



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
Universidad Nacional de La Plata.

TRABAJO FINAL

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en Trigo (*Triticum* spp.) y Maíz (*Zea mays*).

Alumno: Juan Manuel Reparaz

Legajo n°: 27062/0

Director: Ph.D. Giuliano Degrassi

Codirector: Ph.D. Pedro Alberto Balatti

RESUMEN

Bacterias endófitas, aisladas de plantas de cebada, maíz y trigo, se caracterizaron fenotípica y genotípicamente para evaluar su potencialidad como promotoras del crecimiento vegetal en ensayos a campo de trigo y maíz. Casi la totalidad de los aislados encontrados e identificados posee al menos un mecanismo a través del cual promueve el crecimiento vegetal, capacidad que varió entre los aislados. Las bacterias seleccionadas por su potencial PGPB se identificaron preliminarmente en base a la secuencia de los genes ribosomales 16SrDNA. Las bacterias se evaluaron en ensayos a campo inoculando semillas de trigo y maíz. Los resultados de estos ensayos no demostraron que la inoculación provocara aumentos de crecimiento y/o producción significativos. Se deberá continuar realizando un mayor número de evaluaciones de las bacterias endófitas con el fin de confirmar que la aplicación de estas bacterias es un biofertilizante que aumenta la sanidad y crecimiento de las plantas.

INDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
HIPÓTESIS:	8
OBJETIVOS GENERALES:.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. Material Vegetal	9
2. Aislamiento de Microorganismos Endófitos	9
3. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos	11
3 a - Producción AIA.....	11
3 b - Actividad de solubilización de Fosfatos.....	11
3 c - Producción de Sideróforos.....	12
3 d - Producción de Exopolisacáridos (EPS).....	12
3 e - Actividad de enzimas secretadas.....	13
4. Caracterización genotípica de los aislados bacterianos	14
5. Ensayo a campo: Trigo	15
6. Ensayo a campo: Maíz.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	17
1. Aislamiento de Microorganismos endófitos	17
2. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos	18
3. Caracterización genotípica de los aislados bacterianos	24
4. Ensayo a campo: Trigo	31
5. Ensayo a campo: Maíz.....	38
CONCLUSIONES:	434
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXO	53

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum spp.*) y el maíz (*Zea mays*), junto al arroz (*Oryza sativa*), ocupan en conjunto probablemente el área más amplia cultivada en el mundo. En la campaña 2016/17, la producción mundial de maíz alcanzó los 1.070 millones de toneladas, el arroz 759 millones de toneladas y el trigo 755 millones de toneladas. Argentina ocupó el puesto número diez dentro del ranking de países productores de trigo con 17,5 Mtn, y el puesto número siete en el ranking de países exportadores con 12,1 Mtn. En cuanto al maíz, se ubicó en el quinto lugar como país productor con 40Mtn y en el tercero como exportador con 28Mtn (USDA, 2017).

La población mundial que en la actualidad es de 7.600 millones de personas, alcanzará los 8.600 millones para el año 2030 y se estima que llegará a 9.800 millones para 2050 y a 11.200 para 2100 (ONU, 2017). La tecnificación de la agricultura y el uso eficiente de la tierra es fundamental para alcanzar la seguridad alimentaria, reducir la pobreza y alcanzar un desarrollo integral sostenible.

La necesidad de proporcionar alimento, llevó en las últimas décadas a grandes aumentos en el consumo de energía, agua, fertilizantes y pesticidas, junto con considerables pérdidas de biodiversidad. Los cambios en el uso de la tierra le permitieron al hombre apropiarse de una parte considerable de los recursos del planeta, pero también de esta manera atenta contra los ecosistemas, que al ser alterados pierden entre otras productividad (Foley *et al.*, 2005).

En la actualidad se están utilizando, como herramienta y para realizar un manejo sustentable de los cultivos, microorganismos benéficos, cuya aplicación conduce a una explotación más racional del suelo y del ambiente, sin sacrificar la obtención de altos rendimientos. Entre estos productos se encuentran los bio-inoculantes formulados en base a Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB). Entre estos se encuentran varias

especies bacterianas que establecen diversos tipos de interacciones con las plantas, por ejemplo bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico del género *Azospirillum* con gramíneas. Además de las bacterias mencionadas, también se encuentran las bacterias endófitas que son todas aquellas bacterias que habitan los tejidos de las plantas, en donde como no generan alteraciones fisiológicas tampoco generan síntomas (Hallmann *et. al.* 1997). Las plantas se asocian con un amplio número de especies bacterianas endófitas las que incluye una gran diversidad de taxones (Miliute *et. al.*, 2015).

Los endófitos bacterianos son microorganismos que colonizan los espacios intercelulares y otros compartimentos u órganos de la planta en donde se establecen ya que se nutren, se multiplican y reproducen. Las bacterias colonizan el apoplasto, espacio que está formado por las paredes celulares, y los espacios intercelulares. Además las bacterias ocupan también los vasos del xilema de las raíces de las plantas, tallos y hojas, y también se encuentran en los tejidos de flores y frutos (Compant *et al.*, 2011).

La estructura de la comunidad de bacterias endófitas está influenciada por el genotipo de la planta, los factores abióticos y bióticos tales como las condiciones ambientales, interacciones microorganismos (MO) - MO e interacciones planta - MO. Las prácticas agrícolas, como la labranza del suelo, el riego, el uso de pesticidas y fertilizantes tienen un efecto importante en la función y estructura del suelo y en las poblaciones microbianas. Por lo tanto, es claro que el impacto de las diferentes prácticas agrícolas sobre la diversidad es un elemento clave en el marco de una agricultura sostenible.

Las diferentes comunidades microbianas que viven como endófitas en las plantas desempeñan un papel integral en el funcionamiento de los agroecosistemas. Se ha demostrado que las bacterias endófitas tienen varios y diversos efectos que benefician directa y/o indirectamente a la planta huésped. Entre ellos, se destacan: la fijación de nitrógeno, síntesis de sideróforos, solubilización de fósforo, síntesis de hormonas y la producción de factores antimicrobianos capaces de controlar microorganismos patógenos.

El fósforo (P) es uno de los elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y es luego del N el elemento más utilizado en las fertilizaciones. Con frecuencia, la disponibilidad de P en el suelo limita la producción de biomasa en los ecosistemas naturales. Si bien el suelo es la mayor fuente de P, no todo se encuentra de forma asimilable (P inorgánico) por las plantas y esto depende, entre otros factores, del pH. Para poder utilizar el P, las bacterias han desarrollado mecanismos de solubilización y mineralización, los más conocidos son la excreción de ácidos orgánicos y de fosfatasa, respectivamente. Varios estudios han demostrado que la inoculación con bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas, tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo (Chuang *et al.*, 2007; Fankem *et al.*, 2008; Rariz *et al.* 2013; Vandana & Reeta, 2003).

El hierro (Fe) es un micronutriente que cumple un rol clave en el metabolismo de las plantas ya que actúa como cofactor de numerosas enzimas claves de diversas rutas metabólicas. El hierro está presente en los suelos en grandes cantidades, pero, generalmente su disponibilidad es baja. Las plantas pueden absorber el hierro en sus estados de oxidación Fe^{2+} (hierro ferroso) y Fe^{3+} (hierro férrico). Aunque la mayoría del hierro en la corteza terrestre está oxidado, en su forma reducida como Fe^{2+} es fisiológicamente más importante para las plantas. Si bien esta forma es relativamente soluble, en condiciones oxicas y de pH neutro, se oxida fácilmente a Fe^{3+} y por esto en el suelo tiende a precipitar.

