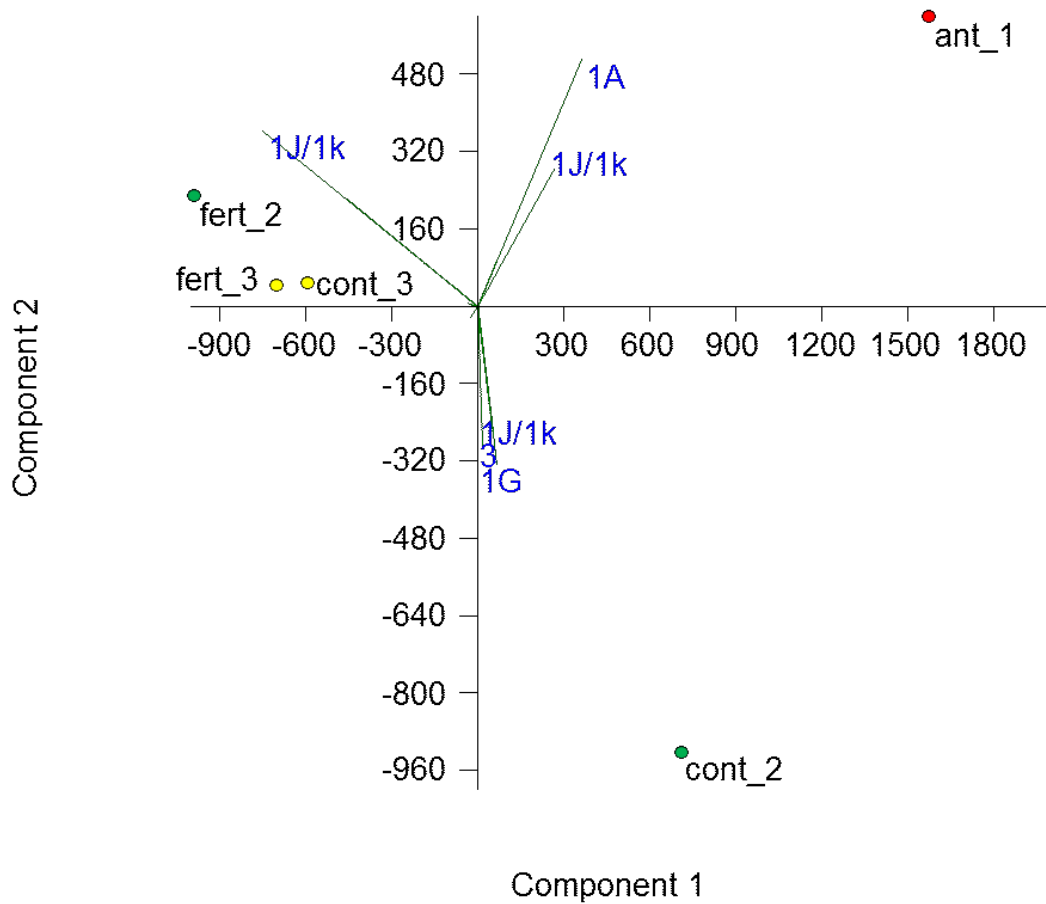
**Figura S3.** Representación *biplot* del análisis de componentes principales basado en la abundancia de los *subclusters nifH*. Solo se muestran los *subclusters* mayor abundancia en la base de datos ADN-*nifH* de endófitos trigo. Los círculos coloreados en amarillo corresponden a los tratamientos localidad Ferré y en rojo a los tratamientos de las localidad Junín.



**Figura S3.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) calculados a partir de las matrices de RFLP-nifH tomate y usando la distancia Bray-Curtis. El círculo color amarillo, rojo y verde indica el primer muestreo, segundo muestreo, tercer muestreo respectivamente y los recuadros de color negro indican los grupos formados identificados con 1, 2 3 y 4 respectivamente.



**Figura S4.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) calculados a partir de la abundancia de los OTUs usando Bray Curtis. Los círculos coloreados en amarillo, rojo y verde pertenecen al primer, segundo y tercer muestreo respectivamente. Las abreviaturas cont, fert y ant indican tratamientos control, con fertilización química y antes de transferir al suelo, respectivamente. Los números antes y después de la abreviatura indican la réplica y el tiempo de muestreo, respectivamente



**Figura S 4. Representación *biplot* del análisis de componentes principales basado en la abundancia de los *subclusters nifH*.** Solo se muestran los *subclusters* con mayor abundancia en la base de datos ADN-*nifH* de endófitos tomate. Los círculos coloreados rojo representan al primer muestreo, verde representan el segundo muestreo y el color amarillo presentan al tercer muestreo.

# **Referencias Bibliográficas**

- [1] *Biblioteca de agricultura*. Idea Books, 1998.
- [2] M. Altieri, “La Agricultura Moderna: Impactos Ecológicos y la Posibilidad de una Verdadera Agricultura sustentable.”
- [3] La Bolsa de Cereales de Buenos Aires, “Estado de cultivos Argentina,” 2018. [Online]. Available: <http://www.granar.com.ar/nota.asp?cid=38868>. [Accessed: 30-Apr-2018].
- [4] ministerio de industria, “Panorama de la agricultura argentina,” 2018. [Online]. Available: <https://surdelsur.com/es/agricultura-argentina/>. [Accessed: 30-Apr-2018].
- [5] C. O. del Académico de Número Ing Agr Héctor Arriaga, “El cultivo de los cereales en la República Argentina, origen y evolución.”
- [6] Carlos Alberto Ghida Daza, “Es rentable el cultivo de trigo en la región central del país,” *Blog MERCOSUR.COM*, 2017. [Online]. Available: <https://blog.mercosur.com/rentabilidad-cultivo-trigo-region-centro/>. [Accessed: 30-Apr-2018].
- [7] Bolsa de creales, “Bolsa de Cereales,” 2018. [Online]. Available: <http://www.bolsadecereales.com/pos-indices>. [Accessed: 30-Apr-2018].
- [8] L. A. R. Mena, K. B. V. Vidales, and J. O. G. García, “South of the Border: The Beer and Brewing Industry in South America,” in *Brewing, Beer and Pubs*, London: Palgrave Macmillan UK, 2016, pp. 162–181.
- [9] E. H. Satorre *et al.*, *Producción de granos : bases funcionales para su manejo /*. 2003.
- [10] “fyo, portal líder en comercialización agropecuaria, lanzó su nuevo sitio web | Agrofy News.” [Online]. Available: <https://news.agrofy.com.ar/noticia/128045/fyo-portal-lider-en-comercializacion-agropecuaria-lanzo-su-nuevo-sitio-web>. [Accessed: 01-Dec-2017].
- [11] Bolsa de comercio de rosario, “estimación de la producción,” *Estimación Mensual Nacional Nro ESP099*, 2018. [Online]. Available: <https://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx>. [Accessed: 30-Apr-2018].
- [12] Mercado Central, “Producción de hortalizas,” 2017. [Online]. Available: <http://www.mercadocentral.gob.ar/>. [Accessed: 30-Apr-2018].
- [13] “full-text.”
- [14] “Alianza SIDALC.” [Online]. Available: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=inta2.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=064950>. [Accessed: 01-Dec-2017].
- [15] H. Noale, “Tomate para industria: revisión bibliográfica y selección de variedades en el valle medio de Río Negro,” 2016.
- [16] A. Quispel, “A search for signals in endophytic microorganisms,” *Molecular signals in plant-microbe communications*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 471–490, 1992.
- [17] U. Albino, D. P. Saridakis, M. C. Ferreira, M. Hungria, P. Vinuesa, and G. Andrade, “High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil,” *Plant Soil*, vol. 287, no. 1–2, pp. 199–207, 2006.
- [18] S. P. Chowdhury, M. Schmid, A. Hartmann, and A. K. Tripathi, “Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus syndicus*, a perennial grass of Thar Desert, India,” *Microb. Ecol.*, vol. 54, no. 1, pp. 82–90, 2007.
- [19] M. Sajjad MirzaEmail authorWaseem AhmadFarooq LatifJacqueline HauratRene BallyPhilippe NormandKausar A. Malik, “Isolation, partial characterization, and

