



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Ingeniería Agronómica

ENDÓFITOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL DEL TOMATE [*Solanum lycopersicum* (L.)]

Trabajo Final de Carrera

Esteban Regueira

Directora: Dra. Graciela N. Pastorino

Co-Directora: Dra. Silvina M. Y. López

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Cátedra de Microbiología Agrícola. FCAYF. UNLP

21 de Junio de 2018

RESUMEN

El incremento en la población mundial ha aumentado la demanda de alimentos y así mismo la demanda de fertilizantes químicos, los cuales no sólo son costosos sino también contaminantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de bacterias endófitas sobre el crecimiento de tomate y los posibles mecanismos de acción que emplean. Para ello, se realizó el aislamiento de los endófitos presentes en las semillas de tomate de las variedades Elpida y Silverio, y luego la identificación utilizando la técnica PCR. Con estos aislamientos se realizó la determinación de la promoción del crecimiento de plantines de tomate en ensayos en cámara de cultivo. El diseño estadístico fue bloques completamente al azar, donde se evaluaron las 10 cepas obtenidas, una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (control positivo) y un control sin inocular, con 10 repeticiones de cada una. Las variables evaluadas fueron: peso fresco radicular, volumen radicular, y peso seco aéreo y radicular. Los datos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza y las comparaciones de medias mediante la prueba de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Por otro lado, se determinó la capacidad de los aislados para producir ácido indol acético (AIA), sideróforos, fijar nitrógeno molecular y solubilizar fósforo inorgánico, en medios de cultivo adecuados. Además, estos ensayos se complementaron con pruebas para evaluar la producción de biofilm y la capacidad de autoagregación.

De los 10 aislados con los que se trabajó, las cepas 15, 6, 4 y 8 tuvieron un impacto positivo en la promoción del crecimiento radical y las cepas 39 y 38 se destacaron en cuanto a los parámetros asociados a la parte aérea. Las bacterias se identificaron como pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Microbacterium sp.*, *Micrococcus sp* y *Paenibacillus polymyxa*.

Los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* tienen la ventaja de producir endósporas, que por ser estructuras altamente resistentes a las altas temperaturas, cambios osmóticos, radiaciones y variaciones de pH, permiten una mayor supervivencia en condiciones estresantes. De manera que al permanecer metabólicamente inactivas pero viables bajo condiciones adversas, los hace apropiadas para la formulación de productos estables, facilitando su comercialización y aplicación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
Importancia productiva y comercial del tomate	3
Problemática	5
Bacterias promotoras del crecimiento en plantas: bacterias endófitas	6
Mecanismos de acción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal	7
Biofertilización	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
Hipótesis	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Aislamiento de endófitos de semillas	13
Identificación taxonómica de los endófitos	13
Caracterización fisiológica de los aislados	16
Determinación de la promoción del crecimiento vegetal	18
Ensayos de biofilm y autoagregación	19
RESULTADOS	21
Aislamiento e Identificación taxonómica de los endófitos	21
Caracterización fisiológica de los aislados.	24
Determinación del potencial de promoción del crecimiento en plantas	25
Formación de biofilm y autoagregación	29
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	35
REFERENCIAS	36

INTRODUCCIÓN

Importancia productiva y comercial del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., pertenece a la familia de las Solanaceae y es una especie originaria de Sudamérica, específicamente de la región que abarca desde la cordillera andina hasta la costa occidental sudamericana, es decir desde el Sur de Ecuador hasta el Norte de Chile (Nuez *et al.* 1996). Es una planta perenne que se cultiva como anual, de porte erecto o rastrero, a menudo, en cultivo reducido a un solo tallo; el eje central de la planta y sus ramas son de crecimiento monopodial y llevan en el ápice una yema vegetativa, de modo que crecen indeterminadamente. Una forma de crecimiento distinta a la anterior se debe a un gen recesivo que afecta el crecimiento del tallo y las ramas al emitir una inflorescencia terminal o sea que el crecimiento es determinado. El sistema radicular consiste en una raíz principal de la que salen raíces laterales y fibrosas. El fruto es una baya de forma muy variada. En los principales cultivos comerciales es oblada, en los tomates silvestres, predominan los frutos esféricos (León, 2000).

En los últimos años, se ha producido un incremento de la producción de esta hortaliza a nivel mundial, debido principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. La producción mundial de tomate fresco es de 177 millones de Tn anuales. Los principales países productores de tomate son China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Italia, Irán, España, Brasil y México, que contribuyen con aproximadamente el 70 % de la producción (Figura 1) en tanto que Argentina participa con valores cercanos al 1 % del total, según la campaña censada en el año 2016 por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2016).

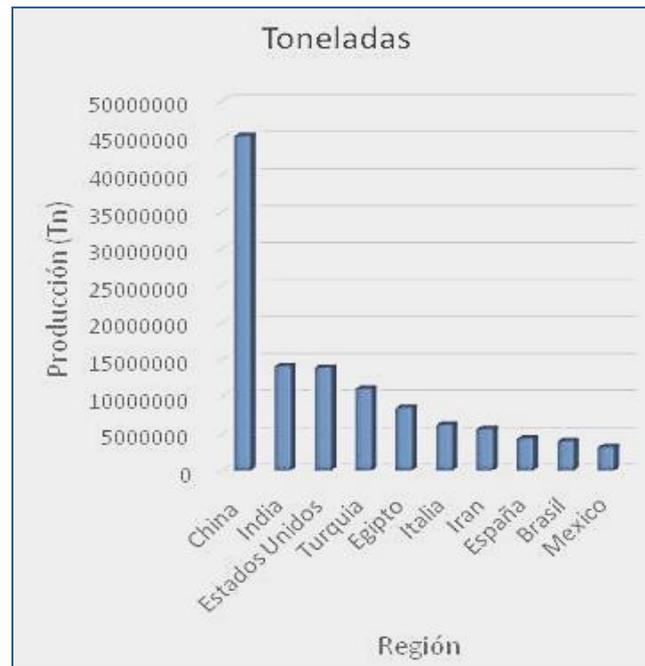


Figura 1. Producción de Tomate fresco mundial, año 2016. Estadística realizada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

En la Argentina el tomate es el segundo cultivo hortícola después de la papa, con una producción cercana a las 1,68 millones de Tn anuales, sumando el tomate en fresco y el tomate para industria (Subsecretaría de Mercados Agropecuarios. Ministerio de Agroindustria, 2017). La producción se encuentra distribuida a lo largo de todo el país, excepto en el sur de la Patagonia. Las provincias de Mendoza, San Juan, Catamarca, Santiago del Estero y Río Negro se dedican principalmente a la producción de tomate para uso industrial (tomate perita) y el tomate redondo para consumo fresco se produce en Buenos Aires, Salta, Jujuy, Tucumán, Corrientes, Santa Fe y otras provincias (Nakama & Fernandez Lozano, 2006).

El rendimiento del cultivo es variable y depende de la tecnología, el material vegetal empleado, el sistema de producción (a campo o bajo invernáculo), la zona de producción, etc. El rendimiento promedio a nivel nacional para los dos destinos del tomate está en el orden de las 35 a 40 toneladas por hectárea. En cambio, en cultivos protegidos de tomate redondo con riego por goteo y estricto control de las condiciones ambientales, dependiendo de la longitud del período de cosecha se pueden obtener rendimientos de 150 toneladas o más.

La producción de tomate tiene por un lado importancia económica ya que genera productos con alto valor agregado como puré, jugo, sopas, ketchup, etc., y por otro lado porque aporta vitamina C, potasio, fibra, betacaroteno (precursores de la vitamina A) y es fuente de licopeno (antioxidante). Esta composición lo ubica como un muy buen alimento, y además posee numerosas propiedades medicinales, contribuye en la prevención de enfermedades, regula el funcionamiento del sistema digestivo, actúa como antiséptico y antiescorbútico (del Pino, 2018).

Problemática

La intensidad con que se manejan los cultivos hortícolas sumado a un excesivo uso de insumos de síntesis química han ocasionado por un lado un deterioro acelerado de los suelos, lo que se traduce, como señala Balcaza (2003), en la reducción de la permeabilidad, la fuerte tendencia a la compactación y encostramiento como así también a una deficiente estabilidad de los agregados. Por otro lado, la degradación de la estructura también puede ocasionarse por la pérdida de materia orgánica, asociada generalmente al riego y al laboreo (Hurtado *et al.*; 2006). Además, este tipo de sistema trae consigo externalidades tales como encontró Cano (2012), al analizar la calidad de agua en el cinturón hortícola platense, donde halló que el 75 % de las muestras tenían algún tipo de contaminación microbiológica (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, coliformes) y, el 40 % de las muestras superaban los niveles de nitrato permitidos en el Código Alimentario Argentino (Cano *et al.*, 2012)

En general, en la región, a los pocos años de iniciada la producción protegida, los rendimientos de los cultivos disminuyen debido a la degradación del suelo por diversas causas: salinización, alcalinización, disminución de permeabilidad, encharcamiento, desequilibrios nutritivos y desarrollo de enfermedades. En parte, estas degradaciones tienen su origen en la fertilización excesiva que conduce a una situación de hiperfertilización, con mayores costos productivos y daño ambiental (Alconada & Huergo, 1998; Giuffré *et al.*, 2004).