Las plantas tienen mecanismos para absorber el hierro. Uno de ellos es utilizando moléculas que atraen el hierro fuertemente como son los sideróforos, que son péptidos de bajo peso molecular. Estos compuestos son quelantes del hierro, forman un complejo con este y aumentan su solubilidad. Los sideróforos también son producidos por los microorganismos que de alguna manera intervienen en la regulación de la disponibilidad del hierro en la rizósfera o sirven como fuente de hierro para las plantas (Loaces, 2013).

Las fitohormonas son moléculas orgánicas que en pequeñas cantidades alteran los procesos fisiológicos de las plantas. Las fitohormonas juegan un papel importante en la germinación, el crecimiento, la floración y la maduración de las plantas.

Las auxinas, entre estas el ácido indolacético (AIA), son fitohormonas que alteran el crecimiento de la raíz, la elongación celular, la diferenciación de tejidos y la respuesta del crecimiento de la planta a la luz. Muchos de los microorganismos asociados a las plantas son capaces de producir este tipo de compuestos que suelen promover el crecimiento de las plantas lo que ha sido documentado en varios trabajos (Tsavkelova, 2007; Ahmad *et. al.*, 2004).

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por las bacterias cuando crecen en medios ricos en carbono, suelen mejorar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico. Algunas bacterias promotoras del crecimiento de las plantas son tolerantes a la sal, y por ello pueden desempeñar un papel importante para aliviar el estrés de la salinidad, ya que el exopolisacárido bacteriano se une al ion y reduciendo de esta manera el contenido libre de Na^+ (Upadhyay *et. al.*, 2011). También, la alta afinidad del EPS por el agua proporciona frente al estrés por sequía, protección, tanto a bacterias como a plantas. Los EPS retienen el agua en el suelo que rodea las raíces de las plantas y el suelo se seca más lentamente, esto además protegen a las bacterias de la desecación y de las fluctuaciones en el potencial hídrico. El tipo de EPS juega un rol clave en la tolerancia de las plantas a la sequía. Se infiere que estos EPS también jugarían un papel importante en la estabilidad mecánica y estructural de los suelos afectados por la sal y la agregación del suelo alrededor de las raíces de las plantas (Alami *et. al.*, 2000; Naseem & Bano, 2014).

HIPÓTESIS:

Las bacterias endófitas aisladas de plantas de cebada, trigo y maíz promueven el crecimiento vegetal porque solubilizan fósforo, producen ácido indolacético, sideróforos, exopolisacáridos, proteasas y lipasas, características que contribuyen a la promoción del crecimiento de las plantas.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1- Aislar bacterias endófitas de plantas de cebada, trigo y maíz con potencial para promover el crecimiento de las plantas.
- 2- Evaluar las diferentes características fenotípicas de bacterias promotoras del crecimiento.
- 3- Identificar a las bacterias endófitas en base a la secuencia del gen 16SrDNA.
- 4- Aplicar suspensiones de estas bacterias sobre semilla de trigo y maíz y evaluar a campo el crecimiento y rendimiento de las plantas inoculadas con las bacterias seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (ICGEB) y el trabajo a campo en dos sitios, uno fue un campo de un productor ubicado en la ciudad de San Antonio de Areco y otro fue en la Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

1. Material Vegetal

Se realizó la recolección aleatoria de plantas enteras de cebada, trigo y maíz en campos de la ciudad de 9 de Julio (35°27'00"S 60°53'00"O), ubicada en el km 262 de la ruta nacional 5, provincia de Buenos Aires.

2. Aislamiento de Microorganismos Endófitos

Muestras de espigas, semillas, hojas, raíces y tallos de plantas de maíz, cebada y trigo, duplicados de cada parte y/u órgano, se sometieron a lavados secuenciales con agua, alcohol al 75%, hipoclorito de sodio (2%) y solución tampón de fosfato salino (Tabla 1), por duplicado. Luego, las muestras se maceraron en 2 ml de tampón PBS. De las suspensiones obtenidas se hicieron diluciones (1:10, v/v) en PBS hasta una dilución de 10 – 3 (Döbereiner *et al*, 1995). Las últimas diluciones se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo sólido. Las colonias individuales se sembraron por separado en placas de Petri que contenían el mismo medio utilizado anteriormente con el fin de obtener cultivos puros.

Para controlar la eficiencia de la desinfección superficial de tejidos, se tomaron alícuotas de (1ml) del último lavado con buffer PBS y se sembraron en placas de Petri para verificar la ausencia de crecimiento tanto de hongos como de bacterias. El medio de cultivo utilizado fue Nutrient Agar (NA) más 20% de glicerol (Tabla 2) (Kado y Heskett, 1970).

Las placas de Petri se incubaron a 30°C durante 2 a 3 días y luego se almacenaron a 4°C. Posteriormente, las colonias seleccionadas se sembraron en medio NA líquido y se incubaron durante 18 h a 30°C bajo agitación constante. Finalmente, cada aislado bacteriano se suspendió en glicerol estéril al 15% y se almacenó a -80°C.

Tabla 1: Solución Tampón Fosfato Salino (PBS), pH= 7,4. (Döbereiner *et al.*, 1995).

Componentes	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
KCl	0,2 g
NaCl	8 g
Agua bidestilada	1000 ml

Tabla 2: Medio de cultivo Nutrient Agar (NA). (Kado y Heskett, 1970).

Componentes	Cantidad
Proteose peptone	5 g
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
CINa	5 g
Agar	15 g
Glicerol	20 ml
Agua bidestilada	1000 ml

3. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos

La caracterización de los aislados se realizó en base a los siguientes parámetros:

3 a - Producción AIA

Los cultivos bacterianos se inocularon en medio de caldo nutriente con triptófano (1, 2 y 5 mg ml⁻¹) y se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1 a 2 semanas, dependiendo de la respuesta de cada cepa. Los cultivos se centrifugaron durante 30 min. Se mezclaron dos mililitros del sobrenadante con 2 gotas de ácido ortofosfórico y 4 ml de reactivo de Salkowski (50 ml de ácido perclórico al 35%, 1 ml de 0,5 FeCl₃). El desarrollo de un color rosa indica la producción de AIA y los aislamientos se clasificaron en: (-) sin tinción, sin producción de AIA; (1) tinción ligera, baja producción; (2) coloración media, producción media; (3) tinción intensa, alta producción.

3 b - Actividad de solubilización de Fosfatos

Se determinó cualitativamente de acuerdo con el método descrito por Nautiyal (1999). Las cepas bacterianas se evaluaron mediante un ensayo en placa usando medio NBRIP (Tabla 3). Las bacterias se colocaron en placas de Petri y se incubaron a 30°C durante 7 días. Un halo claro formado alrededor de las colonias indica solubilización de fosfato. Los aislamientos se clasificaron en: (-) no halo, o falta de actividad; (1) halo pequeño (1-2 mm), poca actividad; (2) medio halo (2-4 mm), actividad mediana; (3) halo grande (mayor de 4 mm), alta actividad.

Tabla 3: Medio de cultivo de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP). (Nautiyal, 1999).

Componentes	Cantidad
Glucosa	10 g
Fosfato de roca Gafsa	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
Agar	15 g
Agua bidestilada	1000 ml

3 c - Producción de Sideróforos

El método utilizado para detectar sideróforos consistió en una adaptación del ensayo químico universal sobre placas de agar de cromo Azurol S (CAS) (Schwyn y Neilands 1987). Los aislados se colocaron en placas de Petri y se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 días. La producción de sideróforos se midió por el tamaño de los halos de color naranja que se forman alrededor de las colonias, clasificándolos en: (-) no halo, o falta de producción; (1) halo pequeño (1-2 mm), poca producción; (2) medio halo (2-4 mm), producción media; (3) halo grande (mayor de 4 mm), alta producción.