- the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro,” *Plant Soil*, vol. 237, no. 1, pp. 47–54, 2001.
- [20] R. Muthukumrasamy, “Diazotrophic associations in sugarcane cultivation in South India,” vol. 76, pp. 171–178, 1999.
- [21] R. Deaker and I. R. Kennedy, “Improved potential for nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7-S associated with wheat nifH expression as a function of oxygen pressure,” *Acta Biotechnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 3–17, 2001.
- [22] B. Lugtenberg and F. Kamilova, “Plant-growth-promoting rhizobacteria,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 63, pp. 541–56, Jan. 2009.
- [23] B. Reinhold-Hurek and T. Hurek, “Living inside plants: bacterial endophytes,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 435–43, Aug. 2011.
- [24] B. R. Glick, “Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications,” *Scientifica (Cairo)*, vol. 2012, pp. 1–15, Oct. 2012.
- [25] J. W. Kloepper, C.-M. Ryu, and S. Zhang, “Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp.,” *Phytopathology*, vol. 94, no. 11, pp. 1259–1266, Nov. 2004.
- [26] P. N. Bhattacharyya and D. K. Jha, “Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1327–1350, Apr. 2012.
- [27] C. Vargas *et al.*, “Signaling Pathways Mediating the Association between Sugarcane and Endophytic Diazotrophic Bacteria: A Genomic Approach,” *Symbiosis*, vol. 35, pp. 159–180, 2003.
- [28] M. Sevilla, C. Kennedy, and E. Triplett, “Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane,” in *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.*, 2000, pp. 737–760.
- [29] L. Sun, F. Qiu, X. Zhang, X. Dai, X. Dong, and W. Song, “Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis,” *Microb. Ecol.*, vol. 55, no. 3, pp. 415–24, Apr. 2008.
- [30] T. Hurek and B. Reinhold-Hurek, “*Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes,” *J. Biotechnol.*, vol. 106, no. 2–3, pp. 169–178, Dec. 2003.
- [31] E. K. James, “Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis,” *F. Crop. Res.*, vol. 65, no. 2–3, pp. 197–209, Mar. 2000.
- [32] J. Caballero-Mellado, L. Martinez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, and P. Estrada-de los Santos, “*Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 54, no. 4, pp. 1165–1172, 2004.
- [33] R. Dixon and D. Kahn, “Genetic regulation of biological nitrogen fixation,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 8, pp. 621–631, 2004.
- [34] J. M. Igual, A. Valverde, E. Cervantes, and E. Velázquez, “Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study,” *Agronomie*, vol. 21, no. 6–7, pp. 561–568, Sep. 2001.
- [35] H. Rodríguez and R. Fraga, “Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 17, no. 4–5, pp. 319–339, Oct. 1999.
- [36] B. C. Behera, H. Yadav, S. K. Singh, R. R. Mishra, D. K. Sethi, S. K. Dutta, and H. N. Thatoi, “Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India,” *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 15, no. 1, pp. 169–178, Jun. 2017.

- [37] C. Yadav and S. Pandey, "Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from Agriculture Soil of Jaipur, Rajasthan," *Int. J. Curr. Trends Sci. Technol.*, vol. 8, no. 01, pp. 20180–20191, Jan. 2018.
- [38] M. Ghorchiani, H. Etesami, and H. A. Alikhani, "Improvement of growth and yield of maize under water stress by co-inoculating an arbuscular mycorrhizal fungus and a plant growth promoting rhizobacterium together with phosphate fertilizers," *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 258, pp. 59–70, Apr. 2018.
- [39] M. S. Khan, A. Zaidi, P. A. Wani, and M. Oves, "Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils," *Environ. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–19, Feb. 2009.
- [40] N. Singh, G. Singh, N. Aggarwal, and V. Khanna, "Yield enhancement and phosphorus economy in lentil (*Lens culinaris* Medikus) with integrated use of phosphorus, *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria," *J. Plant Nutr.*, vol. 41, no. 6, pp. 737–748, Apr. 2018.
- [41] M. C. Baloglu, M. Kavas, S. Gürel, and E. Gürel, "Chapter 1 – The Use of Microorganisms for Gene Transfer and Crop Improvement," in *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, 2018, pp. 1–25.
- [42] B. Rathinasabapathi, X. Liu, Y. Cao, and L. Q. Ma, "Phosphate-Solubilizing Pseudomonads for Improving Crop Plant Nutrition and Agricultural Productivity," in *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, Elsevier, 2018, pp. 363–372.
- [43] B. Biswakarma, H. Verma, and N. C. Sarkar, "Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Yield of Transplanted Rice under Lateritic Belt of West Bengal, India," *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 3192–3204, 2018.
- [44] B. R. Glick, "Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world," *Microbiol. Res.*, vol. 169, no. 1, pp. 30–39, Jan. 2014.
- [45] M. G. Javid, A. Sorooshzadeh, F. Moradi, S. Ali, M. M. Sanavy, and I. Allahdadi, "The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants," *AJCS*, vol. 5, no. 6, pp. 726–734, 2011.
- [46] M. M. Collavino, P. A. Sansberro, L. A. Mroginski, and O. M. Aguilar, "Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth," *Biol. Fertil. Soils*, vol. 46, no. 7, pp. 727–738, Sep. 2010.
- [47] F. Cassán and M. Diaz-Zorita, "Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 103, pp. 117–130, 2016.
- [48] K. Shu, X.-D. Liu, Q. Xie, and Z.-H. He, "Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination.," *Mol. Plant*, vol. 9, no. 1, pp. 34–45, Jan. 2016.
- [49] Xiaodong Liu, Hong Zhang, Yang Zhao, Zhengyan Feng, Qun Li, Hong-Quan Yang, Sheng Luan, Jianming Li, and Zu-Hua He., "Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 38, pp. 15485–90, Sep. 2013.
- [50] A. Aeron, S. Kumar, P. Pandey, and D. K. Maheshwari, "Emerging Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agrobiolgy," in *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 1–36.
- [51] Lavenus .J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L.L., "Lateral root development in Arabidopsis:



- fifty shades of auxin,” *Trends Plant Sci.*, vol. 18, no. 8, pp. 450–458, Aug. 2013.
- [52] F. J. Gutierrez-Manero, B. Ramos-Solano, A. n Probanza, J. Mehouchi, F. R. Tadeo, and M. Talon, “The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins,” *Physiol. Plant.*, vol. 111, no. 2, pp. 206–211, Feb. 2001.
- [53] W. S. Wong, S. N. Tan, L. Ge, X. Chen, and J. W. H. Yong, “The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers,” 2015, pp. 105–158.
- [54] D. K. Maheshwari, S. Dheeman, and M. Agarwal, “Phytohormone-Producing PGPR for Sustainable Agriculture,” 2015, pp. 159–182.
- [55] F. Persello-Cartieaux *et al.*, “Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*,” *Planta*, vol. 212, no. 2, pp. 190–198, Jan. 2001.
- [56] A. Santner and M. Estelle, “Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling,” *Nature*, vol. 459, no. 7250, pp. 1071–1078, Jun. 2009.
- [57] B. R. Glick, “Using soil bacteria to facilitate phytoremediation,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 367–374, May 2010.
- [58] W. G. D. Fernando, S. Nakkeeran, and Y. Zhang, “Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases,” in *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, pp. 67–109.
- [59] R. Saha, N. Saha, R. S. Donofrio, and L. L. Bestervelt, “Microbial siderophores: a mini review,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 303–317, Mar. 2013.
- [60] S. Compant, B. Reiter, J. Nowak, A. Sessitsch, C. Clément, and E. A. Barka, “Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 4, pp. 1685–1693, 2005.
- [61] M. Chaiharn, S. Chunhaleuchanon, A. Kozo, and S. Lumyong, “Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities,” *KMITL Sci. Tech. J.*, vol. 8, no. 1.
- [62] S. Dutta, A. K. Mishra, and B. S. Dileep Kumar, “Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 452–461, 2008.
- [63] J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W. G. Miller, R. A. Sikora, and S. E. Lindow, “Endophytic Colonization of Plants by the Biocontrol Agent *Rhizobium etli* G12 in Relation to *Meloidogyne incognita* Infection,” *Phytopathology*, vol. 91, no. 4, pp. 415–422, 2001.
- [64] L. Philippot, J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, and W. H. Van Der Putten, “Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, no. 11, pp. 789–799, 2013.
- [65] N. C. Uren, “Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants,” in *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, 2007, pp. 1–21.
- [66] P. Prashar, N. Kapoor, and S. Sachdeva, “Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance,” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 13, no. 1, pp. 63–77, 2014.
- [67] P. R. Hardoim, L. S. van Overbeek, and J. D. van Elsas, “Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth,” *Trends Microbiol.*, vol. 16, no. 10, pp. 463–471, 2008.
- [68] L. Philippot, J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, and W. H. van der Putten, “Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere,” *Nat. Rev.*