Los bioinsumos surgen como posibles moderadores a los problemas mencionados, para lograr una agricultura más amigable con el medioambiente y definitivamente sostenible. Por esta razón se han desarrollado investigaciones orientadas a mejorar la producción con prácticas

agroecológicas que permitan llevar adelante sistemas de manejo sustentables, entre las que se encuentra el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Cabe aclarar que se entiende por desarrollo sustentable a “aquel que permite satisfacer las necesidades de las presentes generaciones sin comprometer la posibilidad de satisfacer las necesidades de las generaciones futuras” (Brundtland, 1987). Con esta clase de manejo, se apunta a que en el futuro se reduzcan las aplicaciones de agroquímicos, manteniendo e incluso aumentando las productividades. Es decir que el objetivo es lograr que las prácticas agrícolas mejoren sus productividades para cumplir con la meta de alimentar a miles de millones de personas en el mundo, sin deteriorar los suelos, siendo esto posible gracias a la biotecnología y el uso de microorganismos, como parte de un manejo agroecológico (Sanjuán Pinilla & Moreno Sarmiento, 2010).

Bacterias promotoras del crecimiento en plantas: Bacterias endófitas

Las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas son conocidas como PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) y son utilizadas en la formulación de productos que se adicionan a los cultivos con el fin de obtener mayor productividad (Sarabia *et al.*, 2010; Johansson *et al.*, 2004; González-Chávez, 2005).

Las PGPB establecen relaciones con los cultivos que difieren en el nivel de interacción con las plantas, y estas pueden ser asociativas y/o simbióticas. Por otro lado, en la última década ha surgido un interés creciente hacia los microorganismos endófitos, los cuales al estar menos afectados por el estrés ambiental y más aclimatados con su hospedero (Sturz & Nowak, 2000) podrían presentar una mayor ventaja ecológica. "Endófito" es un término topográfico global que incluye a todos los organismos que cumplen una parte o todo su ciclo de vida en el interior de los tejidos y viven y se nutren de sus hospedantes sin producir síntomas de enfermedad (Yanni *et al.* 2011). Se piensa que las bacterias endófitas al estar en una asociación íntima con las plantas podrían tener efectos beneficiosos de mayor trascendencia en comparación con las bacterias que viven en la zona influenciada por la raíz (rizosféricas), debido a que tienen menor competencia que estas para tomar sus nutrientes (Glick *et al.*, 1999).

Las discusiones sobre el origen de las bacterias endófitas y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis de que se originaron desde las semillas, de la rizósfera, de la microflora, del filoplano o del material utilizado para la propagación vegetativa (Reinhold-Huker & Hurek, 1998). La penetración en la planta puede ocurrir por estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, y también por acción directa de las bacterias que pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (McCully, 2001).

Las plantas están colonizadas por comunidades microbianas diversas cuando crecen en condiciones naturales. Muchos de estos microorganismos establecen relaciones no patogénicas con las plantas, e incluso pueden favorecer su crecimiento y resistencia a limitaciones bióticas (frente a patógenos) y abióticas (sequía, salinidad, etc.) (Caballero-Mellado, 2006). La rizósfera está influenciada por los productos del metabolismo de la planta, que son utilizados por los microorganismos tanto benéficos como patógenos para proliferar, afectando por lo tanto la sanidad y el crecimiento de las plantas. Todas estas interacciones entre las plantas y los microorganismos están gobernadas por el estado fisiológico y vigor de las plantas en desarrollo y por las características del suelo, régimen hídrico y manejo agronómico. Además, los microorganismos interactúan entre ellos, dando lugar a procesos de naturaleza antagónica o sinérgica, muy importantes para las plantas. No todas las cepas de una especie microbiana se comportan de la misma forma. Estas diferencias se deben tanto a características propias de las plantas como a las de la cepa microbiana (Boddey & Döbereiner, 1988).

Mecanismos de acción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Según Kloepper y Schroth (1981) la promoción del crecimiento de las plantas se produce a través de la producción de diversas sustancias y los mecanismos de acción pueden clasificarse como directos e indirectos.

Mecanismos directos: son aquellos en los que el metabolito producido por la bacteria son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta.

(Kloepper, 1993). Estos mecanismos incluyen la producción de compuestos volátiles y fitohormonas, alteraciones en la síntesis de etileno en la planta y mejoramiento en la nutrición de la planta (liberación de fosfatos y micronutrientes de fuentes insolubles; fijación de nitrógeno).

Mecanismos indirectos o de Biocontrol: estos mecanismos evitan el efecto dañino que los patógenos ocasionan en las plantas (Glick, 2012). Los efectos indirectos se verifican, por ejemplo, cuando las PGPB reducen la incidencia de las enfermedades al estimular la proliferación de organismos benéficos, inducen la resistencia sistémica de las plantas (ISR), producen antibióticos, compiten por nutrientes y/o espacio. (Jacobsen, 1997).

El Control Biológico o Biocontrol, según Baker y Cook (1974), consiste en utilizar organismos naturales o sus productos metabólicos para provocar una reducción en la población de los parásitos y/o patógenos. Los antagonistas son aquellos agentes biológicos, hongos, bacterias, virus, etc., que atacan a los patógenos, manteniendo de esta manera bajo control la población de los individuos “blanco” o “diana” (Cook & Baker, 1983). Además, se ha demostrado que las PGPB son antagonistas de patógenos a través de la producción de sideróforos, síntesis de inhibidores del crecimiento y/o enzimas (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

A continuación se describen algunos de los mecanismos de acción directos más estudiados y que se analizaron en este trabajo de investigación.

Solubilización de fósforo

Los bajos niveles de fósforo soluble del suelo limitan el crecimiento de las plantas. Varias enzimas sintetizadas por los microorganismos del suelo, como fosfatasas, fitasas y C-P liasas, catalizan la liberación de fósforo a partir de compuestos orgánicos que se encuentran en el suelo y que son degradados (Barea *et al.*, 2005). Por otro lado, microorganismos presentes en suelos con compuestos inorgánicos como fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares, movilizan los compuestos fosfatados a través de la disminución del pH provocada por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander, 1980). Entre los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Azotobacter*

y *Erwinia*, los que frecuentemente se encuentran en cantidad considerablemente mayor en la rizósfera que en el suelo no rizosférico (Rodríguez & Fraga, 1999).

Producción de fitohormonas

Uno de los mecanismos más relevantes de las PGPB es la producción de fitohormonas. Algunas especies de *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizósfera de las plantas, lo que estimula el crecimiento, especialmente al estado de plántula (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Las auxinas regulan varios procesos fisiológicos:

- Promueven el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto, el crecimiento en longitud de la planta.
- Estimulan el crecimiento y maduración del fruto
- Regulan el geotropismo
- Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes
- Intervienen en la dominancia apical

Producción de sideróforos

Las PGPB suelen producir sideróforos, metabolitos que les permiten competir con los patógenos y otras bacterias saprófitas (Weller, 1988). Los sideróforos son compuestos secretados por las bacterias que quelan el Fe^{+3} , y de esta forma este nutriente deja de estar disponible para el resto de los microorganismos del suelo (O'Sullivan & O'Gara, 1992). La capacidad de los sideróforos de inhibir a los patógenos depende de la planta, del organismo fitopatógeno, de la composición del suelo, de la especie de PGPB y de la afinidad del sideróforo por el hierro (Glick *et al.*, 2007).

Además de los mecanismos mencionados, relacionados a la promoción del crecimiento vegetal, en este estudio se consideró la evaluación de características que son de importancia en cuanto a la sobrevivencia de las bacterias en el ambiente y a la habilidad para colonizar nichos y superficies vegetales, como por ejemplo: la capacidad para formar biopelículas (*biofilms*) y autoagregarse (Sorroche *et al.*, 2012). Estas se consideran ventajas ecológicas, debido a que la

rápida colonización de espacios impide o limita el desarrollo de otros microorganismos competidores.

Biofertilización

Los productos denominados Biofertilizantes, o Bioplaguicidas o Bioestimulantes según su funcionalidad, están siendo cada vez más utilizados en la agricultura mundial como complemento o alternativa al uso de los plaguicidas tradicionales. Sin embargo, la literatura científica y técnica no arroja claridad respecto de definiciones formales de estos conceptos, nominaciones, propiedades y eventuales riesgos para la salud de la población asociados a su uso, ni tampoco es clara la traducción de este tipo de productos en otros idiomas.

En nuestra legislación se define como fertilizantes de naturaleza biológica a aquellos que contienen organismos viables que suministran directa o indirectamente nutrientes a la planta o que ejercen una acción beneficiosa para el desarrollo de los vegetales (art 3° decreto 1624/80, ley 20466, ley de fiscalización de fertilizantes y enmiendas).

La biofertilización se aplica a un gran número de especies de interés agronómico (cereales, leguminosas, hortícolas, forestales, pastoriles) y proporciona ventajas con respecto a la aplicación de fertilizantes químicos como: menores costos de producción que conllevan una mayor productividad y menor impacto ambiental que logra mayor sostenibilidad de los sistemas agrícolas a nivel local y global (Sanjuán Pinilla & Moreno Sarmiento, 2010). Además, la biofertilización es imprescindible en la agricultura orgánica, con el consiguiente valor agregado de las producciones en los mercados ecológicos.

Construcción de la hipótesis:

Se han encontrado bacterias endófitas en todas las plantas que se han estudiado hasta el momento y si bien establecen distintos tipos de interacciones con estas, en general son benéficas. Los endófitos establecen interacciones con las plantas, algunos de los cuales promueven el crecimiento de las mismas, mientras que otros ejercen un efecto benéfico al antagonizar y por ello controlar poblaciones de patógenos, reduciendo de esta manera el impacto de las enfermedades. Un aspecto clave es conocer más profundamente la ecología de los endófitos y sus interacciones, debido a que es claro que el uso de las bacterias endófitas para promover el crecimiento de los cultivos depende fuertemente del aislado y del ambiente (características edáficas y climáticas) del área de cultivo en los que serán introducidas por inoculación, además depende del genotipo del cultivo, del manejo del mismo, y aún más importante del microbioma circundante. En virtud de todo lo expuesto se plantea el presente plan de trabajo que consiste en aislar e identificar bacterias endófitas provenientes de semillas de tomate con potencial para promover el crecimiento vegetal.

Hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

“Entre las bacterias endófitas de las semillas se encuentran algunas con actividad promotora del crecimiento vegetal que además difieren en los mecanismos que emplean.”

Objetivos generales:

El crecimiento de las plantas resulta de la interacción de las mismas con microorganismos saprófitos, simbióticos y endófitos. Por ello el objetivo general de este plan es:

“Aislar e identificar organismos con capacidades metabólicas que contribuyan al crecimiento de las plantas de manera que los mismos sean insumos para la formulación de productos biológicos para los cultivos.”

Objetivos específicos:

- 1- Aislar bacterias endófitas de semillas de tomate.
- 2- Evaluar la capacidad de las bacterias endófitas para promover el crecimiento vegetal.
- 3- Evaluar posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de endófitos

Se emplearon semillas de tomate de las variedades Elpida F1 (Enza Zaden) y Silverio (Syngenta-Rogers). Estas se desinfectaron superficialmente con etanol (50 %) e hipoclorito de sodio (20 %) y luego se enjuagaron con agua estéril. Para confirmar el protocolo de desinfección superficial, alícuotas de agua estéril usada en el lavado final se sembraron en TSA (Agar tróptico de soja) a 28 °C durante 15 días y las placas fueron examinadas para detectar la presencia de colonias microbianas (Ahmad *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2001).

Las muestras de semillas se maceraron en mortero estéril con 6 ml de solución acuosa (0,9 % NaCl). El extracto se incubó durante 3 horas a 28 °C, para contribuir a la liberación completa de microorganismos endófitos desde el material vegetal. El extracto obtenido se diluyó en una suspensión acuosa (0,9 % de NaCl) y se plaqueó en medio TSA, King B y agar nutritivo. Las placas se incubaron durante un máximo de 5 días a 28 °C. Las colonias se seleccionaron al azar, por su diferente morfología, a los 2 y 5 días de incubación y se purificaron en los medios de cultivo correspondientes. Los cultivos puros se almacenaron en picos de flauta a 4 °C.

Parte de las semillas esterilizadas fueron sembradas en condiciones asépticas en tubos con medio de cultivo agar nutritivo semisólido. Se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura hasta el desarrollo de las primeras hojas. En ese momento fueron extraídas del medio de cultivo, y se procesaron de manera similar a las semillas para el aislamiento de endófitos.

Identificación taxonómica de los endófitos que componen el microbioma cultivable de las semillas de tomate.

Extracción, purificación y cuantificación del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial Wizard[®], Promega Co. WN USA. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de los proveedores de dicho kit. Las bacterias

se cultivaron en 5 ml de caldo nutritivo a 28 °C por 4 días. Las células se cosecharon por centrifugación a 11.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 600 µl de solución de lisis nuclear, se mezcló en agitador tipo vortex durante 1-3 segundos y se incubó 5 minutos a 80 °C. Luego, se adicionaron 3 µl de RNasa (10 µg/µl) a temperatura ambiente y se incubó la mezcla a 37 °C durante 30-60 minutos. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas y se mezcló 20 segundos en vortex. Luego de centrifugar 3 minutos a 13.000-16.000 g se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. El ADN se precipitó adicionando 1 volumen de isopropanol que se mezcló por inversión y luego se centrifugó a 13.000 -16.000 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 600 µl de etanol 70 %. El ADN se resuspendió en un volumen de 50 µl de Solución de Rehidratación incubando las muestras a 65 °C durante 1 hora.

Visualización y cuantificación del ADN extraído

El ADN se cuantificó mediante la comparación de la intensidad de la banda del ADN genómico con las bandas del marcador molecular (Genoma del fago Lambda digerido con *Hind* III - Promega Biotech), que se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 0.7 % (P/V) suplementado con bromuro de etidio, observándose las bandas en un transiluminador de UV (Sambrook, *et al.*, 1989). Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes SYNGENE y el software GENETOOLS (Syngene, A Division of Synoptics Ltd).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una tecnología que consiste en la síntesis de un fragmento de ADN (ácido desoxirribonucleico) cuyo tamaño está definido por un par de primers que flanquean la secuencia "blanco" en el ADN utilizado como molde para la reacción. El proceso se denomina amplificación porque consiste en aumentar exponencialmente la cantidad del fragmento amplificado, puesto que la enzima, que es termoestable, puede generar en presencia de un exceso de nucleótidos una cantidad creciente de copias. La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica,

rápida, sensible y versátil que permite detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico posibilitando su identificación.

Amplificación del gen 16S rDNA

La secuencia de los genes ribosomales codifican para la síntesis de ARN ribosomales que constituyen junto con algunas proteínas las subunidades de los ribosomas. En las bacterias el gen *16S rDNA*, posee alrededor de 1,5 kilopares de bases (kpb). Esta secuencia está altamente conservada y organismos no relacionados pueden tener homologías del 97 % en este gen. Por este motivo se la utiliza frecuentemente para establecer homologías con secuencias de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology International - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Amplificación parcial del gen 16S rDNA

La amplificación se llevó a cabo utilizando los primer universales 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Los primers mencionados fueron diseñados para amplificar un fragmento de aproximadamente 1.450 pb del extremo 5' del gen, y la reacción se realizó en base a un programa que consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, 45 segundos a 59 °C y 1 minuto a 72 °C, y por último, una elongación final de 5 minutos a 72 °C.

La mezcla de reacción contuvo buffer de reacción 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25 °C; 1 % Tritón X-100) (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN), 1,5 mM cloruro de magnesio (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN), 0,2 mM de cada dNTP (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN), 0,3 µM de cada primer, 1 unidad de T- *Plus* DNA polimerasa (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN) y 50 ng de ADN molde por reacción, en un volumen final de 15 µl.

Los fragmentos amplificados se purificaron de acuerdo al protocolo de precipitación de productos de PCR agregando un volumen de isopropanol y 10 % de acetato de amonio 8 M a la mezcla de reacción conteniendo el producto a secuenciar y posteriormente se incubó a -20 °C

durante 2 horas. Luego las muestras se centrifugan a 15.000 g durante 15 minutos. El ADN que queda adherido a las paredes del tubo se lava con etanol 70 %, luego se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril. Las dos hebras del fragmento de ADN amplificado por PCR fueron secuenciadas en Macrogen Inc. Seúl, Korea de acuerdo a la reacción descrita por Sanger y colaboradores (1977). El secuenciador automático BigDye™ se basa en la detección de la fluorescencia, permitiendo la lectura de hasta 1000 bases en una única reacción.

Las secuencias se analizaron con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales de secuencias nucleotídicas (*nucleotide basic local alignment tool*, BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante comparación con secuencias depositadas en la base de datos *Nucleotide collection* (nr/nt).

Caracterización fisiológica de los aislados.

Medio selectivo para solubilizadores de P (PIM).

La capacidad de solubilizar P inorgánico se evaluó en medio de cultivo sólido suplementado con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como fuente de fósforo insoluble (Tabla 1). Se determinó la capacidad solubilizadora por la formación de halo transparente alrededor de las colonias solubilizadoras de P (Goldstein, 1986; Subba Rao, 1999).

Tabla 1. Medio PIM

Componentes	Concentraciones (g/l)
Glucosa	10
MgSO ₄	1
NaCl	1
NH ₄ Cl	5
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar	18
pH	7

Producción de Ácido Indol-3-Acético (AIA)

Para evaluar la capacidad de producción de AIA se realizaron los siguientes pasos:

1. Los aislados se repicaron en caldo nutritivo suplementado con 0,02 % de triptófano (Gordon & Weber, 1951; Yagi *et al.*, 2000).
2. Los cultivos se incubaron en agitación continua a 28 °C durante 5 días.
3. Se extrajo una alícuota y se determinó la producción de AIA según el test de Salkowsky como lo describen Gordon y Weber (1951) a 530 nm (Agente: 0,01 M de FeCl₃ en 35 % de HClO₄).

El test de Salkowski se utiliza para la determinación de la auxina y consiste en una reacción colorimétrica que revela la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas (Mayer, 1958). La respuesta positiva consiste en la aparición de una coloración que va desde el rosa claro a intenso, en función de la concentración de AIA presente.

Fijación de Nitrógeno

Se empleó el medio de cultivo NFb (Döbereiner *et al.*, 1976) el cual carece de nitrógeno, que permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente N₂. Además, contiene ácido málico, principal fuente de carbono.

Tabla 2. Medio NFb

Componentes	Concentraciones (g/l)
Ácido málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Solución de micronutrientes	2 ml
Azul de bromotimol sol 0,5 % en KOH 0,2 N	2 ml
Fe EDTA sol 1,64%	4 ml
KOH	4,5
Solución vitamínica	1 ml

Medio selectivo para productores de sideróforos (Agar CAS)

La determinación de sideróforos se realizó en medio de cultivo sólido conteniendo Cromo Azurol S (CAS) (Tabla 3), para la preparación de la misma se agregan 10 ml de la solución CAS cada 100 ml de agar Cetrimide comercial (Britania®). La solución y el medio Cetrimide se esterilizan por separado en autoclave. El componente denominado PIPES es ácido 1,4-piperazinediethanesulfónico – $C_8H_{18}N_2O_6S_2$).