3 d - Producción de Exopolisacáridos (EPS)

La producción de EPS se ensayó mediante el estriado de colonias individuales en medio manitol-extracto de levadura (Tabla 4) (Zlosnik *et al.*, 2008). La producción de EPS se determinó visualmente analizando la morfología de la colonia y el aspecto viscoso. Los

aislados se clasificaron en: (-) no producción de EPS; (1) Baja producción; (2) producción media; (3) alta producción.

Tabla 4: Medio Manitol-Extracto de levadura (YMA). (Zlosnik *et al.*, 2008)

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	0,5 g
Manitol	4 g
Agar	15 g
Agua bidestilada	1000 ml

3 e - Actividad de enzimas secretadas

El ensayo de actividad de proteasas se realizó en placas de Petri con medio de cultivo Agar Leche (Tabla 5). Las cepas se inocularon y las placas se incubaron a 30 ° C durante la noche.

La actividad de lipasas se detectó usando el ensayo de placas TBA según Kumar *et al.* (2012). Se trazaron estrías con las bacterias en placas de Petri y se incubaron a 30 ° C durante la noche.

La actividad lipolítica y proteolítica se evidenció mediante el desarrollo de un halo transparente alrededor de la colonia bacteriana. Los criterios de clasificación fueron: (-) ninguna actividad; (1) Baja actividad; (2) actividad mediana; (3) alta actividad.

Tabla 5: Medio de cultivo Agar Leche.

Componentes	Cantidad
--------------------	-----------------

Leche descremada	10 g
Extracto de levadura	0,1 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua bidestilada	1000 ml

Tabla 6: Medio de cultivo Agar Tributirina (TBA). (Kumar *et. al.*, 2012)

Componentes	Cantidad
Bacto peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Tributirina	10 g
Agar	15 g
Agua bidestilada	1000 ml

4. Caracterización genotípica de los aislados bacterianos

Las cepas bacterianas seleccionadas se identificaron a partir de la secuencia de los genes ribosomales 16SrDNA. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo con PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies) y la amplificación de la secuencia target por PCR de los fragmentos se realizó usando los cebadores 518F y 1492R. Los productos de PCR resultantes se purificaron con PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Life Technologies) y se secuenciaron en la compañía MacroGen (MacroGen Inc., Seoul, Corea del Sur). Se realizó la comparación de las secuencias con las descritas en las bases de datos y se analizó la homología con otras secuencias en la base de datos GenBank

utilizando el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information) disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. Ensayo a campo: Trigo

El ensayo de inoculación de plantas de trigo se llevó a cabo en la Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhörn, siguiendo un diseño experimental de 11 tratamientos (10 cepas y el control sin inoculación) y 3 repeticiones, con distribución al azar. Se sembraron parcelas con trigo de 1 m², con surcos distanciados 20cm y una densidad inicial de 400 pl/m². Se sembró la variedad de trigo Klein Roble.

Las cepas a evaluar fueron: CE11, CS3, CS5, CT8, CR2, CR3, CR21, CR27, TE15, TS3 y TT5. Estas se seleccionaron por presentar *in vitro* buena actividad de los rasgos evaluados (solubilización de fósforo, producción de ácido indolacético, sideróforos, exopolisacáridos, proteasas y lipasas) y por la especie con las que se identificaron, teniendo como intención la comparación de distintas especies y no solo las más destacadas en los ensayos fenotípicos. Las cepas elegidas se cultivaron en medio NA líquido durante 24hs a 30°C bajo agitación constante. Las semillas se esterilizaron, para lo cual se las sometió a lavados secuenciales con agua, alcohol al 75%, hipoclorito de sodio (2%) y solución tampón de fosfato salino, por duplicado. Luego, las semillas, se inocularon por inmersión de 2 horas con un cultivo bacteriano suplementado con 10% de sacarosa, que se utilizó como adherente.

La respuesta del trigo a la inoculación con las bacterias endófitas seleccionadas se evaluó en base a determinaciones de los componentes que conforman el rendimiento: n° espigas por m², peso de espiga, n° granos/espiga y peso de granos/espiga. Los datos de

número de granos/espiga, peso de espiga y peso de granos/espiga se calcularon en base a una muestra de 10 espigas por parcela, tomadas al azar.

6. Ensayo a campo: Maíz

Los ensayos de inoculación de maíz se realizaron en una explotación ubicada en San Antonio de Areco, siguiendo un diseño experimental de 11 tratamientos (10 cepas y el control sin inoculación) con distribución al azar. Se realizaron dos ensayos, uno de siembra temprana y otro de siembra tardía.

Cada época de siembra tuvo un diseño de parcela experimental distinto. El maíz temprano se sembró en parcelas de 3m², con 2 surcos de 3m de largo, distanciados 50cm entre si y una densidad de 3 semillas por metro lineal. En cambio, el maíz tardío se sembró en un surco único, cada tratamiento tuvo una longitud de 3m lineales y una densidad de 4 semillas por metro lineal. Ambos ensayos se sembraron por triplicado.

La metodología para la selección de las cepas, la inoculación y la esterilización de las semillas fue la misma que la descrita anteriormente para el ensayo de trigo.

Se evaluó el rendimiento del maíz con las cepas inoculadas. Para el cálculo de rendimiento, se determinó el peso individual de las espigas y el número de espigas por unidad de superficie.

Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa estadístico InfoStat. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y las medias se compararon mediante el test de Tukey a 5% de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1. Aislamiento de Microorganismos endófitos

Del procesamiento de las muestras recolectadas a campo se obtuvieron aislados bacterianos de las tres especies. Se contabilizó un total de 153 endófitos, de los cuales 64 se extrajeron de cebada, 47 de trigo y 42 de maíz (Tabla 7).

Cada aislado fue identificado con un nombre, compuesto por dos letras y un número. La primer letra hace referencia a la especie en la que se encontró (cebada, trigo, maíz); la segunda a la parte de la planta de la que se extrajo (tallo, espiga, semilla, hoja, raíz) y el número se refiere al orden en que la muestra fue identificada en el órgano de cada especie. Por ejemplo, la bacteria CR1 fue la primera bacteria aislada de la raíz de cebada.

El número de especies bacterianas halladas en cada cultivo no presentó una diferencia estadística significativa. Tampoco se vio tal diferencia entre los tejidos. Para los tres cultivos, el órgano en el que se encontró el mayor número de aislados fue distinto; siendo la raíz en cebada, la hoja en maíz y la espiga en trigo.

Tabla 7: Aislados bacterianos obtenidos de las muestras de campo según cultivo y órgano de donde fueron aislados.

CEBADA				Maíz			Trigo					
Espiga	Semilla	Tallo	Raíz		Hoja	Tallo	Raíz	Espiga	Semilla	Hoja	Tallo	Raíz
CE1	CS1	CT1	CR1	CR18	MH1	MT1	MR1	TE1	TS1	TH1	TT1	TR1
CE2	CS2	CT2	CR2	CR19	MH2	MT2	MR2	TE2	TS2	TH2	TT2	TR2
CE3	CS3	CT3	CR3	CR20	MH3	MT3	MR3	TE3	TS3	TH3	TT3	TR3
CE4	CS4	CT4	CR4	CR21	MH4	MT4	MR4	TE4	TS4		TT4	TR4
CE5	CS5	CT5	CR5	CR22	MH5	MT5	MR6	TE5			TT5	TR5
CE6	CS6	CT6	CR6	CR23	MH6	MT6	MR7	TE6			TT6	TR6
CE7	CS7	CT7	CR7	CR24	MH7	MT7	MR8	TE7			TT7	TR7
CE8		CT8	CR8	CR25	MH8	MT8	MR10	TE8			TT8	TR8
CE9		CT9	CR9	CR26	MH9	MT9	MR11	TE9			TT9	TR9
CE10		CT10	CR10	CR27	MH10	MT10	MR12	TE10			TT10	TR10
CE11		CT11	CR11	CR28	MH11	MT11	MR13	TE11			TT11	TR11
CE12		CT12	CR12		MH12	MT12	MR14	TE12				TR12
CE13			CR13		MH13	MT13		TE13				TR13
CE14			CR14		MH14			TE14				TR14
CE15			CR15		MH15			TE15				
CE16			CR16		MH16							
CE17			CR17		MH17							

2. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos

Todas las bacterias fueron sometidas a las diferentes pruebas con el fin de evaluar su potencialidad como promotoras del crecimiento vegetal. Se determinó: la solubilización de fosfatos, la producción de IAA, sideróforos, lipasas y proteasas (Ver ANEXO para datos complementarios).