- Microbiol.*, vol. 11, no. 11, pp. 789–799, Nov. 2013.
- [69] T. Rudrappa, W. J. Quinn, N. R. Stanley-Wall, and H. P. Bais, “A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots,” *Planta*, vol. 226, no. 2, pp. 283–297, 2007.
- [70] C. H. S. G. Meneses, L. F. M. Rouws, J. L. Simoes-Araujo, M. S. Vidal, and J. I. Baldani, “Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*,” *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 24, no. 12, pp. 1448–58, 2011.
- [71] C. Fuqua, M. R. Parsek, and E. P. Greenberg, “Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 35, no. 1, pp. 439–468, 2001.
- [72] P. B. Beauregard, Y. Chai, H. Vlamakis, R. Losick, and R. Kolter, “*Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 17, pp. E1621–E1630, 2013.
- [73] T. Rudrappa, M. L. Biedrzycki, and H. P. Bais, “Causes and consequences of plant-associated biofilms,” *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 64, no. 2, pp. 153–166, 2008.
- [74] B. Assmus, P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J. R. Lawrence, and A. Hartmann, “In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 3, pp. 1013–1019, 1995.
- [75] B. E. Ramey, M. Koutsoudis, S. B. Von Bodman, and C. Fuqua, “Biofilm formation in plant-microbe associations,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 7, no. 6, pp. 602–609, 2004.
- [76] S. Timmusk, N. Grantcharova, and E. G. H. Wagner, “*Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 11, pp. 7292–7300, 2005.
- [77] T. R. Turner, E. K. James, and P. S. Poole, “The plant microbiome,” *Genome Biol.*, vol. 14, no. 6, p. 209, Jun. 2013.
- [78] M. Rajkumar, N. Ae, M. N. V. Prasad, and H. Freitas, “Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 3, pp. 142–149, Mar. 2010.
- [79] J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper, “Bacterial endophytes in agricultural crops,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 43, no. 10, pp. 895–914, 1997.
- [80] S. Compant, C. Clément, and A. Sessitsch, “Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 42, no. 5, pp. 669–678, 2010.
- [81] 2 and B. Reinhold-Hurek4 A. Sessitsch, 1 P. Hardoim, 2, 3 J. Döring, 4 A. Weilharter, 1 A. Krause, 4 T. Woyke, 5 B. Mitter, 1 L. Hauberg-Lotte, 4 F. Friedrich, 4 M. Rahalkar, 4 T. Hurek, 4 A. Sarkar, 4 L. Bodrossy, 1 L. van Overbeek, 3 D. Brar, 6 J. D. van Elsas, “Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis,” *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 28, no. 1, pp. 28–36, 2012.
- [82] C. H.-F. Lau, K. van Engelen, S. Gordon, J. Renaud, and E. Topp, “novel antibiotic resistance determinants from agricultural soil exposed to antibiotics

- widely used in human medicine and animal farming.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, no. 16, pp. e00989-17, Jun. 2017.
- [83] F. Ahmad, I. Ahmad, and M. S. Khan, "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities," *Microbiol. Res.*, vol. 163, no. 2, pp. 173–181, Mar. 2008.
- [84] E. K. James *et al.*, "Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 15, no. 9, pp. 894–906, 2002.
- [85] T. L. G. Carvalho, E. Balsemao-Pires, R. M. Saraiva, P. C. G. Ferreira, and A. S. Hemerly, "Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria," *J. Exp. Bot.*, vol. 65, no. 19, pp. 5631–5642, Oct. 2014.
- [86] T. Egner, T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek, "Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 11, no. 1, pp. 71–5, Jan. 1998.
- [87] P. Prieto, E. Schilirò, M. M. Maldonado-González, R. Valderrama, J. B. Barroso-Albarracín, and J. Mercado-Blanco, "Root Hairs Play a Key Role in the Endophytic Colonization of Olive Roots by *Pseudomonas* spp. with Biocontrol Activity," *Microb. Ecol.*, vol. 62, no. 2, pp. 435–445, Aug. 2011.
- [88] P. Prieto, E. Schilirò, M. M. Maldonado-González, R. Valderrama, J. B. Barroso-Albarracín, and J. Mercado-Blanco, "Root Hairs Play a Key Role in the Endophytic Colonization of Olive Roots by *Pseudomonas* spp. with Biocontrol Activity," *Microb. Ecol.*, vol. 62, no. 2, pp. 435–445, 2011.
- [89] B. Reinhold-Hurek, T. Maes, S. Gemmer, M. Van Montagu, and T. Hurek, "An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 19, no. 2, pp. 181–188, 2006.
- [90] M. E. Hibbing, C. Fuqua, M. R. Parsek, and S. B. Peterson, "Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 15–25, Jan. 2010.
- [91] T. Hurek, B. Reinhold-Hurek, M. Van Montagu, and E. Kellenberger, "Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses," *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 7, pp. 1913–1923, 1994.
- [92] R. H. Doi, "Cellulases of Mesophilic Microorganisms," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1125, no. 1, pp. 267–279, Mar. 2008.
- [93] C. S. Burbano *et al.*, "Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce," *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 3, no. 3, pp. 383–389, Jun. 2011.
- [94] P. N. Bhattacharyya and D. K. Jha, "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1327–1350, Apr. 2012.
- [95] C. W. Bacon and I. E. Yates, "Endophytic Root Colonization by *Fusarium* Species: Histology, Plant Interactions, and Toxicity," in *Microbial Root Endophytes*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 133–152.
- [96] A. Konopka, "What is microbial community ecology?," *ISME J.*, vol. 3, no. 11, pp. 1223–1230, Nov. 2009.
- [97] Y. Dong, J. D. Glasner, F. R. Blattner, and E. W. Triplett, "Genomic Interspecies Microarray Hybridization: Rapid Discovery of Three Thousand Genes in the Maize Endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by Microarray Hybridization with

- Escherichia coli K-12 Open Reading Frames,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 4, pp. 1911–1921, 2001.
- [98] D. Nichols, “Cultivation gives context to the microbial ecologist,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 60, no. 3, pp. 351–357, Jun. 2007.
- [99] M. L. Metzker, “Sequencing technologies — the next generation,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2010.
- [100] M. Rosenblueth and E. Martínez-Romero, “Bacterial endophytes and their interactions with hosts.,” *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 19, no. 8, pp. 827–37, Aug. 2006.
- [101] L. F. M. Rouws, C. H. S. G. Meneses, H. V. Guedes, M. S. Vidal, J. I. Baldani, and S. Schwab, “Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 51, no. 3, pp. 325–330, 2010.
- [102] J. W. Kloepper, “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions,” *Phytopathology*, vol. 71, p. 642, 1981.
- [103] Y. Bashan and G. Holguin, “Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 30, no. 8–9, pp. 1225–1228, 1998.
- [104] E. Gamalero, G. Lingua, G. Berta, and P. Lemanceau, “Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria,” in *Sustainable Agriculture*, 2009, pp. 601–615.
- [105] P. Gyaneshwar, E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-hurek, and K. Jagdish, “Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens* Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*,” 2001.
- [106] J. A. McInroy and J. W. Kloepper, “Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn,” *Plant Soil*, vol. 173, 1995.
- [107] A. M. Osborn, E. R. B. Moore, and K. N. Timmis, “An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics,” *Environ. Microbiol.*, vol. 2, no. 1, pp. 39–50, Feb. 2000.
- [108] A. A. Andongma *et al.*, “Pyrosequencing reveals a shift in symbiotic bacteria populations across life stages of *Bactrocera dorsalis*,” *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015.
- [109] A. Sessitsch, G. Hardarson, W. M. De Vos, and K. J. Wilson, “Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*,” *Plant Soil*, vol. 204, no. 1, pp. 35–45, 1998.
- [110] A. Unge, R. Tombolini, L. Mølbak, and J. K. Jansson, “Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 813–821, 1999.
- [111] P. Thomas and A. C. Sekhar, “Cultivation Versus Molecular Analysis of Banana (*Musa sp.*) Shoot-Tip Tissue Reveals Enormous Diversity of Normally Uncultivable Endophytic Bacteria,” *Microb. Ecol.*, vol. 73, no. 4, pp. 885–899, May 2017.
- [112] K. Dietel, B. Beator, A. Budiharjo, B. Fan, and R. Borriss, “Bacterial Traits Involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42,” *Plant Pathol. J.*, vol. 29, no. 1, pp. 59–66, 2013.
- [113] V. Katiyar and R. Goel, “Siderophore mediated plant growth promotion at low