Los cultivos bacterianos se sembraron y se incubaron a 28 °C durante 5 días. La producción de sideróforos se confirma por la formación de un halo color naranja alrededor de la colonia bacteriana (Alexander & Zuberer, 1991).

Tabla 3. Solución CAS (70 ml) *

Componentes	Volumen (ml)
Pipes (0,3024g/10ml de solución salina, pH 6,8 con KOH)	10
0,028 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ + 30 μ l de HCl, en 100 ml de H_2O	10
CAS (0,061 g en 50 ml)	50

Determinación de la promoción del crecimiento en plantas de tomate.

Se realizaron 2 ensayos en plantines de tomate (cultivar comercial Elpida) con diferentes soportes (Agar agua 0,5 % P/V y vermiculita/suelo 50 % P/P). El primero consistió en un *screening* de los aislados (n= 21) en tubos de *Crone* utilizando como soporte solución nutritiva Jensen agarizada (Vincent, 1970). En los tubos se colocaron semillas esterilizadas superficialmente y pregerminadas que se inocularon con cultivos bacterianos líquidos en una concentración de 1×10^7 ufc.ml⁻¹. Se incluyeron en este ensayo un control sin inocular (testigo), y un control positivo con *P. fluorescens* (Pf), debido a que posee conocidas características como PGPR. Los aislados con mayor potencial de promoción de crecimiento fueron empleados como tratamientos en un ensayo que se realizó en macetas.

El diseño estadístico fue el de un ensayo completamente al azar de 10 tratamientos y 9 repeticiones de los mismos. Luego de la cosecha (45 días) se realizaron determinaciones destructivas incluyendo volumen radicular, peso fresco y peso seco aéreo y de la raíz (Heuvelink,

1995; Hunt *et al.*, 2002).

- Volumen de raíces (VR): En el momento de la cosecha se cortaron las raíces y se lavaron para eliminar los restos de sustrato. Luego se determinó el volumen midiendo el volumen de agua desplazado al introducirlas en probetas con un volumen conocido de agua.
- Peso fresco: luego de la cosecha se separaron la raíz y la parte aérea y se obtuvo el peso fresco radicular (PFR).
- Peso seco (raíz y parte aérea): luego de la cosecha se separaron la parte aérea y la raíz, se colocaron en sobres de papel, y se secaron en estufa a 60 °C, hasta peso constante. Luego se pesaron en forma individual las partes secas aérea (Peso Seco Aéreo - PSA) y de raíz (Peso Seco de Raíz - PSR).

Todas las mediciones fueron analizadas estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA (análisis de varianza de una vía) con nivel de significancia menor a 0,05 ($P < 0,05$). A partir de muestras de igual tamaño. Se aplicaron test de rangos para identificar grupos homogéneos. El test elegido fue el *test LSD (Least significant difference)* de Fisher ($P < 0,05$) para comparaciones múltiples.

Ensayos de biofilm y autoagregación

Las bacterias se cultivaron en 2 ml de caldo nutritivo durante 24 horas a 28 °C en agitación a 150 rpm. Luego se diluyeron los cultivos 1/100 en caldo nutritivo y se incubaron 48 h en las mismas condiciones. La suspensión bacteriana (5 ml) se transfirió a un tubo de vidrio (10 mm por 70 mm) y se dejó reposar durante 24 horas a 4 °C. Luego se transfirió una alícuota de 0,2 ml de la porción superior de la suspensión a una placa de microlitros y se midió la densidad óptica final a 630 nm ($OD_{\text{final } 630\text{nm}}$). Se agitó con vortex un tubo de control durante 30 segundos y se determinó la $DO_{630\text{nm}}$ inicial (OD_{inicial}). El porcentaje de autoagregación se calculó de la siguiente manera: $100 \times [1 - (OD_{\text{final}}/OD_{\text{inicial}})]$ (Sorroche *et al.*, 2012).

La formación de biofilm se determinó macroscópicamente mediante un ensayo cuantitativo con placas de microtitulación de 96 pocillos, donde las biopelículas se tiñeron con cristal violeta

(CV) según el método descrito previamente por O'Toole y Kolter, con modificaciones (Sorroche *et al.*, 2012). Las bacterias se cultivaron en 2 ml de caldo nutritivo y se incubaron con agitación durante 48 h a 28 °C. Los cultivos se diluyeron con medio nuevo para dar una OD 630 nm de 0,1. Se añadieron 100 µl de la suspensión a cada pocillo y se incubaron con agitación durante 24 h 28 °C. El crecimiento bacteriano se cuantificó midiendo el OD 630nm. Las células se eliminaron suavemente, se añadieron 180 µl de solución acuosa CV (0,1 %, p/v) y la tinción continuó durante 15 minutos. Cada pocillo teñido con CV se enjuagó cuidadosa y repetidamente con agua y luego se adicionaron 150 µl de etanol al 95 %. La OD 560nm de CV solubilizado se midió con un lector automático MicroELISA (Kartell™ - Fisher Scientific). Paralelamente, se realizaron cultivos de control estéril con caldo nutritivo.

En el ensayo de autoagregación se realizaron seis repeticiones para cada cepa seleccionada. Para los ensayos de biofilm, cada cepa se sembró en al menos 12 pocillos de cada placa de microtitulación. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una comparación de niveles de tratamiento múltiples con el control mediante el uso de la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Infostat, versión 1.0.

RESULTADOS

Aislamiento e Identificación taxonómica de los endófitos.

De la totalidad de colonias que desarrollaron sobre los medios de cultivo y luego de la selección realizada, se obtuvieron 21 aislados bacterianos en total, 11 provenientes de semillas y plantines del cultivar Elpida y 10 del cultivar Silveiro.

Las secuencias del gen *16S rDNA* permitieron identificar los aislados y mediante el empleo del software Geneious (versión 9.0.5) se generaron los gráficos (Figura 2 A y B) que muestran la ubicación taxonómica y la abundancia (%) de cada endófito proveniente de las semillas de tomate de los cultivares Elpida y Silverio respectivamente. En la tabla 4 se presentan los resultados del alineamiento de las secuencias en comparación con la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando la herramienta BLAST® (*Basic Local alignment Search Tool*) de la misma base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

En la figura 2 se muestra un análisis conjunto de los aislados obtenidos de cada cultivar (semillas y plántulas). Este gráfico generado con el software Geneious (versión 9.0.5) muestra el alineamiento de todas las secuencias con la base de datos del NCBI, representado el porcentajes en que bacterias de cada género fueron aisladas de los cultivares de tomate en estudio. De ambos cultivares, Elpida y Silverio, se aislaron principalmente Firmicutes (76 % y 78 %, respectivamente). Sin embargo, el resto de los aislados del cultivar Elpida pertenecen a géneros de los *Phyla* Actinobacteria (16 %) y Proteobacteria (8 %) (Figura 2A), mientras que en Silverio los demás géneros bacterianos aislados pertenecen al *Phylum* Proteobacteria (22 %) (Figura 2B). Es decir que si bien existen diferencias en la composición de bacterias endófitas cultivables presentes en ambos cultivares, en ambos fueron predominantes las bacterias del *Phylum* Firmicutes.

En un análisis más detallado se observó que, de semillas Elpida se aislaron Firmicutes (80 %) y Actinobacteria (20 %). Mientras que de plántulas obtenidas de este cultivar se aislaron Firmicutes (72 %), Actinobacteria y Gamma-Proteobacteria (14 % c/u). Los géneros de Actinobacteria encontrados fueron *Micrococcus* y *Microbacterium* y de Gamma-Proteobacteria se aisló un integrante del género *Acinetobacter* (Tabla 4).

Por otro lado, de semillas Silverio se aislaron nuevamente un número mayoritario de Firmicutes (67 %) y dos géneros (*Sphingomonas* y *Brevundimonas*) de Alpha-Proteobacterias (33 %); mientras que de plántulas de este cultivar solo se recuperaron Firmicutes (100 %) (Tabla 4).

Dentro de los Firmicutes aislados de semillas y plántulas de ambos cultivares se encontraron representantes de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacillus* y *Jeotgalibacillus* (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación de las bacterias aisladas, obtenidas de las semillas de tomate por medio del análisis de la secuencia 16S rDNA.

Aislado (origen)	NCBI (Numero de acceso)	Identidad (%)
4 (Semilla Elpida)	<i>Micrococcus</i> sp. (MG963203)	99
6 (Semilla Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963204)	92
7 (Semilla Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963205)	99
8 (Semilla Elpida)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (MG963206)	99
9 (Semilla Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963207)	98
15 (Semilla Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963209)	99
19 (Semilla Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963210)	99
20 (Semilla Silverio)	<i>Sphingomonas</i> sp. (MG963211)	96
21 (Semilla Silverio)	<i>Brevundimonas</i> sp. (MG963212)	99
26 (Semilla Silverio)	<i>Paenibacillus</i> sp. (MG963213)	91
27 (Semilla Silverio)	<i>Jeotgalibacillus</i> sp. (MG963214)	99
28 (Plantin de Elpida)	<i>Acinetobacter</i> sp. (MG963215)	98
31 (Plantin de Elpida)	<i>Microbacterium</i> sp. (MG963216)	99
33 (Plantin de Elpida)	<i>Paenibacillus</i> sp. (MG963217)	99
34 (Plantin de Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963218)	99
35 (Plantin de Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963219)	99
36 (Plantin de Elpida)	<i>Psychrobacillus</i> sp. (MG963220)	97
37 (Plantin de Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963221)	98
38 (Plantin de Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963222)	99
39 (Plantin de Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963223)	99
41 (Plantin de Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963224)	96

Caracterización fisiológica de los aislados.