Se comprobó que el 58% de los aislados (89 cepas) sintetizan IAA. De dicho grupo, 56 fueron aislados de cebada (13 de la espiga, 5 de la semilla, 10 del tallo y 28 de la raíz), 22 del maíz (11 de la hoja, 4 del tallo y 7 de la raíz), y 11 del trigo (2 de la espiga, 3 de la semilla, 3 del tallo y 3 de la raíz) (Fig.1). No se observó que exista una relación entre un órgano en particular y la producción de IAA, ya que el órgano con mayor número de endófitos productores de IAA fue distinto en cada cultivo. En lo que hace al número de

bacterias encontradas, éste fue similar en los cultivos y en los diversos órganos muestreados (Fig. 2).

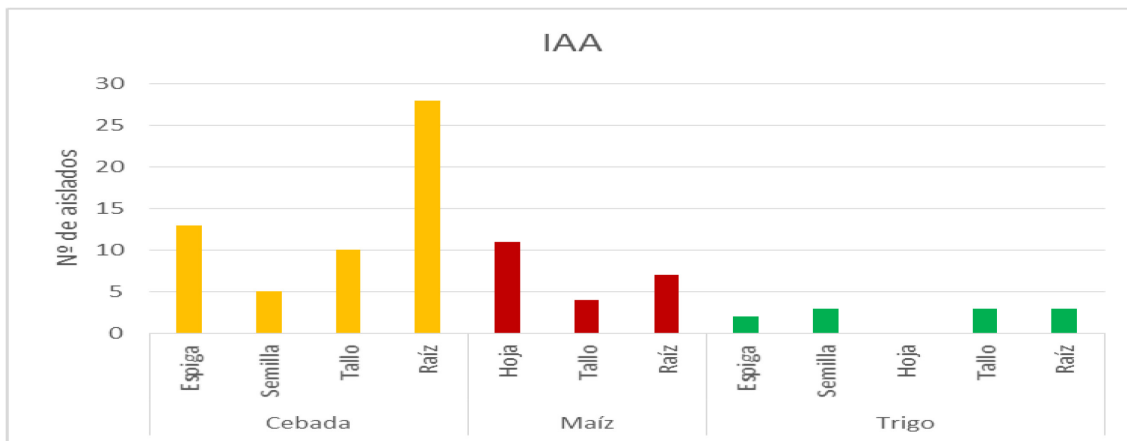


Figura 1: Cantidad de endófitos productores de IAA en los órganos de cebada, maíz y trigo.

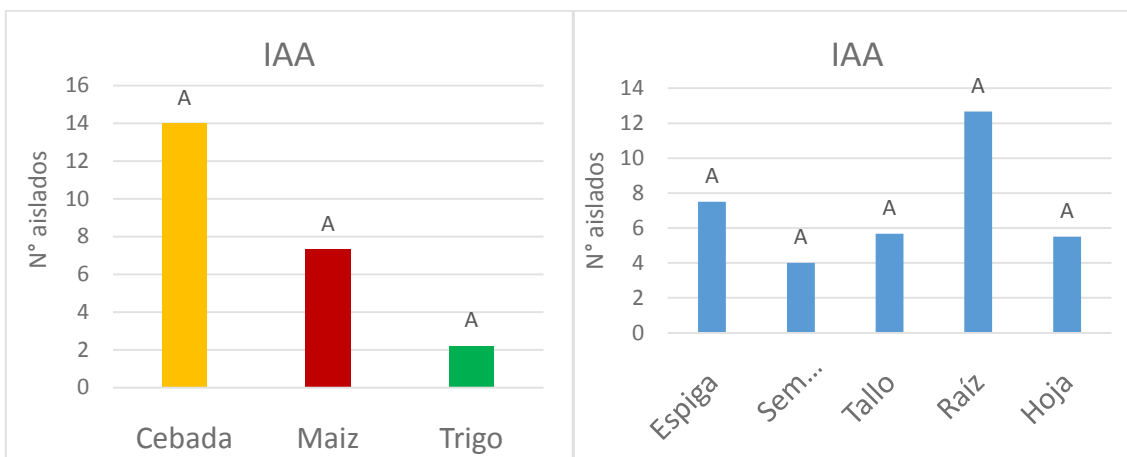


Figura 2: Cantidad de endófitos productores de IAA por cultivo (izquierda) y por órgano (derecha). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

Solubilizar fosfatos es una característica bastante común entre los aislados ya que el 47,7% (73 aislados) del total de los endófitos la presentó, y en términos relativos el mayor número de bacterias con esta capacidad se recuperó de la raíz de cebada. Sobre el total de organismos que solubilizan fosfatos, 56 endófitos fueron aislados de la cebada (12 de la espiga, 6 de la semilla, 11 del tallo y 28 de la raíz), 9 del maíz (3 de la hoja y 6 de la raíz) y 11 del trigo (5 de la espiga, 3 de la semilla y 3 del tallo) (Fig. 3). En síntesis la

cebada contuvo una cantidad significativamente mayor de organismos solubilizadores de P que las plantas de trigo (Fig. 4).

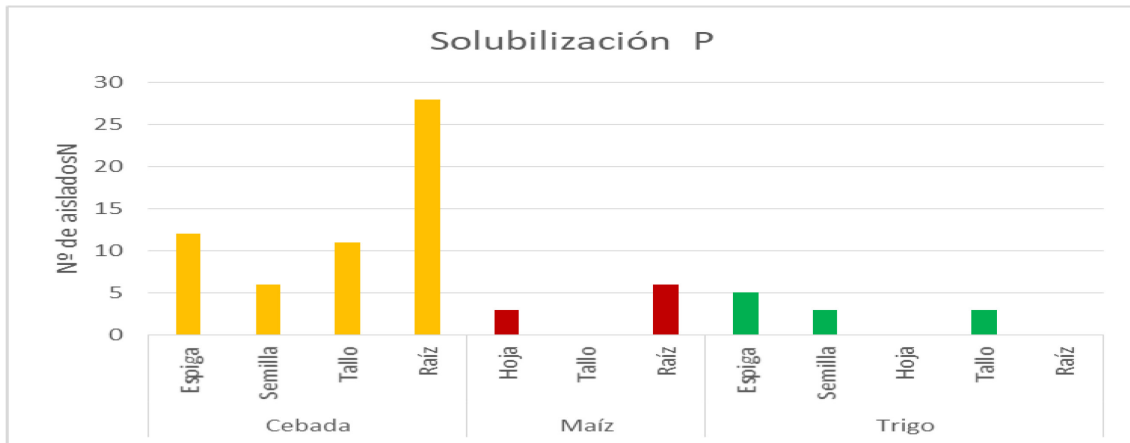


Figura 3: Cantidad de endófitos que solubilizan fosforo inorgánico en los órganos de cebada, maíz y trigo.