- temperature by mutant of fluorescent pseudomonad,” *Plant Growth Regul.*, vol. 42, no. 3, pp. 239–244, Mar. 2004.
- [114] L. Perin *et al.*, “Burkholderia silvatlantica sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, no. 8, pp. 1931–1937, Aug. 2006.
- [115] S. Compant, C. Clément, and A. Sessitsch, “Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 42, no. 5, pp. 669–678, May 2010.
- [116] M. F. Luna, J. Aprea, J. M. Crespo, and J. L. Boiardi, “Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 61, pp. 225–229, Oct. 2012.
- [117] L. Zheng, V. L. Cash, D. H. Flint, and D. R. Dean, “Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 21, pp. 13264–13272, 1998.
- [118] E. Jiménez-Vicente, J. A. Hernandez, C. Echavarri-Erasun, and L. M. Rubio, “Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase,” in *Biological Nitrogen Fixation*, vol. 1–2, 2015, pp. 75–86.
- [119] L. M. Rubio and P. W. Ludden, “Maturation of nitrogenase: A biochemical puzzle,” *Journal of Bacteriology*, vol. 187, no. 2, pp. 405–414, 2005.
- [120] P. A. Calderoli, M. M. Collavino, F. Behrends Kraemer, H. J. M. Morrás, and O. M. Aguilar, “Analysis of *nifH*-RNA reveals phylotypes related to *Geobacter* and Cyanobacteria as important functional components of the N<sub>2</sub>-fixing community depending on depth and agricultural use of soil,” *Microbiologyopen*, p. e00502, Aug. 2017.
- [121] Mónica M. Collavino, H. James, Tripp Ildiko, E. Frank María L. Vidoz Priscila A. Calderoli Mariano Donato Jonathan P. Zehr O. Mario Aguilar., “*nifH* pyrosequencing reveals the potential for location-specific soil chemistry to influence N<sub>2</sub>-fixing community dynamics,” *Environ. Microbiol.*, vol. 16, no. 10, pp. 3211–3223, Oct. 2014.
- [122] L. Ferrando and A. Fernández Scavino, “Strong shift in the diazotrophic endophytic bacterial community inhabiting rice (*Oryza sativa*) plants after flooding,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 91, no. 9, p. fiv104, Sep. 2015.
- [123] J. K. Patel and G. Archana, “Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat,” *Plant Soil*, vol. 417, no. 1–2, pp. 99–116, Aug. 2017.
- [124] J. Prakamhang, K. Minamisawa, K. Teamtaisong, N. Boonkerd, and N. Teaumroong, “The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.),” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 42, no. 2, pp. 141–149, 2009.
- [125] C. Chaintreuil *et al.*, “Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata* Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*,” 2000.
- [126] Liba CM1, Ferrara FI, Manfio GP, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA, Barbosa HR., “Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 101, no. 5, pp. 1076–1086, 2006.
- [127] B. J. Henson, L. E. Watson, and S. R. Barnum, “The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by NifD,” *J. Mol. Evol.*, vol. 58, no. 4, pp. 390–399, 2004.

- [128] R. M. Boddey, O. C. de Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. de Olivares, V. L. D. Baldani, J. Döbereiner., “Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement,” *Plant and Soil*, vol. 174, no. 1–2, pp. 195–209, 1995.
- [129] L. Zhang, T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek, “A nifH-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms,” in *Microbial Ecology*, 2007, vol. 53, no. 3, pp. 456–470.
- [130] A. Sessitsch, B. Reiter, and G. Berg, “Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting,” vol. 249, pp. 239–249, 2004.
- [131] F. Poly, L. J. Monrozier, and R. Bally, “Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil,” *Res. Microbiol.*, vol. 152, pp. 95–103, 2001.
- [132] J. Young, “Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms,” *Biol. nitrogen Fixat.*, p. 960, 1992.
- [133] L. Tedersoo *et al.*, “454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases,” *New Phytol.*, vol. 188, no. 1, pp. 291–301, 2010.
- [134] J. Dunbar, S. M. Barns, L. O. Ticknor, and C. R. Kuske, “Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 6, pp. 3035–3045, 2002.
- [135] T. Zhang, M. F. Shao, and L. Ye, “454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants,” *ISME J.*, vol. 6, no. 6, pp. 1137–1147, 2012.
- [136] E. R. Mardis, “The impact of next-generation sequencing technology on genetics,” *Trends in Genetics*, vol. 24, no. 3, pp. 133–141, 2008.
- [137] J. Shendure and H. Ji, “Next-generation DNA sequencing,” *Nature Biotechnology*, vol. 26, no. 10, pp. 1135–1145, 2008.
- [138] E. Cardenas and J. M. Tiedje, “New tools for discovering and characterizing microbial diversity,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 19, no. 6, pp. 544–549, Dec. 2008.
- [139] J. P. Zehr, B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward, “Minireview Nitrogenase gene diversity and microbial community structure : a cross-system comparison,” *Environ. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 539–554, 2003.
- [140] A. E. Escalante, “Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas.”
- [141] B. J. Campbell, S. W. Polson, T. E. Hanson, M. C. Mack, and E. A. G. Schuur, “The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil,” *Environ. Microbiol.*, vol. 12, no. 7, pp. 1842–1854, 2010.
- [142] W. Ludwig *et al.*, “ARB: A software environment for sequence data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 1363–1371, 2004.
- [143] R. Kindt and R. Coe, “Tree diversity analysis; A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies,” *World*, no. January, p. 196, 2005.
- [144] G. Ferraris, G. G. Anta, and M. D. Zorita, “Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur,” in *Actas 3er Congreso Soja del MERCOSUR. Conferencias plenarias, Foros y Workshops*, 2006, pp. 85–89.
- [145] J. Döbereiner, S. Urquiaga, and R. M. Boddey, “Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture,” *Fertil. Res.*, vol. 42, no. 1–3, pp. 339–

- 346, 1995.
- [146] A. O. Adesemoye, H. A. Torbert, and J. W. Kloepper, "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers," *Microb. Ecol.*, vol. 58, no. 4, pp. 921–929, Nov. 2009.
- [147] G. Díaz Vargas, P.; Ferrera Cerrato, R.; Almaraz Suárez; Alcántar González, "Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga," *Terra Latinoam.*, vol. 19, no. 4, 2001.
- [148] M. Méndez, E. C. Mercado, and E. G. Pineda, "Azospirillum una rizobacteria con uso potencial en la agricultura," *Biológicas*, vol. 16, no. 1, pp. 11–18, 2014.
- [149] I. Okane, A. Nakagiri, and T. Ito, "Endophytic fungi in leaves of Ericaceous plants," *Can J Bot*, vol. 76, 1998.
- [150] R. Pariona-Llanos, F. Ibañez de Santi Ferrara, H. H. Soto Gonzales, and H. R. Barbosa, "Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane," *Eur. J. Soil Biol.*, vol. 46, no. 6, pp. 387–393, Nov. 2010.
- [151] M. Díaz-Zorita and M. V. Fernández-Canigia, "Field performance of a liquid formulation of Azospirillum brasilense on dryland wheat productivity," *Eur. J. Soil Biol.*, vol. 45, no. 1, pp. 3–11, 2009.
- [152] "V Jornadas Bonaerenses de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable."
- [153] P. Bernabeu, "Caracterización de la colonización y promoción del crecimiento vegetal por *Burkholderia tropica* en gramíneas," Mar. 2017.
- [154] I. Agr and G. N. Ferraris, "Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento (pgpm) en trigo. conocimientos actuales y experiencias realizadas en la región pampeana Argentina.," 2017.
- [155] H. Antoun and J. Kloepper, "Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)," *Encycl. Genet.*, vol. 63, no. May 2015, p. 49, 2001.
- [156] M. de las M. Ifran Elvira, "Evaluación del efecto de la inoculación con *Enterobacter aerogenes* sobre el crecimiento de plantas de naranjo Newhall en suelos rojos.," 2013.
- [157] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual.*, no. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [158] P. R. Bernabeu *et al.*, "Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 191, pp. 113–120, 2015.
- [159] Soil Survey Staff, "Keys to soil taxonomy," *Soil Conserv. Serv.*, vol. 12, p. 410, 2014.
- [160] INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, "II Carta de suelos de la provincia de Buenos Aires | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria," 2015. [Online]. Available: <https://inta.gob.ar/documentos/carta-de-suelos-de-la-provincia-de-buenos-aires>. [Accessed: 08-May-2018].
- [161] R. Lanfranco, J. y Carrizo, "Carta de suelos de la Estación Experimental Central. Fac. Agronomía- Ministerio de As. Agraria," 1973.
- [162] B. Reiter, H. Bürgmann, K. Burg, and A. Sessitsch, "Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato.," *Can. J. Microbiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 549–555, Sep. 2003.
- [163] B. Nikolic, H. Schwab, and A. Sessitsch, "Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene ( *acdS* ) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L.," pp. 665–676, 2011.
- [164] M. G. Murray and W. F. Thompson, "Rapid isolation of high molecular weight