En la tabla 5 se puede observar la caracterización fisiológica de los endófitos. Estas características son comúnmente evaluadas para determinar el potencial de promover el crecimiento vegetal de las mismas. Algunas cepas resultaron positivas para más de una de las características. Como tratamiento destacado, la cepa 7 presentó respuestas positivas en todas las variables analizadas (Figura 3).

Tabla 5. Caracterización fisiológica de los aislados.

Aislado	Fuente	Producción de AIA	Producción de Sideróforos	Solubilización de fósforo	Crecimiento en medio NFb
4	Semillas de Elpida				+
7		+	+	+	+++
8		+			+
9					+++
15	Semillas de Silverio	+			+
19		+			
27		+			+++
28	Plantín de Elpida	+	+		+
31					+
35		+			
36		+			+
37		+			+
38	Plantín de Silverio	+			
39					+++
41					+

Los aislados 6, 20, 21, 26, 33 y 34 que no figuran en la tabla no presentaron ninguna de estas características.

**Figura 3.** Evaluación de los endófitos en Medio NFb para fijación de N.

Determinación de la promoción del crecimiento en plantas de tomate.

En el primer ensayo en tubos de Crone se determinó longitud de las plántulas y peso seco aéreo (PSA) como parámetros para evaluar la promoción del crecimiento. A partir de estos resultados se seleccionaron un subgrupo de cepas con las que se repitió el ensayo en macetas. Además, se consideró elegir al menos dos representantes de aislados de semillas y plántulas de cada cultivar empleado. Los aislados seleccionados fueron: 4 (*Micrococcus*), 6 (*Bacillus*), 8 (*Paenibacillus*), 15 (*Bacillus*), 21 (*Brevundimonas*), 28 (*Acinetobacter*), 31 (*Microbacterium*), 36 (*Psychrobacillus*), 38 (*Bacillus*) y 39 (*Bacillus*).

En el ensayo realizado en macetas (Figura 4) se evaluó el peso fresco de la raíz (PFR) y volumen de raíz, PSA y peso seco de raíz (PSR).



Figura 4. Ensayo realizado en macetas con plantas inoculadas con bacterias endófitas aisladas de semillas de tomate.

Las plantas inoculadas con las cepas 39 y 38, provenientes de plántulas del cultivar Silverio, presentaron un PSA mayor al resto de los tratamientos (Figura 5). Por otro lado, los restantes tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto del control sin inocular, incluso las cepas 8 y 21 parecen inhibir el crecimiento aéreo.

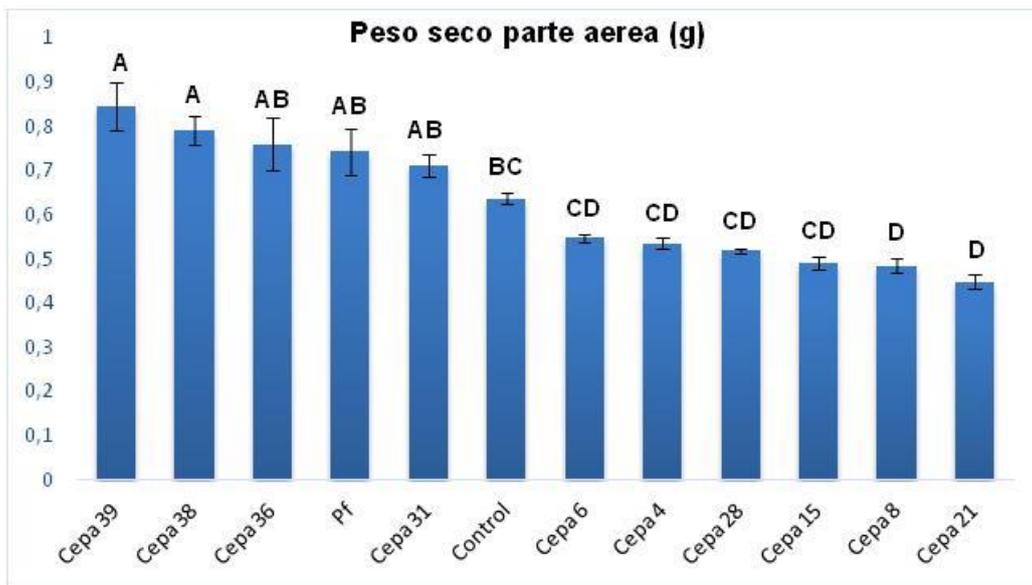


Figura 5. Peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas aisladas de las semillas y plántulas de tomate. Pf: *Pseudomonas fluorescens*, cepa control. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, evaluado mediante el test LSD de Fisher ($P < 0,05$). Los datos corresponden a la media y las barras de error al desvío estándar.

Todos los tratamientos (a excepción de los tratados con los aislados 28 y 36) mostraron un PFR significativamente mayor al del control sin inocular ($P \leq 0,05$). Las plantas inoculadas con los aislados 6, 15 y 4 presentaron mayor PFR, comparados con los demás tratamientos incluyendo los controles Pf y sin inocular (Figura 6).

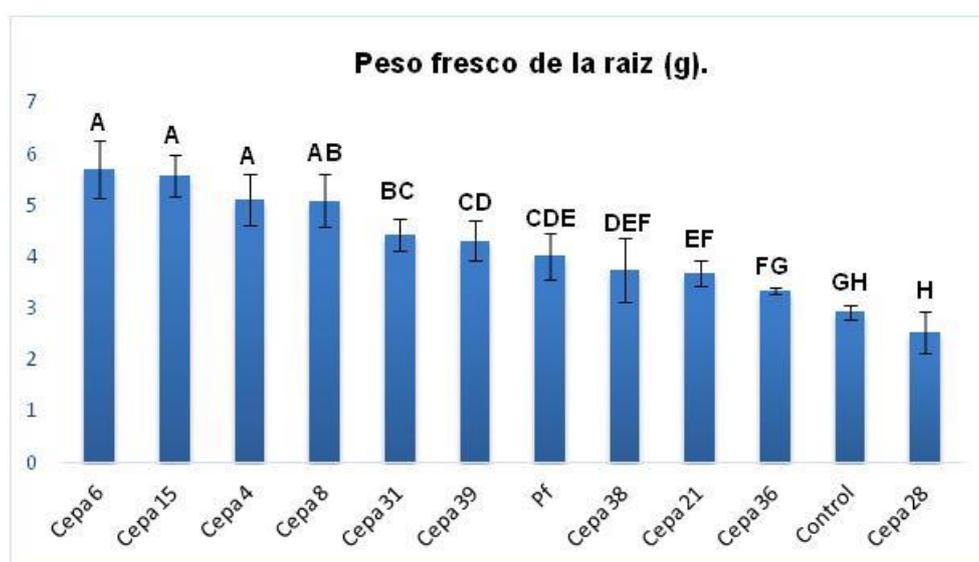


Figura 6. Peso fresco de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas aisladas de las semillas y plántulas de tomate. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, evaluado mediante el test LSD de Fisher ($P < 0,05$). Los datos corresponden a la media y las barras de error al desvío estándar.

En lo que hace al peso seco de la raíz se observó que las plantas inoculadas con los endófitos 15, 6, 4, 39, 8 y 31 presentaron diferencias significativas con respecto al control sin inocular. Cabe señalar que los aislados 15 y 6, presentaron un PSR significativamente mayor al control positivo Pf ($P \leq 0,05$) (Figura 7).

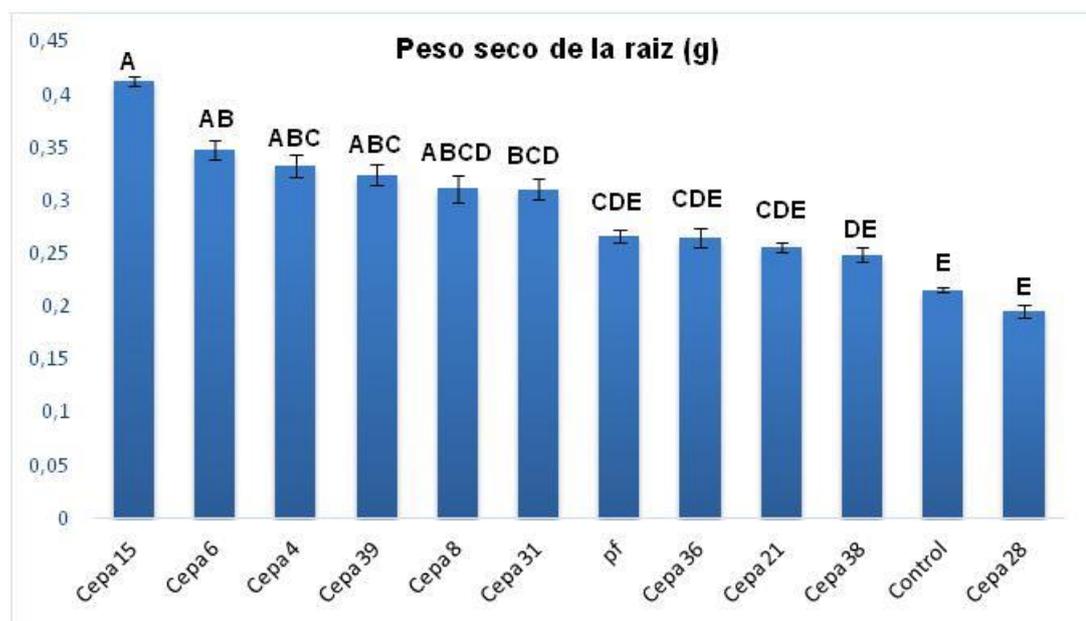


Figura 7. Peso seco de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas aisladas de las semillas y plántulas de tomate. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, evaluado mediante el test LSD de Fisher ($P \leq 0,05$). Los datos corresponden a la media y las barras de error al desvío estándar.