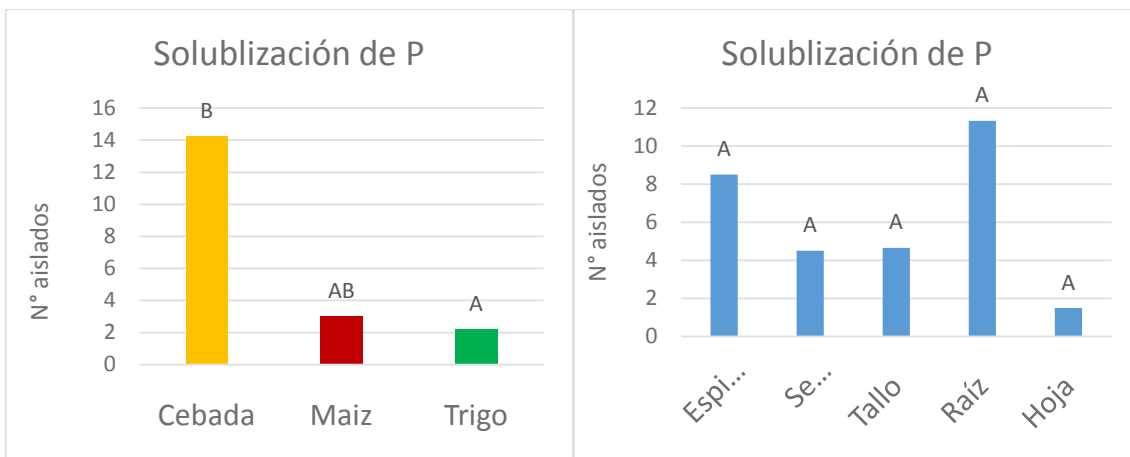


Figura 4: Cantidad de endófitos que solubilizan fosforo por cultivo (izquierda) y por órgano (derecha). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

La combinación de las capacidades de producir IAA y solubilizar fosfatos, se halló en el 41% (63 bacterias) de los aislados. La mayoría de estos aislados se obtuvieron de las plantas de cebada, 51 cepas (10 en espiga, 4 en semilla, 9 en tallo y 28 en raíz), mientras que en el maíz y en el trigo solo se encontraron 6, 2 en hoja y 4 en raíz y 3 en semilla, 2 en tallo y 1 en espiga, respectivamente (Fig. 5). El número de especies identificadas en los distintos órganos y cultivos fueron similares (Fig. 6).

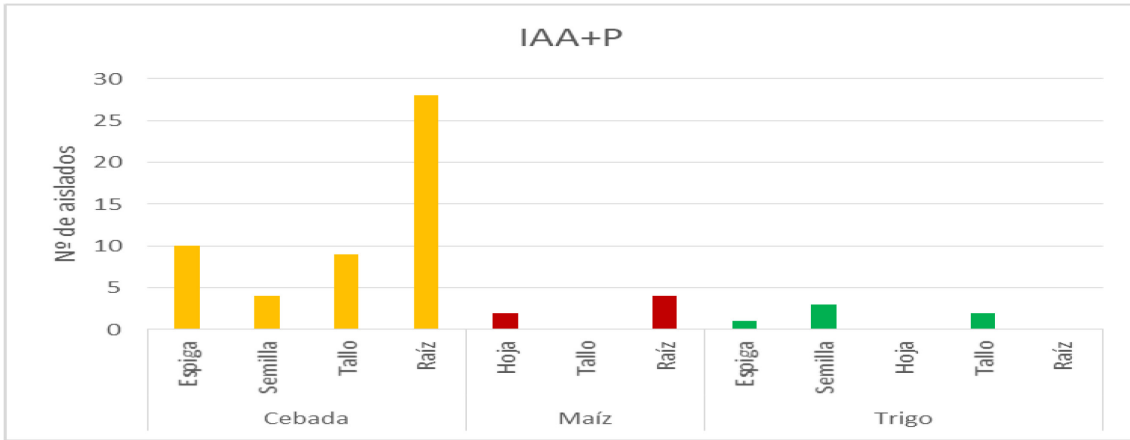


Figura 5: Cantidad de endófitos que producen IAA y solubilizan fósforo en los órganos de cebada, maíz y trigo.

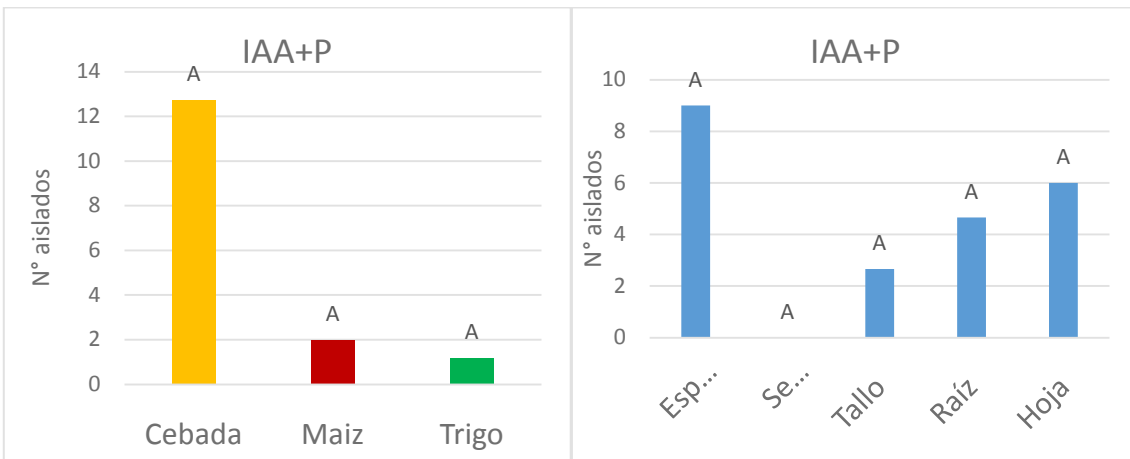


Figura 6: Cantidad de endófitos que producen IAA y solubilizan de P por cultivo (izquierda) y por órgano (derecha). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

El 29 % de las muestras produjeron EPS en una cantidad considerable (44 cepas), vale la pena mencionar que la mayoría de ellos fueron aislados de las raíces de cebada. Sobre un total de 153 aislados, 31 se aislaron de cebada (7 de la espiga, 1 de la semilla, 4 del tallo y 19 de la raíz), 5 del maíz (1 de la hoja y 4 de la raíz), y 8 del trigo (3 de la espiga, 1 de la hoja, 3 del tallo y 1 de la raíz) (Fig. 7). El número de especies identificadas en los distintos cultivos y órganos fueron similares (Fig 8).

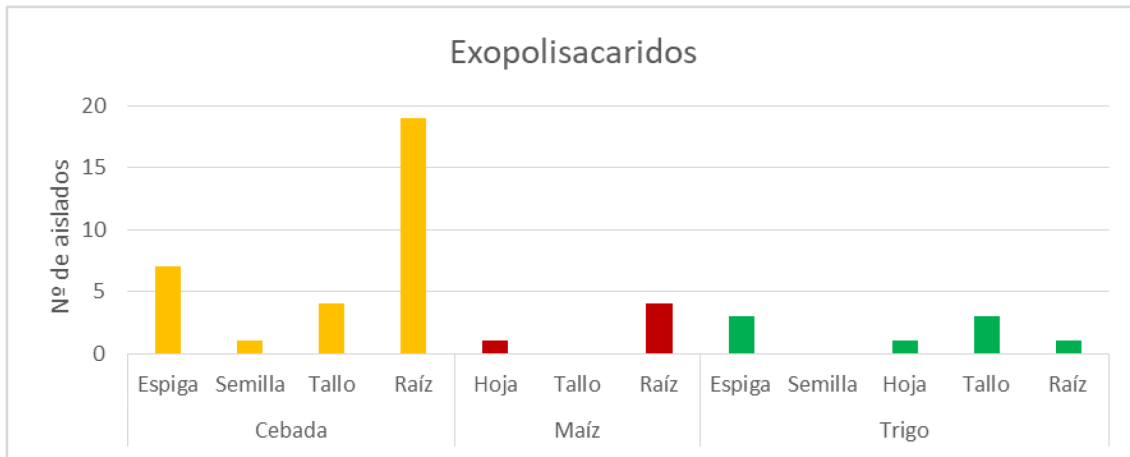


Figura 7: Cantidad de endófitos productores de exopolisacaridos en los órganos de cebada, maíz y trigo.