- plant DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 8, no. 19, pp. 4321–4326, 1980.
- [165] A. M. Alippi and O. M. Aguilar, “Characterization of isolates of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers,” *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 72, no. 1, pp. 21–7, 1998.
- [166] C. Yeager, J. Kornosky, D. C. Housman, E. E. Grote, J. Belnap, and C. R. Kuske, “Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 973–983, 2004.
- [167] F. Widmer, B. T. Shaffer, L. A. Porteous, and R. J. Seidler, “Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a douglas fir forest site in the oregon cascade mountain range,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 374–380, 1999.
- [168] S. Zani, M. T. Mellon, J. L. Collier, and J. P. Zehr, “Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 7, pp. 3119–3124, 2000.
- [169] C. Yeager, J. Kornosky, D. C. Housman, E. E. Grote, J. Belnap, and C. R. Kuske, “Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 973–983, 2004.
- [170] T. Ueda, Y. Suga, N. Yahiro, and T. Matsuguchi, “Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences,” *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 5, pp. 1414–1417, 1995.
- [171] A. B. Pavel and C. I. Vasile, “PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics,” *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, p. 9, 2012.
- [172] P. D. Schloss *et al.*, “Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 23, pp. 7537–7541, 2009.
- [173] J. P. Zehr, B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward, “Minireview Nitrogenase gene diversity and microbial community structure : a cross-system comparison,” *Environ. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 539–554, 2003.
- [174] Y. Huang, B. Niu, Y. Gao, L. Fu, and W. Li, “CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 5, pp. 680–682, 2010.
- [175] K. T. Konstantinidis and J. M. Tiedje, “Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 7, pp. 2567–72, 2005.
- [176] M. HONMA and T. SHIMOMURA, “Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 42, no. 10, pp. 1825–1831, 1978.
- [177] P. Heller, H. J. Tripp, K. Turk-Kubo, and J. P. Zehr, “ARBitrator: a software pipeline for on-demand retrieval of auto-curated *nifH* sequences from GenBank,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 20, pp. 2883–2890, 2014.
- [178] Ø. Hammer, D. A. T. a. T. Harper, and P. D. Ryan, “PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis,” *Palaeontol. Electron.*, vol. 4(1), no. 1, pp. 1–9, 2001.
- [179] C. Lozupone and R. Knight, “UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 12, pp. 8228–35, Dec. 2005.
- [180] Ø. Hammer, Natural History Museum, and University of Oslo, “Reference Manual: PAST PAleontological STatistics. Version 3.15,” *System*, no. 1999, p.



- 205, 2016.
- [181] D. Borcard, P. Legendre, and P. Drapeau, "Partialling out the spatial component of ecological variation," *Ecology*, vol. 73, no. 3, pp. 1045–1055, 1992.
- [182] J. C. Gower, "Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis," *Biometrika*, vol. 53, no. 3/4, p. 325, 1966.
- [183] A. Ramette, "Multivariate analyses in microbial ecology," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 62, no. 2, pp. 142–160, 2007.
- [184] S. W. Culman, H. G. Gauch, C. B. Blackwood, and J. E. Thies, "Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study," *J. Microbiol. Methods*, vol. 75, no. 1, pp. 55–63, 2008.
- [185] W. L. Tung and K.-C. Chow, "A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*," *Trends Genet.*, vol. 11, no. 4, pp. 128–129, 1995.
- [186] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [187] H. Bolton, L. F. Elliott, R. F. Turco, and A. C. Kennedy, "Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* sp. and effects on plant growth," *Plant Soil*, vol. 123, no. 1, pp. 121–124, 1990.
- [188] R. M. Teather and P. J. Wood, "Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 43, no. 4, pp. 777–780, 1982.
- [189] G. Dupuy, G. Hilaire, and C. Aubry, "Rapid determination of alpha-amylase activity by use of a new chromogenic substrate.," *Clin. Chem.*, vol. 33, no. 4, pp. 524–8, 1987.
- [190] M. Yusof *et al.*, "A plate assay for primary screening of lipase activity," *J. Microbiol. Methods*, vol. 9, pp. 51–56, 1989.
- [191] G. A. Walsh, R. A. Murphy, G. F. Killeen, D. R. Headon, and R. F. Power, "Technical note: detection and quantification of supplemental fungal beta-glucanase activity in animal feed.," *J. Anim. Sci.*, vol. 73, no. 4, pp. 1074–1076, 1995.
- [192] L. Hankin, M. Zucker, and D. C. Sands, "Improved Solid Medium for the Detection and Enumeration of Pectolytic Bacteria," *Appl. Microbiol.*, vol. 22, no. 2, pp. 205–209, 1971.
- [193] G. O'Toole, "Microtiter dish biofilm formation assay.," *J. Vis. Exp.*, no. 47, pp. 3–5, 2011.
- [194] C. Prieto, D. O. Serra, P. Martina, M. Jacobs, A. Bosch, and O. M. Yantorno, "Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis," *Vet. Microbiol.*, vol. 166, no. 3–4, pp. 504–515, 2013.
- [195] A. M. Alippi and O. M. Aguilar, "Characterization of Isolates of *Paenibacillus larvaesubsp.larvae* from Diverse Geographical Origin by the Polymerase Chain Reaction and BOX Primers," *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 72, no. 1, pp. 21–27, Jul. 1998.
- [196] D. M. Penrose and B. R. Glick, "Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria," *Physiol. Plant.*, vol. 118, no. 1, pp. 10–15, May 2003.
- [197] G. Fahraeus, "The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 374–381, 1957.

- [198] R. a Jefferson, S. M. Burgess, and D. Hirsh, "beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 22, pp. 8447–8451, 1986.
- [199] J. Murphy and J. P. Riley, "A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters," *Anal. Chim. Acta*, vol. 27, pp. 31–36, Jan. 1962.
- [200] J. B. . J. Jones, H. V. Eck, and R. Voss, "Plant analysis as an aid in fertilizing corn and grain sorghum.," *Plant Anal. as an aid Fertil. corn grain sorghum.*, no. Ed. 3, pp. 521–547, 1990.
- [201] H. D. Chapman, P. F. Pratt, and A. Contín, "Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas," Trillas México, 1973.
- [202] L. Lin *et al.*, "Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China," *Microbes Env.*, vol. 27, no. 4, pp. 391–398, 2012.
- [203] B. R. Glick, "Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase," vol. 251, pp. 1–7, 2005.
- [204] N. Ahmad, Z. K. Shinwari, S. Bashir, and M. Yasir, "Function and pylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with gm and non gm maize," *Pak. J. Bot*, vol. 45, no. 5, pp. 1781–1788, 2013.
- [205] S. S. Sindhu and K. R. Dadarwal, "Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea," *Microbiol. Res.*, vol. 156, no. 4, pp. 353–358, Jan. 2001.
- [206] M. A. Abiala, A. C. Odebode, S. F. Hsu, and C. B. Blackwood, "Phytobeneficial Properties of Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Maize in Southwestern Nigerian Soils.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 14, pp. 4736–43, Jul. 2015.
- [207] P. Gyaneshwar, E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and J. K. Ladha, "Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 8, pp. 2634–2645, 2001.
- [208] B. Reinhold-Hurek and T. Hurek, "Living inside plants: Bacterial endophytes," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 14, no. 4, pp. 435–443, 2011.
- [209] a Sessitsch *et al.*, "Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 25, no. 1, pp. 28–36, Jan. 2012.
- [210] A. A. Rodrigues *et al.*, "Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane," *Pesqui. Agropecuária Trop.*, vol. 46, no. 2, pp. 149–158, Jun. 2016.
- [211] J. Dutta and D. Thakur, "Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0182302, Aug. 2017.
- [212] L. H. León Mendoza, "Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.)."
- [213] J. E. Salazar-Henao, I. C. Vélez-Bermúdez, and W. Schmidt, "The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis.," *Development*, vol. 143, no. 11, pp. 1848–58, Jun. 2016.
- [214] P. B. Reich, J. Oleksyn, and I. J. Wright, "Leaf phosphorus influences the photosynthesis–nitrogen relation: a cross-biome analysis of 314 species," *Oecologia*, vol. 160, no. 2, pp. 207–212, May 2009.