Las plantas jóvenes de tomate tienen una raíz pivotante, sin embargo, luego de la inhibición de la misma, el desarrollo de las raíces secundarias es tan importante que se hace difícil distinguir la raíz principal de las secundarias. Por ello se consideró que el volumen de raíces (Figura 8) es buen parámetro para analizar el crecimiento radicular. Se observó que los tratamientos 8, 15, 6, 4, 39 y Pf generaron aumentos significativamente mayores en el volumen de raíces con respecto al control sin inocular (Figura 9).

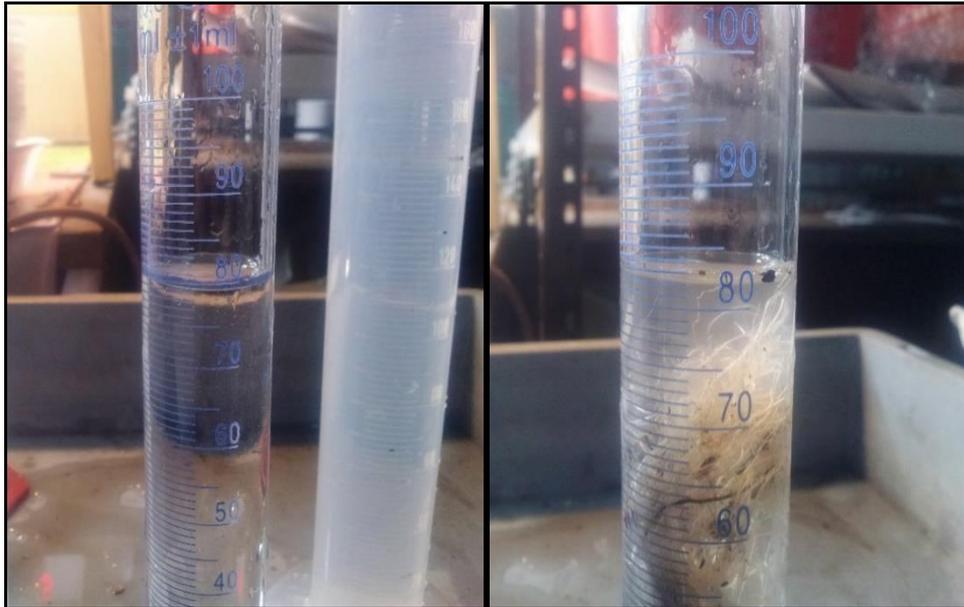


Figura 8. Medición del volumen radicular mediante el volumen de agua desplazado.

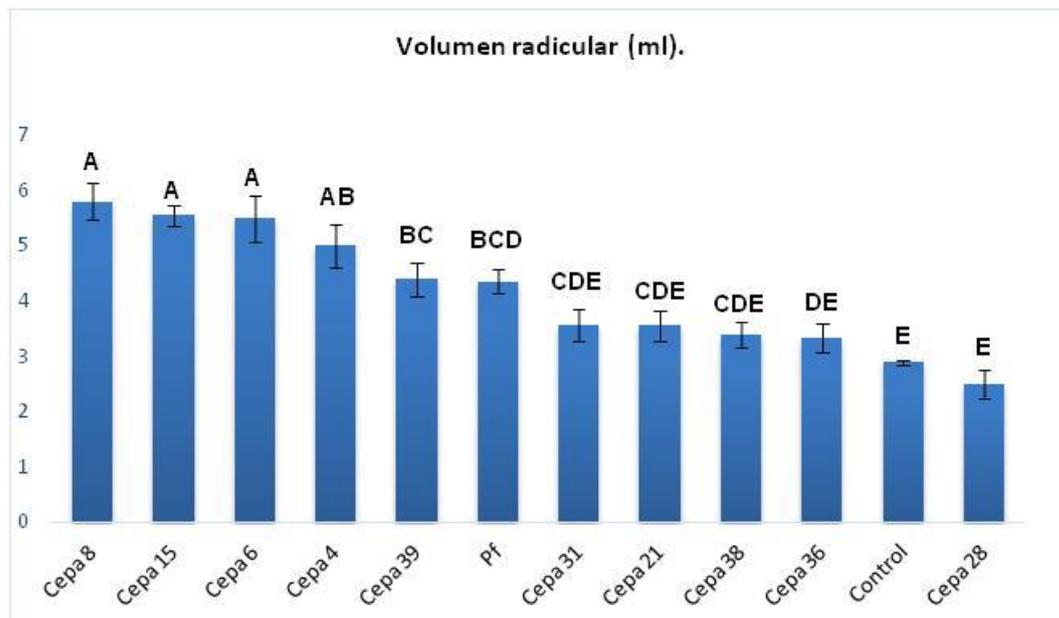


Figura 9. Volumen radicular de las plantas inoculadas con las cepas aisladas de las semillas y plántulas de tomate. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, evaluado mediante el test LSD de Fisher ($P \leq 0,05$). Los datos corresponden a la media y las barras de error al desvío estándar.

Formación de biopelícula (*biofilm*) y autoagregación

Los aislados que mostraron mayor potencial en la promoción del crecimiento vegetal (4, 6, 8, 15 y 31) fueron evaluados en cuanto a la formación de biopelículas y autoagregación (Figura 10).

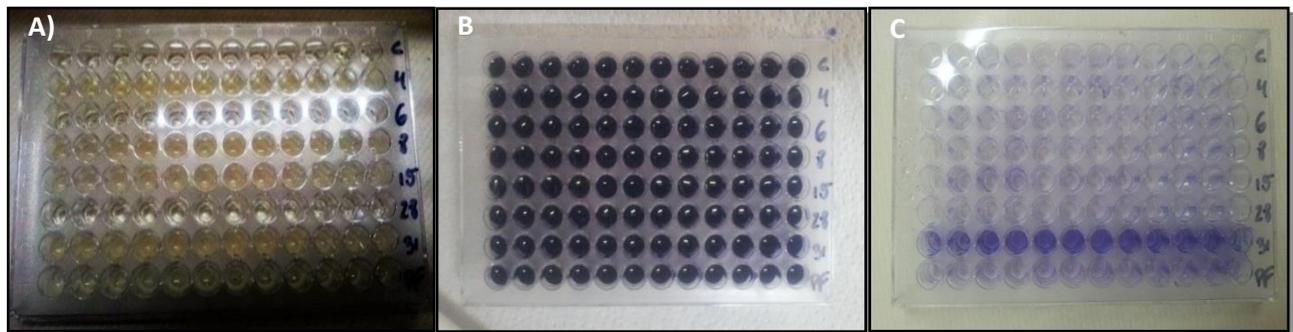


Figura 10. Ensayo de biofilm. **A)** Cultivos bacterianos previos a la tinción. **B)** Tinción con cristal violeta. **C)** Biopelícula formada por las bacterias.

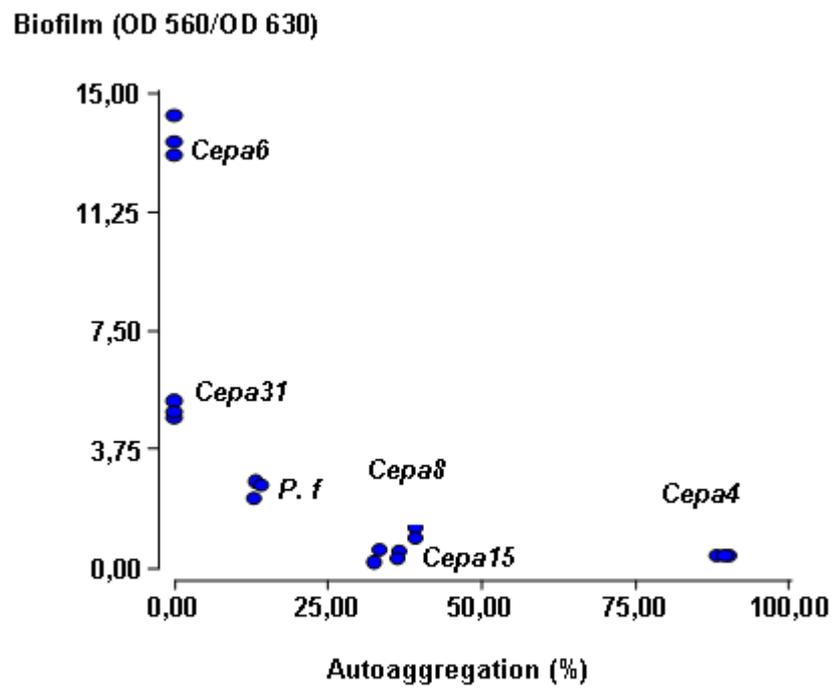
La capacidad de autoagregación de los aislados, de manera similar a lo que ocurrió con la capacidad de formación de biofilm, presentó heterogeneidad en los fenotipos (Tabla 6), con valores muy dispersos entre las cepas.

Tabla 6. Resultados de los ensayos de biofilm y autoagregación.