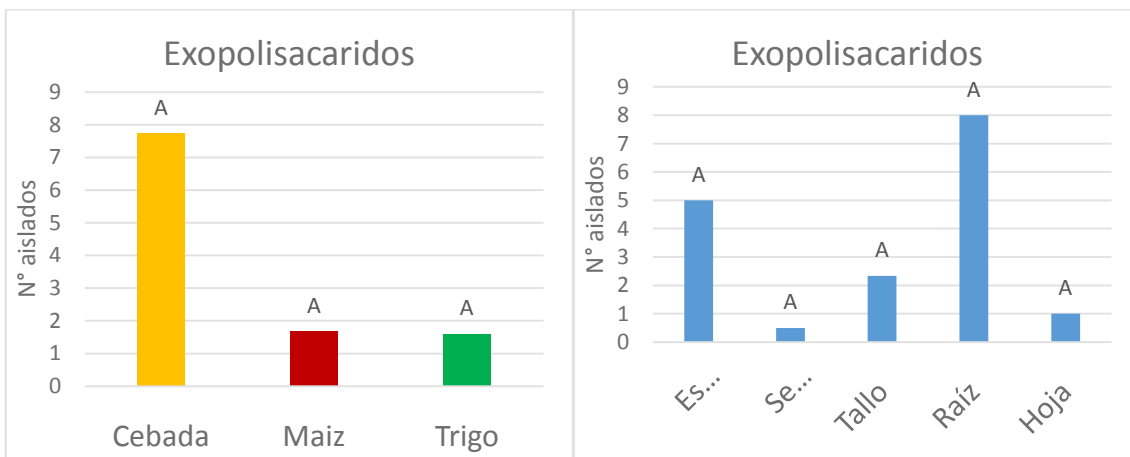


Figura 8: Cantidad de endófitos productores de exopolisacaridos por cultivo (izquierda) y por órgano (derecha). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

En lo que hace a la capacidad para producir sideróforos se identificaron 43 cepas (28%) que sintetizan estas moléculas, 4 de las cuales fueron aisladas de la cebada (1 de la espiga, 1 del tallo y 2 de la raíz), 22 del maíz (11 de la hoja, 5 del tallo y 6 de la raíz) y 17 del trigo (8 de la espiga, 1 de la hoja, 2 del tallo y 6 de la raíz) (Fig. 9). En lo que hace a bacterias productoras de sideróforos, la cantidad más elevada se encontró en las hojas de maíz, siendo significativa la diferencia entre dicho cultivo y la cebada (Fig. 10).

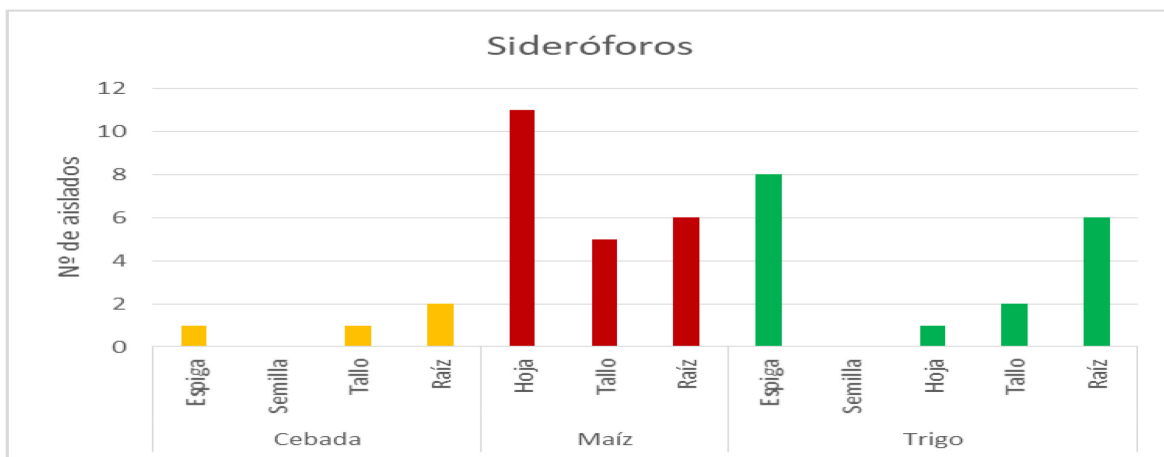


Figura 9: Cantidad de endófitos productores de sideróforos en los órganos de cebada, maíz y trigo.

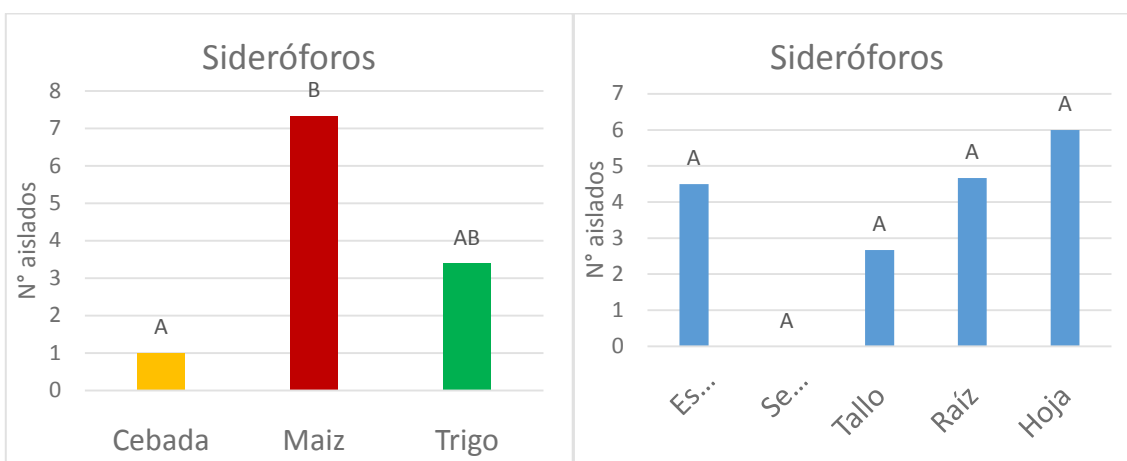


Figura 10: Cantidad de endófitos productores de sideróforos por cultivo (izquierda) y por órgano (derecha). Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

En lo que hace a la producción de enzimas secretadas 61 aislados (39%) produjeron proteasas y 80 (53%) lipasas. El mayor número de bacterias productoras de proteasas se obtuvo a partir del cultivo de trigo, mientras que los aislados con mayores actividades de lipasas se aislaron de la cebada y el trigo, 29 y 30 respectivamente. Solo 40 de los aislados presentaron actividad de lipasas y proteasas (26%).

Un porcentaje muy bajo de los aislados 2,6% (4) no mostraron ningún tipo de actividad enzimática *in vitro*. Además, también fueron muy pocos los aislados que demostraron realizar varias de las actividades enzimáticas y/o características evaluadas,

solo 6 (3.9%) mostraron 5 mecanismos distintos que promueven el crecimiento y solo 1 (0.7%) presentó 6 vías distintas de potencial promoción del crecimiento. En cuanto al resto, de los aislados, 29 (19%) demostraron tener al menos una de las características que promueve el crecimiento de las plantas, un número similar de aislados 44 (28,8%) presentaron 2 y 3 características fisiológicas que resultan en la promoción del crecimiento y 28 (18,3%) aislados presentaron al menos 4 vías de promoción del crecimiento. Si establecemos una relación en lo que hace a origen del aislado y capacidad de promoción del crecimiento, las bacterias aisladas de la cebada tuvieron en promedio hasta 3 capacidades distintas para promover el crecimiento mientras que los aislados de maíz y trigo presentaron en promedio 2,3 y 2,15.