- [215] J. M. Raaijmakers, “Dose-Response Relationships in Biological Control of Fusarium Wilt of Radish by *Pseudomonas* spp.,” *Phytopathology*, vol. 85, no. 10, p. 1075, 1995.
- [216] A. Bolwerk *et al.*, “Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*,” *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 16, no. 11, pp. 983–993, Nov. 2003.
- [217] D. K. Maheshwari, *Plant growth and health promoting bacteria*. Springer-Verlag, 2010.
- [218] P. Bogino, M. Oliva, F. Sorroche, and W. Giordano, “The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 8, pp. 15838–15859, Jul. 2013.
- [219] H. Naseem and A. Bano, “Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize,” *J. Plant Interact.*, vol. 9, no. 1, pp. 689–701, Jan. 2014.
- [220] D. M. Russo *et al.*, “Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*,” *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 12, pp. 4474–86, Jun. 2006.
- [221] M. L. K. and I. R. K. Gamini Seneviratne, “Biofilmed biofertilisers: novel inoculants for efficient nutrient use in plants. In: Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML, Rose MT (eds) Efficient nutrient use in rice production in Vietnam achieved using inoculant biofertilizers. ACIAR Proceedings No. ,” 2008.
- [222] C. Matz, T. Bergfeld, S. A. Rice, and S. Kjelleberg, “Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing,” *Environ. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 218–226, Mar. 2004.
- [223] E. Ortega, L. Fernández, P. Ortega-Rodés, and R. Rodés, “La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar.”
- [224] M. Bruto, C. Prigent-Combaret, D. Muller, and Y. Moëne-Loccoz, “Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, p. 6261, May 2015.
- [225] S. Spaepen and J. Vanderleyden, “Auxin and plant-microbe interactions,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 4, Apr. 2011.
- [226] P. F. O’connell, “Sustainable Agriculture-a Valid Alternative,” *Outlook Agric.*, vol. 21, no. 1, pp. 5–12, Mar. 1992.
- [227] J. D. Elsas, A. F. Dijkstra, J. M. Govaert, and J. A. Veen, “Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 38, no. 3, pp. 151–160, Aug. 1986.
- [228] E. Bent and C. P. Chanway, “The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 44, no. 10, pp. 980–988, Oct. 1998.
- [229] M. L. K. and I. R. K. Gamini Seneviratne, “Biofilmed biofertilisers: novel inoculants for efficient nutrient use in plants. In: Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML, Rose MT (eds) Efficient nutrient use in rice production in Vietnam achieved using inoculant biofertilizers. ACIAR Proceedings No. ,” 2008.

- [230] P. R. Hardoim, L. S. van Overbeek, and J. D. van Elsas, "Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth," *Trends Microbiol.*, vol. 16, no. 10, pp. 463–471, Oct. 2008.
- [231] Cindy Lodewyckx, Jaco Vangronsveld, Fiona Porteous, Edward R.B. Moore, Safieh Taghavi, Max Mezgeay, and Daniel van der Lelie., "Endophytic Bacteria and Their Potential Applications," *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 21, no. 6, pp. 583–606, Nov. 2002.
- [232] B. Reinhold-Hurek and T. Hurek, "Life in grasses: Diazotrophic endophytes," *Trends in Microbiology*, vol. 6, no. 4. pp. 139–144, 1998.
- [233] Adel Elbeltagy, Kiyoo Nishioka, Tadashi Sato, Hisa Suzuki, Bin Ye1, Toru Hamada2, Tsuyoshi Isawa1, Hisayuki Mitsui1, and Kiwamu Minamisawa1,\*., "Endophytic Colonization and in Planta Nitrogen Fixation by a Herbaspirillum sp. Isolated from Wild Rice Species," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 3–12, pp. 5285–5293, 2001.
- [234] M. Hansen, L. Kragelund, O. Nybroe, and J. Sørensen, "Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 23, no. 4, pp. 353–360, 1997.
- [235] C. Zachow *et al.*, "The novel lipopeptide poaeamide of the endophyte *Pseudomonas poae* RE\*1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 28, no. 7, pp. 800–810, 2015.
- [236] S. C. Verma, J. K. Ladha, and A. K. Tripathi, "Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice," in *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 91, no. 2–3, pp. 127–141.
- [237] Z. Tan, T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek, "Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice," *Environ. Microbiol.*, vol. 5, no. 10, pp. 1009–1015, 2003.
- [238] Y. Chen *et al.*, "Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation."
- [239] H.-C. Flemming and J. Wingender, "The biofilm matrix," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 9, p. 623, Aug. 2010.
- [240] D. K. Maheshwari, *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem.* .
- [241] M. Bacilio-Jiménez, S. Aguilar-Flores, E. Ventura-Zapata, E. Pérez-Campos, S. Bouquelet, and E. Zenteno, "Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria," *Plant Soil*, vol. 249, no. 2, pp. 271–277, 2003.
- [242] S. de Weert *et al.*, "Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*," *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 15, no. 11, pp. 1173–1180, 2002.
- [243] A. I. Hassen and N. Labuschagne, "Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 10, pp. 1837–1846, Oct. 2010.
- [244] D. E. Holmes, K. P. Nevin, and D. R. Lovley, "Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 54, no. 5, pp. 1591–1599, 2004.
- [245] J. Instituto Nacional de Salud (Peru), V. Neyra, J. Castro, R. Accinelli, I. Rodríguez, and J. R. Espinoza, *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública.*, vol. 19, no. 3. Instituto Nacional de Salud, 2002.
- [246] D. B. Nehl, S. J. Allen, and J. F. Brown, "Deleterious rhizosphere bacteria: an

- integrating perspective,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–20, Jan. 1997.
- [247] P. B. Hatzinger and M. Alexander, “Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa,” *Plant Soil*, vol. 158, no. 2, pp. 211–222, Jan. 1994.
- [248] P. Jjemba and M. Alexander, “Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 31, no. 4, pp. 623–632, Apr. 1999.
- [249] Y. Okon and C. A. Labandera-Gonzalez, “Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation,” *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 26, no. 12, pp. 1591–1601, 1994.
- [250] Y. Bashan, “Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture,” *Biotechnology Advances*, vol. 16, no. 4, pp. 729–770, 1998.
- [251] W. Cruz Romero *et al.*, “Producción de plántulas de hortalizas con *Azospirillum* sp. y aspersión foliar de miel de abeja\* Production of vegetable seedlings with *Azospirillum* sp. and foliar spray with bee honey,” *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas*, vol. 7, pp. 59–70, 2016.
- [252] M. H. Gaskins, S. L. Albrecht, and D. H. Hubbell, “Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review,” *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 12, no. 2, pp. 99–116, Jan. 1985.
- [253] P. B. Hatzinger and M. Alexander, “Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa,” *Plant Soil*, vol. 158, no. 2, pp. 211–222, Jan. 1994.
- [254] C. Loredó-Ostí, L. López-Reyes, and D. Espinosa-Victoria, “Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Graminaceous Species: A Review.”
- [255] H. P. Bais, T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco, “The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms,” *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57, pp. 233–266, 2006.
- [256] J. van Elsas, G. Duarte, A. Rosado, and K. Smalla, “Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 32, no. 2, pp. 133–154, Apr. 1998.
- [257] A. D. Rovira, “Plant root exudates,” *Bot. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 35–57, Jan. 1969.
- [258] M. Espinosa-Urgel, R. Kolter, and J.-L. Ramos, “Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight,” *Microbiology*, vol. 148, no. 2, pp. 341–343, Feb. 2002.
- [259] M. Sajjad Mirza *et al.*, “Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro,” *Plant Soil*, vol. 237, no. 1, pp. 47–54, 2001.
- [260] Samina Mehnaz, M Sajjad Mirza, Jacqueline Haurat, Rene Bally, Philippe Normand, Asghari Bano, and Kauser A Malik, “Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 110–117, Feb. 2001.
- [261] C. A. Mallon, J. D. van Elsas, and J. F. Salles, “Microbial Invasions: The Process, Patterns, and Mechanisms,” *Trends Microbiol.*, vol. 23, no. 11, pp. 719–729, Nov. 2015.
- [262] O. Masciarelli, A. Llanes, and V. Luna, “A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation,” *Microbiol. Res.*, vol. 169, no. 7–8, pp. 609–615, Jul. 2014.