Aislamiento	Biofilm (OD_{560nm}/OD_{630nm})	Autoagregación (%)
4	0.38 + 0,02	89.41 + 1.08
6	13.58 + 0.62	0
8	0.44 + 0.23	34.16 + 2.33
15	0.86 + 0.52	38.14 + 1.55
31	5.00 + 0.26	0
PF	2.51 + 0.26	13.54 + 0.55

Se realizó un análisis de correlación para determinar si las capacidades de autoagregación y formación de biofilm, de las cepas de nuestra colección, estaban cuantitativamente relacionadas por el fenotipo. Se generó un diagrama de dispersión (Figura 11) y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Se observó una correlación inversa estadísticamente significativa entre los dos fenotipos ($r \geq -0.64$, $P \leq 0.05$): cepas formadoras de biofilm y cepas con capacidad de autoagregación. Probablemente debido a que las interacciones célula-célula involucradas en

ambos procesos (formación de biofilm y autoagregación) no dependen de las mismas fuerzas adhesivas.



Pearson correlation coefficient (r)

Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor <0.05
Biofilm	Autoaggregation	18	-0.64	0.0046

Figura 11. Diagrama de dispersión y coeficiente de correlación de Pearson, para las variables de autoagregación y biofilm de los endófitos.

DISCUSIÓN

Las bacterias endófitas son microorganismos que pueden colonizar los tejidos de las plantas intercelularmente y coexisten de manera benigna (Kloepper & Beachamp, 1992). Las semillas constituyen la principal estructura de las plantas para la supervivencia de las especies a lo largo del tiempo y desempeñan un papel clave en la agricultura. También son el vehículo de una variedad de endófitos, que pueden ser patógenos como también bacterias beneficiosas (Nelson, 2004). Cuando las semillas germinan, se produce el desarrollo de estas comunidades microbianas endófitas que suelen enriquecerse con microorganismos provenientes de los suelos (Truyens *et al.*, 2015).

En este trabajo analizamos bacterias endófitas cultivables, aisladas de semillas y plántulas de dos variedades comerciales de tomate. No se observó una gran diversidad de especies bacterianas, como se ha encontrado en semillas de otras especies de plantas (vid, arroz) (Mano *et al.*, 2006; Compant *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017). Por otro lado las bacterias aisladas fueron similares en cuanto a los *Phyla* identificados, tanto los provenientes de semillas como de plántulas de ambos cultivares de tomate. Esto sugiere que las semillas de tomate podrían tener un subconjunto de bacterias que forman parte de las semillas a lo largo del desarrollo reproductivo y que podrían ejercer roles específicos en la promoción del crecimiento de las plántulas. Las semillas fueron en su mayoría colonizadas por Firmicutes, este *Phylum* también se encontró en mayor proporción dentro de las plántulas. Dentro de este *Phylum* las especies que se identificaron fueron: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacillus* y *Jeotgalibacillus*, todas ellas capaces de formar endosporas, lo que podría explicar su alta representación en semilla. Es decir, la capacidad de formar endosporas confiere una ventaja a los colonizadores de semillas ya que esto asegura su supervivencia durante el almacenamiento (Compant *et al.*, 2011; Tuyens *et al.*, 2015). Probablemente el proceso de maduración de la semilla no seleccione las bacterias en función a sus propiedades, pero la diversidad, al menos de las cultivables, parece estar influenciada por su capacidad de esporular. Mano y colaboradores (2006) encontraron que los aislados Gram negativos predominaron en las primeras etapas del desarrollo de la semilla y aparecieron aislados Gram positivos en mayor número a medida que las semillas maduraban. En este sentido, aislamos

el 18 % de Gram negativas (*Sphingomonas* y *Brevundimonas*) y el 82 % de las bacterias Gram positivas en semillas (de ambos cultivares), mientras que en las plántulas (Elpida y Silverio) el 90 % de las bacterias fueron especies Gram positivas y solo el 10 % Gram negativas (*Acinetobacter*). Evidentemente, se producen algunos cambios a lo largo de la germinación de la semilla y del desarrollo de las plántulas que promueven ciertos grupos de microorganismos (Truyens *et al.*, 2015). El proceso de germinación de semillas requiere el consumo de sustancias de reserva, esta alta exigencia de nutrientes genera un ambiente estresante para las bacterias y como resultado, solo aquellos que pueden esporular sobreviven mucho mejor en esta situación (Truyens *et al.*, 2015).

En general, los géneros bacterianos que se han descrito en las semillas de diferentes plantas son *Bacillus* y *Pseudomonas*. También se encuentran a menudo *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pantoea* y *Acinetobacter* como endófitos de semillas (Cankar *et al.*, 2005; Mano *et al.*, 2006; Compant *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014; Tuyens *et al.*, 2015). En este trabajo se encontró que las semillas de tomate albergan especies bacterianas endófitas similares a las reportadas para otras especies de plantas, lo que sugiere que podría ser una estrategia de dispersión dentro del medio ambiente.

Los endófitos probablemente brinden beneficios a las plantas hospedadoras a través de varios mecanismos, como la síntesis de sustancias antimicrobianas o la síntesis de promotores del crecimiento vegetal. Por ello, se planteó realizar una serie de determinaciones para evaluar el crecimiento vegetal en las plantas inoculadas con las bacterias endófitas, entre las que se incluyen Peso seco aéreo, Peso radicular, Volumen de raíz entre otros. El potencial de los microorganismos para promover el crecimiento de la planta fue característico de los aislados 4 (*Micrococcus*), 6 (*Bacillus*), 8 (*Paenibacillus polymyxa*), 15 (*Bacillus*) y 31 (*Microbacterium*). La mayor promoción del crecimiento radical de las plantas inoculadas con los endófitos pudo deberse a la producción de ácido indol-3-acético (AIA). Varios autores coinciden que el AIA producido por las cepas inoculadas es el principal metabolito que induce el crecimiento de las plantas al aumentar la división celular en las raíces y la diferenciación de tejidos, efectos que se ven reflejados en una mayor formación de

biomasa (Lagunas *et al.*, 2001; Santillana *et al.*, 2005). Dentro del grupo de cepas con potencial para promover el crecimiento vegetal se encontró que la cepa 8 (*Paenibacillus polymyxa*) y 15 (*Bacillus*) produjeron AIA y desarrollaron en el medio NFb que se utiliza para seleccionar microorganismos que podrían realizar fijación de nitrógeno. Por lo tanto estos son mecanismos que podrían explicar este aumento en la biomasa radicular y que han sido descritos en trabajos en los que se han encontrado representantes de estos géneros dentro de los tejidos de las plantas que también promueven el crecimiento vegetal (Compant *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017).

Las actinobacterias como *Micrococcus* y *Microbacterium*, se encuentran con frecuencia dentro de la rizósfera, donde desempeñan un papel crucial debido a sus interacciones con las plantas. Tales interacciones han permitido caracterizarlas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, con diversidad de mecanismos (Franco-Correa & Chavarro-Anzola, 2016). Sangthong y colaboradores (2016) encontraron que representantes de *Micrococcus sp.* promovieron la longitud de las raíces y los brotes, así como la biomasa de los brotes en plantas de maíz. Prapagdee y colaboradores (2013) encontraron que *Micrococcus sp.* promueve el crecimiento y la absorción de cadmio en suelos. En esta línea, también encontramos que *Micrococcus* y *Microbacterium*, aislados 4 y 31, respectivamente, promovieron el crecimiento de raíces y brotes de las plantas de tomate. Vilchez y colaboradores (2018) mostraron que en plantas de pimiento *Microbacterium sp.* promueve un aumento en la biosíntesis de azúcar que proporciona a las plantas un ajuste osmótico más eficiente aliviando así el efecto de estrés en las plantas hospedadoras. También *Microbacterium sp.* protege las plantas contra el estrés por sequía mientras viven dentro de las plantas (Vilchez *et al.*, 2018).

Al analizar todos los parámetros de crecimiento en conjunto se observó que la cepa 39 fue la que presentó un mayor PSA. Cabe señalar que esta cepa solo fue sobresaliente en el desarrollo de la biomasa aérea al igual que la cepa 38. Estas cepas con buen desempeño en el crecimiento de biomasa aérea pertenecen al género *Bacillus*. Se conoce que el efecto de promoción del crecimiento de plantas de *Bacillus* y *Paenibacillus* es el resultado de varios procesos complejos e interrelacionados que involucran mecanismos directos e indirectos como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y la producción de reguladores con efecto hormonal como el AIA (Ulrich *et*

al., 2008; Amar, 2016; Grady *et al.*, 2016). El efecto producido por la cepa 39 pudo deberse a la potencial capacidad para fijar nitrógeno encontrada en este trabajo. El mayor PSA se puede explicar también como una consecuencia de a una mayor disponibilidad o acceso a nutrientes, a que la bacteria podría sintetizar reguladores hormonales de crecimiento en las condiciones del ensayo (aún cuando no lo hizo en placa), o a que al destinar menos energía al desarrollo radicular tuvo más recursos para promover el crecimiento aéreo, fenómeno que se observa al comparar estas cepas con las demás ensayadas. También en este trabajo se demostró que los aislados de *Bacillus* 6 y 15 y de *P. polymyxa* 8 son promotores del crecimiento de las plantas. Tales bacterias comparten características clave como la capacidad de formación de esporas, siendo esta característica crítica para las aplicaciones comerciales con una larga vida útil (Compant *et al.*, 2011; Truyens *et al.*, 2015; Grady *et al.*, 2016).