3. Caracterización genotípica de los aislados bacterianos

Basados en el origen del aislado bacteriano, esto es el cultivo y órgano de la planta de donde se obtuvo el aislado, y las evaluaciones de actividades o características metabólicas, principalmente la producción de IAA y la solubilización de fosfato, se escogieron 41 cepas para identificarlas en base a la secuencia parcial de los genes ribosomales 16SrDNA. Veinte y cuatro se aislaron de plantas de cebada (6 de espiga, 4 de semilla, 3 de tallo y 11 de raíz), 10 de maíz (4 de hoja, 3 de tallo y 3 de raíz) y 7 de trigo (3 de espiga, 2 de semilla y 2 de tallo). Los endófitos provenientes de las plantas de cebada fueron los que presentaron la mayor actividad de producción de AIA y de solubilización de P *in vitro* y por eso se seleccionaron para profundizar los estudios (Tabla 8).

El análisis de la secuencia del gen 16SrDNA permitió identificar a nivel de especie a 8 sobre un total de 41 bacterias. La secuencia del ADN ribosomal de la cepa CE10 tienen la máxima similitud con *Pantoea agglomerans*, CT5 con *Pseudomonas poae*, CR1 con

Lelliottia amnigena, CR3 con *Pseudomonas zhaodongensis*, CR16 con *Enterobacter ludwigii*, MH3 con *Pseudomonas cichorii*, MH5 con *Pseudomonas vranovensis* y TT8 con *Rhodococcus canchipurensis*. Entre todas las especies mencionadas, cuatro *Enterobacter ludwigii* (Almeida Lopes *et al.* 2015; Guevara Avendaño *et al.*, 2014), *Pantoea agglomerans* (Miliute *et al.*, 2015; Walpola *et al.*, 2013), *Pseudomonas cichorii* (Miliute *et al.*, 2015) y *Pseudomonas poae* (Guevara Avendaño *et al.*, 2014) ya fueron descritas como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas.

En cuanto al resto de las cepas de las que se dispuso sus secuencias, éstas han mostrado un alto grado de similitud con más de una especie de manera que su identificación demanda analizar secuencias adicionales del genoma. Entre las especies con las que se ha encontrado similitud varias de estas han sido descritas como promotoras del crecimiento vegetal (Tabla 9).

Si se toma como criterio que la similitud asegura la identidad de los aislados las cepas se podrían agrupar dentro de los siguientes géneros: *Pseudomonas* (CE1, CE3, CS3, CT2, CT8, CR21, CR27, MH8, MR12, TT5 y TS3); *Bacillus* (MT13 y TE9); *Curtobacterium* (TE7 y TE15); *Serratia* (CR13), *Staphylococcus* (MH13); *Lysinibacillus* (MT11); *Actinobacter* (TS2). Considerando lo anterior se puede observar que el género bacteriano más representado entre los endófitos es *Pseudomonas*, que además se encontró en todos los tejidos analizados con excepción de la espiga de trigo y el tallo de maíz.

Entre las 10 cepas restantes, 7 mostraron similitud con especies de la familia Enterobacteriaceae.

Entre las especies mencionadas, algunas pertenecen a la clase 2 en la clasificación de microorganismos según Grupos de Riesgo de la Organización Mundial de la Salud. Este grupo incluye potenciales patógenos que causan enfermedades en humanos y/o animales, que habitualmente no constituyen un riesgo para trabajadores de laboratorio, la

comunidad, los recursos naturales o el medioambiente. Dicha característica fue tomada como un aspecto más en el momento de seleccionar las bacterias para los ensayos de campo.

Tabla 8: Identificación de los aislados en base a la secuencia de los genes ribosomales 16SrRNA y su homología con las secuencias de especies tipo.

MUESTRA	ESPECIE
CE1	<i>Pseudomonas</i> antártica
CE3	<i>Pseudomonas</i> antártica
CE5	16S negativo
CE10	<i>Pantoea agglomerans</i>
CE11	<i>Curtobacterium plantarum</i>
CE12	<i>Citrobacter braakii</i>
CS1	<i>Cedecea lapagei</i>
CS2	<i>Citrobacter braakii</i>
CS3	<i>Pseudomonas</i> antártica
CS5	<i>Curtobacterium plantarum</i>
CT2	<i>Pseudomonas</i> antártica
CT5	<i>Pseudomonas poae</i>
CT8	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> ,
CR1	<i>Lelliottia amnigena</i>
CR2	<i>Citrobacter braakii</i>
CR3	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>
CR9	<i>Citrobacter braakii</i>
CR11	<i>Cedecea lapagei</i>
CR13	<i>Serratia quinivorans</i>
CR16	<i>Enterobacter ludwigii</i>
CR17	<i>Citrobacter freundii</i>
CR18	<i>Buttiauxella agrestis</i>
CR21	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>
CR27	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>
MH3	<i>Pseudomonas cichorii</i>
MH5	<i>Pseudomonas vranovensis</i>
MH8	<i>Pseudomonas baetica</i>
MH13	<i>Staphylococcus aureus</i>
MT8	16S negativo
MT11	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>
MT13	<i>Bacillus aerius</i>
MR6	16S negativo
MR10	16S negativo
MR12	<i>Pseudomonas</i> antártica
TE7	<i>Curtobacterium plantarum</i>
TE9	<i>Bacillus safensis</i>
TE15	<i>Curtobacterium albidum</i>
TT5	<i>Pseudomonas caspiana</i>
TT8	<i>Rhodococcus canchipurensis</i>
TS2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
TS3	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>

Tabla 9: Especies bacterianas y las actividades sobre las que basan su calificación como bacterias promotoras del crecimiento.

ESPECIE	RASGOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS	FUENTE
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Produce giberelinas y ácidos orgánicos (málico, succínico y cítrico).	Kang <i>et al.</i> 2012
<i>A. oleivorans</i>	Produce IAA, lipasas y solubiliza P.	Almeida Lopes <i>et al.</i> 2015
<i>A. pittii</i>	Produce IAA, ACC desaminasa, sideróforos y solubiliza P.	Ahmad <i>et al.</i> 2016
<i>Bacillus aerius</i>	Agente de control biológico, presenta actividad antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> .	Shafi <i>et al.</i> 2016
<i>B. altitudinis</i>	Produce sideróforos, IAA, quitinasas, proteasas, cianuro de hidrógeno (HCN) y solubiliza P. Agente de control biológico, presenta actividad antifúngica contra <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Anamorfo: <i>Rhizoctonia solani</i>).	Sunar <i>et al.</i> 2015
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Agente de control biológico, antagonismo contra <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>Pythium ultimum</i> . Producción de quitinasas, celulasas, proteasas y auxinas.	Tejera Hernández <i>et al.</i> 2011; Ramírez Rodríguez 2010
<i>B. atropheus</i>	Agente de control biológico, presenta actividad antifúngica y antibacteriana.	Mwita <i>et al.</i> 2016; Chan <i>et al.</i> 2013
<i>B. halotolerans</i> (<i>Brevibacterium halotolerans</i>)	Puede inhibir el crecimiento de patógenos gram positivos y gram negativos mediante la producción de una variedad de metabolitos secundarios con distintas bioactividades.	Ahmed <i>et al.</i> 2015; Sgroy <i>et al.</i> 2009
<i>B. mojavensis</i>	Agente de control biológico, presenta actividad antifúngica contra <i>Fusarium moniliforme</i> .	Bacon y Hinton, 2002
<i>B. pumilus</i>	Producción de IAA.	Ramírez Rodríguez 2010; Sgroy <i>et al.</i> 2009; Tejera Hernández <i>et al.</i> 2011
<i>B. safensis</i>	Agente de control antimicrobiano.	Kakade y Chaphalkar, 2017
<i>B. siamensis</i>	Agente de control biológico, inhibe el crecimiento micelial de los hongos patógenos de plantas <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> . Capacidad para producir giberelinas y solubilizar P.	Ambawade y Pathade, 2015; Jeong <i>et al.</i> , 2012; Nongkhlaw y Joshi, 2014