- [263] Janpen Prakamhang , Panlada Tittabutr , Nantakorn Boonkerd a, Kamonluck Teamtisong , Toshiki Uchiumi, Mikiko, Neung Teaumroong, “Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with Bradyrhizobium diazoefficiens USDA110 and B. japonicum THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 85, pp. 38–49, Jan. 2015.
- [264] Y. V. Kuzmicheva *et al.*, “Variety specific relationships between effects of rhizobacteria on root exudation, growth and nutrient uptake of soybean,” *Plant Soil*, vol. 419, no. 1–2, pp. 83–96, Oct. 2017.
- [265] “Rhizobacteria acts as bioenhancer for growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under growth chamber condition (PDF Download Available).” [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/317971869\\_Rhizobacteria\\_acts\\_as\\_bio\\_enhancer\\_for\\_growth\\_of\\_soybean\\_Glycine\\_max\\_L\\_Merr\\_under\\_growth\\_chamber\\_condition](https://www.researchgate.net/publication/317971869_Rhizobacteria_acts_as_bio_enhancer_for_growth_of_soybean_Glycine_max_L_Merr_under_growth_chamber_condition). [Accessed: 30-Jan-2018].
- [266] P. F. O’connell, “Sustainable Agriculture-a Valid Alternative,” *Outlook Agric.*, vol. 21, no. 1, pp. 5–12, Mar. 1992.
- [267] J. D. Elsas, A. F. Dijkstra, J. M. Govaert, and J. A. Veen, “Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 38, no. 3, pp. 151–160, Aug. 1986.
- [268] E. Bent and C. P. Chanway, “The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 44, no. 10, pp. 980–988, Oct. 1998.
- [269] B. B. Pageni, N. Z. Lupwayi, F. J. Larney, L. M. Kawchuk, and Y. Gan, “Populations, diversity and identities of bacterial endophytes in potato (*Solanum tuberosum* L.) cropping systems,” *Can. J. Plant Sci.*, vol. 93, no. 6, pp. 1125–1142, Nov. 2013.
- [270] B. Reiter, H. Bürgmann, K. Burg, and A. Sessitsch, “Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 549–555, Sep. 2003.
- [271] Y. K. Yeoh *et al.*, “The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application,” *Environ. Microbiol.*, vol. 18, no. 5, pp. 1338–1351, May 2016.
- [272] D. S. Lundberg *et al.*, “Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome,” *Nature*, vol. 488, no. 7409, pp. 86–90, Aug. 2012.
- [273] R. J. Robinson, B. A. Fraaije, I. M. Clark, R. W. Jackson, P. R. Hirsch, and T. H. Mauchline, “Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability,” *Plant Soil*, vol. 405, no. 1–2, pp. 381–396, 2016.
- [274] F. Wemheuer, K. Kaiser, P. Karlovsky, R. Daniel, S. Vidal, and B. Wemheuer, “Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. December 2016, p. 40914, 2017.
- [275] D. N. Proença *et al.*, “The Microbiome of Endophytic, Wood Colonizing Bacteria from Pine Trees as Affected by Pine Wilt Disease,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 4205, 2017.
- [276] Z. Bao *et al.*, “Impact of *Azospirillum* sp. B510 Inoculation on Rice-Associated Bacterial Communities in a Paddy Field,” *Microbes Env.*, vol. 28, no. 4, pp. 487–490, 2013.
- [277] J.-B. Ramond, F. Tshabuse, C. W. Bopda, D. a. Cowan, and M. I. Tuffin,

- “Evidence of variability in the structure and recruitment of rhizospheric and endophytic bacterial communities associated with arable sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench),” *Plant Soil*, vol. 372, no. 1–2, pp. 265–278, May 2013.
- [278] J. I. Sprent and E. K. James, “N<sub>2</sub>-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation,” in *Azospirillum VI and Related Microorganisms*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995, pp. 15–30.
- [279] E. K. James and F. L. Olivares, “Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs,” *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 17, no. 1, pp. 77–119, Jan. 1998.
- [280] J. Dobereiner, “Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions,” in *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, vol. 29, no. 5–6, pp. 771–774.
- [281] R. M. Boddey, “Biological Nitrogen Fixation in Sugar Cane: A Key to Energetically Viable Biofuel Production,” *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 263–279, 1995.
- [282] Y. B. Chen *et al.*, “Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp strain IMS101,” *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 14, pp. 3598–3605, 1998.
- [283] J. C. Gaby and D. H. Buckley, “A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e42149, Jul. 2012.
- [284] “Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil,” *Res. Microbiol.*, vol. 152, no. 1, pp. 95–103, Jan. 2001.
- [285] C. Rangjaroen, B. Rerkasem, N. Teaumroong, R. Sungthong, and S. Lumyong, “Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand,” *Arch. Microbiol.*, vol. 196, no. 1, pp. 35–49, Jan. 2014.
- [286] A. Rodríguez-Blanco, M. Sicardi, and L. Frioni, “Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea*,” *Biol. Fertil. Soils*, vol. 51, no. 3, pp. 391–402, Apr. 2015.
- [287] W. T. Liu, T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney, “Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 11, pp. 4516–22, Nov. 1997.
- [288] C. Rösch and H. Bothe, “Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 4, pp. 2026–2035, Apr. 2005.
- [289] P. A. Calderoli, “Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos,” Mar. 2016.
- [290] Q. Teng, B. Sun, X. Fu, S. Li, Z. Cui, and H. Cao, “Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China,” *J. Microbiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 135–141, Apr. 2009.
- [291] K. T. Konstantinidis and J. M. Tiedje, “Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 7, pp. 2567–72, 2005.
- [292] M. L. Sogin *et al.*, “Microbial diversity in the deep sea and the underexplored

- &quot;rare biosphere&quot;,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 32, pp. 12115–20, Aug. 2006.
- [293] F. M. Romero, M. Marina, and F. L. Pieckenstain, “The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 351, no. 2, pp. 187–194, 2014.
- [294] F. M. Romero, M. Marina, and F. L. Pieckenstain, “The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 351, no. 2, pp. 187–194, Feb. 2014.
- [295] K. J. Hoff, “The effect of sequencing errors on metagenomic gene prediction,” *BMC Genomics*, vol. 10, no. 1, p. 520, Nov. 2009.
- [296] I. E. García de Salamone *et al.*, “Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 61, pp. 196–204, Oct. 2012.
- [297] M. S. Montecchia, M. Tosi, M. A. Soria, J. A. Vogrig, O. Sydorenko, and O. S. Correa, “Pyrosequencing Reveals Changes in Soil Bacterial Communities after Conversion of Yungas Forests to Agriculture,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0119426, Mar. 2015.
- [298] J. B. Hughes, J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. Bohannan, “Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 10, pp. 4399–406, Oct. 2001.
- [299] I. E. García de Salamone, L. P. Di Salvo, J. S. Escobar Ortega, P. M. F. Boa Sorte, S. Urquiaga, and K. R. S. Teixeira, “Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants,” *Plant Soil*, vol. 336, no. 1–2, pp. 351–362, Nov. 2010.
- [300] C. Lozupone, M. E. Lladser, D. Knights, J. Stombaugh, and R. Knight, “UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison,” *ISME J.*, vol. 5, no. 2, pp. 169–172, Feb. 2011.
- [301] A. E. Magurran, *Measuring Biological Diversity*. John Wiley & Sons, 2013.
- [302] J. P. Zehr, B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward, “Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison,” *Environ. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 539–554, Jul. 2003.
- [303] T. Ding and U. Melcher, “Influences of Plant Species, Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0150895, Mar. 2016.
- [304] A. F. Khadem, A. Pol, M. S. M. Jetten, and H. J. M. O. den Camp, “Nitrogen fixation by the verrucomicrobial methanotroph ‘*Methylacidiphilum fumariolicum*’ SolV,” *Microbiology*, vol. 156, no. 4, pp. 1052–1059, 2010.
- [305] A. Pol, K. Heijmans, H. R. Harhangi, D. Tedesco, M. S. M. Jetten, and H. J. M. O. Den Camp, “Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species,” *Nature*, vol. 450, no. 7171, pp. 874–878, 2007.
- [306] F. Barona-Gomez *et al.*, “The cycad coralloid root contains a diverse endophytic bacterial community including cyanobacteria encoding specific biosynthetic gene clusters,” *bioRxiv*, p. 121160, Sep. 2017.
- [307] L. Duc, M. Noll, B. E. Meier, H. Bürgmann, and J. Zeyer, “High Diversity of Diazotrophs in the Forefield of a Receding Alpine Glacier,” *Microb. Ecol.*, vol. 57, no. 1, pp. 179–190, Jan. 2009.