Uno de los pasos claves durante la aplicación de bacterias PGPB como bioinoculantes en los cultivos, es la colonización efectiva de las raíces de las plantas. Las bacterias persisten en ambientes naturales formando biopelículas. Éstas son comunidades de células altamente estructuradas, encapsuladas en una matriz extracelular, unidas a una superficie (Timmusk, 2003; Sorroche *et al.*, 2012). Encontramos que los 5 aislados que fueron altamente eficientes para promover el crecimiento de las plantas (cepas 4, 6, 8, 15 y 31), forman algún tipo de agrupación de células (biofilm o autoagregación), lo que podría proporcionar una ventaja adaptativa para colonizar los tejidos vegetales. Más aún, en algunos casos como *P. polymyxa*, el desarrollo de biopelículas en las puntas de las raíces se ha demostrado que es crucial para que las bacterias penetren en los espacios intercelulares (Timmusk, 2003).

CONCLUSIONES

- Las semillas de tomate albergan especies bacterianas endófitas similares a las reportadas para otras especies de plantas, lo que sugiere que podría ser una estrategia de dispersión dentro del medio ambiente.
- Las semillas fueron en su mayoría colonizadas por Firmicutes. Probablemente el proceso de maduración de la semilla no seleccione las bacterias en función a sus propiedades, pero la diversidad, al menos de las cultivables, parece estar influenciada por su capacidad de esporular.
- Las bacterias Gram positivas sobreviven mejor durante el desarrollo de las plántulas.
- El potencial de los microorganismos para promover el crecimiento de la planta fue característico de los aislados 4, 6, 8, 15 y 31, pertenecientes a los géneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*.
- Las bacterias endófitas utilizan diferentes mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal que pueden contribuir tanto en el desarrollo radicular como en el crecimiento de la parte aérea de las plantas.
- Los aislados que tuvieron respuesta en la promoción del crecimiento radical podrían además tener mayor capacidad de colonización, evidenciada mediante la formación de biofilm y de autoagregación.

Los resultados obtenidos validan la importancia de continuar con la investigación, el estudio e identificación de especies endófitas que puedan emplearse como bioinoculantes, dado los beneficios que pueden traer estos microorganismos tanto a nivel productivo como ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Alconada, M., & Huergo, L. (1998).** Degradación de suelos con cultivos protegidos: tomate. Influencia de la calidad de agua de riego. I Reunión de Producción Vegetal, NOA, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991).** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45.
- Alexander, M. (1980).** Transformaciones microbianas del fósforo. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, pp: 355-371 (491 pp).
- Amar, C. B. (2016).** Diversity, Phyto Beneficial Activities and Agrobiotechnology of Plant Growth Promoting Bacillus and Paenibacillus. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 3(1).
- Araújo, W. L., Maccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O., & Azevedo, J. L. (2001).** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian journal of microbiology*, 47(3), 229-236.
- Baker, K. F., & Cook, R. J. (1974).** Biological control of plant pathogens. Ed: W. H. Freeman and Co. San Francisco, California, 433 pp.
- Balcaza, L. (2003).** Deterioro de los suelos cultivados bajo invernáculo. *Idia XXI* N°, 4. Ediciones INTA. 196 pp
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005).** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.
- Boddey, R. M., & Dobereiner, J. (1988).** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant and soil*, 108(1), 53-65.
- Brundtland, G. H. (1987).** Report of the World Commission on Environment and Development. (1987). Report of the world commission on environment and development: Our common future. Published as Annex to General Assembly document A/42/427.

- Caballero-Mellado, J. (2006).** Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. Revista Latinoamericana de Microbiología, 48(2), 154-161.
- Cankar, K., Kraigher, H., Ravnikar, M., & Rupnik, M., (2005).** Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). FEMS microbiology letters. 244(2), 341-345.
- Cano, L.A.; De Urraza, P.; Gianuzzi, L.; Fernandez, M.; Di Claudio, F. ; Delgado, G., Rivero Berti, J.I., Lopez Fino, C. (2012).** Intervención sobre la calidad de aguas en el cinturón hortícola Platense
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011).** Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. Microbial ecology, 62(1), 188-197.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983).** The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. pp 539.
- del Pino, M., (2018).** Guía didáctica: Cultivo y manejo del cultivo de tomate. Curso de Horticultura y Floricultura. FCAYF. UNLP.19 pp
- Döbereiner, J., Marriel, I. E., & Nery, M. (1976).** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology, 22(10), 1464-1473.
- Franco-Correa, M., & Chavarro-Anzola, V. (2016).** Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. InTech. DOI: 10.5772/61291.
- Giuffré, L., Alconada, M., Pascale, C., & Ratto, S. (2004).** Environmental impact of phosphorus overfertilization in tomato greenhouse production. Journal Applied Horticulture, 6(1), 58-61.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., Penrose, D.M. (1999).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press, London
- Glick, B. R. (2012).** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica Volume 2012, Article ID 963401, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007).** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. European Journal of Plant Pathology, 119(3), 329-339.
- Goldstein, A. H. (1986).** Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and

future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1(2), 51-57.

González-Chávez, M. D. C. Á. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 29-37.

Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial cell factories*, 15(1), 203.

Heuvelink, E. (1995). Growth, development and yield of a tomato crop: periodic destructive measurements in a greenhouse. *Scientia horticulturae*, 61(1-2), 77-99.

Hunt, R., Causton, D. R., Shipley, B., & Askew, A. P. (2002). A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of botany*, 90(4), 485-488.

Jacobsen, C. S. (1997). Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* DBO1 (pRO101) in 2, 4-D contaminated soil. *Plant and Soil*, 189(1), 139-144.

Johansson, J. F., Paul, L. R., & Finlay, R. D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 1-13.

Kloepper, J. W., & Beauchamp, C. J. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(12), 1219-1232.

Kloepper, J. W., & Schroth, M. N. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 71(10), 1020-1024.

Kloepper, J.W. (1993). Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. En: *Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental management*. Ed: Metting F.B. Jr., Marcel Dekker, New York, pp: 255-274.

Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada, S., Aranda, S., Luna, I., & Vaquera, H. (2001). *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1).

- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*.
- León J. (2000).** *Botánica de los cultivos tropicales*. 318 pp.
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M., & Schenk, P.M., (2017).** Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in microbiology*. 8:2552. doi: 10.3389/fmicb.2017.02552
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989).** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. pp 6.3- 6.15
- Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S., & Morisaki, H. (2006).** Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*. 21(2), 86-100.
- Mayer, A. M. (1958).** Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. *Nature*, 182(4650), 1670.
- McCully, M. E. (2001).** Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology*, 28(9), 983-990.
- Nakama, M. & Fernandez Lozano, J. (2006).** Producción y mercado de tomate en Argentina. Disponible en: http://www.infofrut.com.ar/?option=com_content&task=view&id=278&Itemid=55.
Ultimo acceso: Julio de 2018.
- Nelson, E. B. (2004).** Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 271-309.
- Nuez F.; Diez M.J.; Pico B. y Fernandez de Cordova P. (1996).** Catálogo de semillas de tomate. 27 pp.
- O'sullivan, D. J., & O'Gara, F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56(4), 662-676.
- Prapagdee, B., Chanprasert, M., & Mongkolsuk, S. (2013).** Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 92(6), 659-666.

- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (1998).** Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 29-54.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sangthong, C., Setkit, K., & Prapagdee, B. (2016).** Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium-resistant *Micrococcus* sp. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(1), 756-764.
- Sanjuán Pinilla, J., & Moreno Sarmiento, N. (2010).** Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 4-7.
- Santillana, N., Arellano, C., & Zúñiga, D. (2005).** Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller. *Ecología Aplicada*, 4(1-2), 47-51.
- Sarabia Ochoa, M., R.M. Pedraza, M.M. Trujillo & Y.C. Abud. (2010).** Plantas, hongos micorrícicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. *Biológicas*, Julio 2010, 12: 65–71.
- Sorroche, F. G., Spesia, M. B., Zorreguieta, Á., & Giordano, W. (2012).** A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4092-4101.
- Sturz, A. V., & Nowak, J. (2000).** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied soil ecology*, 15(2), 183-190.
- Subba Rao, N. S. (1999).** *Soil microbiology: of soil microorganisms and plant growth*. Enfield, Science Publishers.

- Subsecretaría de Mercados Agropecuarios. Ministerio de Agroindustria. (2017).** Mercado Externo del Tomate. Disponible en: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/_archivos/000030_Informes/000994_Informe%20del%20Mercado%20Externo%20del%20Tomate%20-%202017.pdf. Ultimo acceso: Julio de 2018.
- Timmusk, S. (2003).** Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis). <https://pdfs.semanticscholar.org/06a4/082f8425cc0145378e2a3b05e458872b7e09.pdf>
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J., (2015).** Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*. 7(1), 40-50.
- Ulrich, K., Stauber, T., & Ewald, D. (2008).** *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 347-351.
- Vílchez, J. I., Niehaus, K., Dowling, D., González-López, J., & Manzanera, M. (2018).** Protection of pepper plants from drought by *Microbacterium* sp. 3J1 by modulation of the plant's glutamine and α -ketoglutarate content: A comparative metabolomics approach. *Frontiers in Microbiology*, 9, 284.
- Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Weller, D. M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S., & Shen, L. (2014).** Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 835-845.

Yagi, K., Matsumoto, T., Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Minamisawa, K., & Yamane, H. (2000).

Isolation and Characterization of Low-indole-3-acetic Acid-producing Mutants from *Bradyrhizobium elkanii*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(7), 1359-1364.

Yanni, Y. G., Dazzo, F. B., & Zidan, M. I. (2011). Beneficial endophytic rhizobia as biofertilizer

inoculants for rice and the spatial ecology of this bacteria–plant association. In *Bacteria in agrobiolology: Crop ecosystems* (pp. 265-294). Springer, Berlin, Heidelberg.