- [308] C. M. Yeager *et al.*, “Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N<sub>2</sub>-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 60, no. 1, pp. 85–97, Apr. 2007.
- [309] B. A. Whitton, *Ecology of cyanobacteria II*. Springer, 2012.
- [310] C. V. de Almeida, F. D. Andreote, R. Yara, F. A. O. Tanaka, J. L. Azevedo, and M. de Almeida, “Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 10, pp. 1757–1764, Oct. 2009.
- [311] M. Gantar and J. Elhai, “Colonization of wheat para-nodules by the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 2S9B,” *New Phytol.*, vol. 141, no. 3, pp. 373–379, 1999.
- [312] R. Prasanna *et al.*, “Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato,” *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 136, no. 2, pp. 337–353, Jun. 2013.
- [313] D. A. F. da Silva *et al.*, “Endophytic microbial community in two transgenic maize genotypes and in their near-isogenic non-transgenic maize genotype,” *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 1, p. 332, Dec. 2014.
- [314] D. F. Spencer and B. A. Linnquist, “Reducing rice field algae and cyanobacteria abundance by altering phosphorus fertilizer applications,” *Paddy Water Environ.*, vol. 12, no. 1, pp. 147–154, Jan. 2014.
- [315] W. L. Lázaro, S. Díez, C. J. da Silva, Á. R. A. Ignácio, and J. R. D. Guimarães, “Seasonal changes in peryphytic microbial metabolism determining mercury methylation in a tropical wetland,” *Sci. Total Environ.*, vol. 627, pp. 1345–1352, Jun. 2018.
- [316] H. Xu *et al.*, “High-throughput sequencing reveals microbial communities in drinking water treatment sludge from six geographically distributed plants, including potentially toxic cyanobacteria and pathogens,” *Sci. Total Environ.*, vol. 634, pp. 769–779, Sep. 2018.
- [317] S. Nayak and – R Prasanna, “Nayak – Prasanna: Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils -103 - Soil ph and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils,” *Appl. Ecol. Environ. Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 103–113.
- [318] A. V Ravi, K. S. Musthafa, G. Jegathambal, K. Kathiresan, and S. K. Pandian, “Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 45, no. 2, pp. 219–223, 2007.
- [319] W. Raza, W. Yang, and Q. R. Shen, “*Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment,” *J. Plant Pathol.*, pp. 419–430, 2008.
- [320] S. S. Vasan, J. M. Modak, and K. A. Natarajan, “Some recent advances in the bioprocessing of bauxite,” *Int. J. Miner. Process.*, vol. 62, no. 1, pp. 173–186, 2001.
- [321] D. Ruiza, B. Agaras, P. de Werrab, L. G. Wall, and C. Valverde, “Characterization and screening of plant probiotic traits of bacteria isolated from rice seeds cultivated in Argentina,” *J. Microbiol.*, vol. 49, no. 6, pp. 902–912, Dec. 2011.
- [322] T. Orlikowska, K. Nowak, and B. Reed, “Bacteria in the plant tissue culture environment,” *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, vol. 128, no. 3, pp. 487–508, Mar. 2017.
- [323] A. Rodríguez-Blanco, M. Sicardi, and L. Frioni, “Plant genotype and nitrogen

- fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.),” *Biol. Fertil. Soils*, vol. 51, no. 3, pp. 391–402, Apr. 2015.
- [324] Y. Xia, S. DeBolt, J. Dreyer, D. Scott, and M. A. Williams, “Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices,” *Front. Plant Sci.*, vol. 6, p. 490, Jul. 2015.
- [325] M. Xu *et al.*, “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 J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 3, pp. 835–845, Mar. 2014.
- [326] P. R. Hardoim *et al.*, “The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 79, no. 3, pp. 293–320, 2015.
- [327] L. E. Fuentes-Ramírez, J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, and E. Martínez-Romero, “Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 29, no. 2, pp. 117–128, Jun. 1999.
- [328] F. Wemheuer *et al.*, “Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species,” *Letts. Appl. Microbiol.*, vol. 62, no. 4, pp. 323–329, Apr. 2016.
- [329] B. Tian *et al.*, “Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome,” 2017.
- [330] K. B. Hallberg and D. B. Johnson, “Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters,” *Hydrometallurgy*, vol. 71, no. 1–2, pp. 139–148, Oct. 2003.
- [331] S. M. Utturkar *et al.*, “Enrichment of Root Endophytic Bacteria from *Populus deltoides* and Single-Cell-Genomics Analysis,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 18, pp. 5698–708, Sep. 2016.
- [332] B. B. Pageni, N. Z. Lupwayi, F. J. Larney, L. M. Kawchuk, and Y. Gan, “Populations, diversity and identities of bacterial endophytes in potato (*Solanum tuberosum* L.) cropping systems,” *Can. J. Plant Sci.*, vol. 93, no. 6, pp. 1125–1142, 2013.
- [333] F. Ibáñez, M. L. Tonelli, V. Muñoz, M. S. Figueredo, and A. Fabra, “Bacterial Endophytes of Plants: Diversity, Invasion Mechanisms and Effects on the Host,” 2017, pp. 25–40.
- [334] L. Yang, J. Danzberger, A. Schöler, P. Schröder, M. Schloter, and V. Radl, “Dominant Groups of Potentially Active Bacteria Shared by Barley Seeds become Less Abundant in Root Associated Microbiome,” *Front. Plant Sci.*, vol. 8, p. 1005, Jun. 2017.
- [335] J. K. Patel and G. Archana, “Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat.”
- [336] A. B. Moyes *et al.*, “Evidence for foliar endophytic nitrogen fixation in a widely distributed subalpine conifer,” *New Phytol.*, vol. 210, no. 2, pp. 657–668, 2016.
- [337] H. J. Bolívar-Anillo, M. L. Contreras-Zentella, and L. G. Teherán-Sierra, “*Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura,” *TIP*, vol. 19, no. 2, pp. 102–108, Aug. 2016.
- [338] V. L. Divan Baldani, J. I. Baldani, and J. Döbereiner, “Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia*

- spp.," *Biol. Fertil. Soils*, vol. 30, no. 5–6, pp. 485–491, Mar. 2000.
- [339] J. Caballero-Mellado, J. Onofre-Lemus, P. Estrada-de Los Santos, and L. Martínez-Aguilar, "The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 16, pp. 5308–19, Aug. 2007.
- [340] V. M. Reis *et al.*, "Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 54, no. 6, pp. 2155–2162, Nov. 2004.
- [341] P. Estrada, P. Mavingui, B. Cournoyer, F. Fontaine, J. Balandreau, and J. Caballero-Mellado, "A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico," *Can. J. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 285–294, Apr. 2002.
- [342] I. K. Toth *et al.*, "Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe," *Plant Pathol.*, vol. 60, no. 3, pp. 385–399, Jun. 2011.
- [343] A. W. Plants, "Rev. Colombiana cienc. Anim. 1(2).2009 Revisión biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas," vol. 1, no. 2, pp. 286–301, 2009.
- [344] J. E. Butler, N. D. Young, and D. R. Lovley, "Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 40, Jan. 2010.
- [345] W. C. Lin, M. V Coppi, and D. R. Lovley, "Geobacter sulfurreducens can grow with oxygen as a terminal electron acceptor.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 4, pp. 2525–8, Apr. 2004.
- [346] Z. He, D. Kisla, L. Zhang, C. Yuan, K. B. Green-Church, and A. E. Yousef, "Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 168–178, 2007.
- [347] N. M. Vivienne and D. D. Felix, "Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops," *African J. Biotechnol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2004.
- [348] V. P. Gutschick, "Evolved Strategies in Nitrogen Acquisition by Plants," *The American Naturalist*, vol. 118. The University of Chicago Press The American Society of Naturalists, pp. 607–637.
- [349] S. Taghavi *et al.*, "Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. 638," *PLoS Genet.*, vol. 6, no. 5, p. e1000943, May 2010.
- [350] M. Naveed, B. Mitter, S. Yousaf, M. Pastar, M. Afzal, and A. Sessitsch, "The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: A maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics," *Biol. Fertil. Soils*, vol. 50, no. 2, pp. 249–262, 2013.
- [351] M. Naveed, B. Mitter, S. Yousaf, M. Pastar, M. Afzal, and A. Sessitsch, "The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics," *Biol. Fertil. Soils*, vol. 50, no. 2, pp. 249–262, Feb. 2014.
- [352] C. Rozier, J. Hamzaoui, D. Lemoine, S. Czarnes, and L. Legendre, "Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by *Azospirillum lipoferum* CRT1.," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 7416, Aug. 2017.