<i>B. subtilis</i>	Agente de control biológico, antagonismo contra <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> . Produce IAA, sideróforos, proteasas, lipasas, glucanasas y fija nitrógeno atmosférico.	Abd-Alla <i>et al.</i> , 2016; Almeida Lopes <i>et al.</i> , 2015; Ngamau <i>et al.</i> , 2012; Ramírez Rodríguez 2010; Sgroy <i>et al.</i> , 2009
<i>B. tequilensis</i>	Produce IAA, sideróforos (riboflavina o vitamina B2) y solubiliza P.	Abd-Alla <i>et al.</i> , 2016; Dastager <i>et al.</i> , 2011
<i>B. vallismortis</i>	Provoca resistencia sistémica inducida (ISR) en varios cultivos, por ejemplo: protección de las plantas contra el virus de la patata Y y X (PVY y PVX).	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>B. velezensis</i>	Produce IAA, amoniaco, ACC desaminasa, proteasas y fija nitrógeno. Provoca resistencia sistémica inducida a patógenos fúngicos (<i>Fusarium fujikuroi</i>) y bacterianos (<i>Streptomyces scabies</i> , <i>Burkholderia glumae</i>).	Harun-Or-Rashid <i>et al.</i> , 2017; Meng <i>et al.</i> , 2016
<i>Buttiauxella izardii</i>	Solubiliza P.	Nongkhaw y Joshi, 2014; Ruangsanka, 2014
<i>Citrobacter freundii</i>	Produce IAA.	Almeida Lopes <i>et al.</i> , 2015
<i>Curtobacterium albidum</i>	Agente de biocontrol, actividad antagonista contra <i>Xanthomonas Campestris</i> .	Ali <i>et al.</i> , 2012; Ali <i>et al.</i> , 2016
<i>C. citreum</i>	Produce celulasas.	Miliute <i>et al.</i> , 2015; Nongkhaw y Joshi, 2014
<i>C. flaccumfaciens</i>	Produce IAA, sideróforos, proteasas, lipasas y quitinasas.	Almeida Lopes <i>et al.</i> , 2015; Perez <i>et al.</i> , 2009
<i>Enterobacter asburiae</i>	Solubiliza P, produce sideróforos y fija nitrógeno atmosférico.	Li <i>et al.</i> , 2016; Ngamau <i>et al.</i> , 2012; Perez <i>et al.</i> , 2009
<i>E. cancerogenus</i>	Solubiliza P.	Miliute <i>et al.</i> , 2015; Ruangsanka, 2014
<i>E. cloacae</i>	Produce IAA, proteasas, lipasas y quitinasas.	Almeida Lopes <i>et al.</i> , 2015; Miliute <i>et al.</i> , 2015; Perez <i>et al.</i> , 2009
<i>E. hormaechei</i>	Solubiliza P.	Ruangsanka, 2014
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico.	Miliute <i>et al.</i> , 2015; Nongkhaw y Joshi, 2014; Perez <i>et al.</i> , 2009

<i>Kluyvera ascorbata</i>	Produce sideróforos y ACC desaminasa. Protege contra la toxicidad del níquel.	Burd <i>et al.</i> , 1998; De Laurentis <i>et al.</i> , 2014; Glick, 2003
<i>K. intermedia</i>	Produce IAA y solubiliza P.	Pallavi y Gupta, 2013
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico.	Nongkhaw y Joshi, 2014
<i>Pantoea rodasii</i>	Produce amonio, HCN y ACC desaminasa.	Walpola <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Activa la resistencia sistémica inducida (ISR) contra <i>Colletotrichum orbiculare</i> (hongo causal de antracnosis).	Sang <i>et al.</i> , 2014
<i>P. baetica</i>	Solubiliza P, fija nitrógeno atmosférico y produce quitinasas.	Nongkhaw y Joshi, 2014
<i>P. brassicacearum</i>	Produce ACC desaminasa.	Belimov <i>et al.</i> , 2007; Belimov <i>et al.</i> , 2001
<i>P. brenneri</i>	Produce IAA.	Ramírez Rodríguez, 2010
<i>P. chlororaphis</i>	Agente de control biológico, inhibe el crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hunziker <i>et al.</i> , 2015; Miliute <i>et al.</i> , 2015; Perez <i>et al.</i> , 2009
<i>P. corrugata</i>	Produce IAA.	Miliute <i>et al.</i> , 2015; Ramírez Rodríguez, 2010
<i>P. donghuensis</i>	Fuerte actividad antifúngica y antioomycete por la producción de compuestos orgánicos volátiles tales como sulfuro de dimetilo, tioacetato de S-metilo, tiocianato de metilo, trisulfuro de dimetilo y 1-undecano.	Ossowicki <i>et al.</i> , 2017
<i>P. entomophila</i>	Produce ACC desaminasa.	Kamala Kannan <i>et al.</i> , 2010
<i>P. extremorientalis</i>	Produce IAA en condiciones de alta salinidad.	Egamberdieva, 2011; Egamberdieva <i>et al.</i> , 2013
<i>P. fluorescens</i>	Produce IAA y solubiliza P. Agente de control biológico, inhibe el crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hunziker <i>et al.</i> , 2015; Miliute <i>et al.</i> , 2015; Perez <i>et al.</i> , 2009; Ramírez Rodríguez, 2010
<i>P. fragi</i>	Solubiliza P y produce IAA y HCN.	Selvakumar <i>et al.</i> , 2009
<i>P. frederiksbergensis</i>	Agente de biocontrol, inhibe el patógeno de plantas <i>Botrytis cinérea</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hunziker <i>et al.</i> , 2015; Melo <i>et al.</i> , 2016
<i>P. graminis</i>	Solubiliza P, produce sideróforos y fija nitrógeno atmosférico.	Ngamau <i>et al.</i> , 2012

<i>P. guariconensis</i>	Agente de control biológico, presenta actividad antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> (Podredumbre negra de la corona).	Patel <i>et al.</i> , 2015
<i>P. helmanticensis</i>	Solubiliza P.	Ramírez Bahena <i>et al.</i> , 2014
<i>P. jessenii</i>	Agente de control biológico, inhibe el crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hunziker <i>et al.</i> , 2015
<i>P. kilonensis</i>	Solubiliza P y produce ACC desaminasa. Actividad antifúngica contra <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> .	Vacheron <i>et al.</i> , 2017; Xu <i>et al.</i> , 2014
<i>P. koreensis</i>	Produce IAA, sideróforos, solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico.	Ngamau <i>et al.</i> , 2012; Macleod, 2016
<i>P. lutea</i>	Solubiliza P.	Peix <i>et al.</i> , 2004; Kwak <i>et al.</i> , 2016
<i>P. marginalis</i>	Agente de control biológico, inhibe el crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Belimov <i>et al.</i> , 2001; Hunziker <i>et al.</i> , 2015
<i>P. monteilii</i>	Producen IAA, sideróforos y solubilizaron P. Aumento de tolerancia frente a estrés por metales como el cromo (Cr).	Dharni <i>et al.</i> , 2014
<i>P. moraviensis</i>	Agente de control biológico, inhibe el crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hassan y Bano, 2015; Hunziker <i>et al.</i> , 2015; Ngamau <i>et al.</i> 2012
<i>P. mosselii</i>	Produce IAA y solubiliza P. Actividad insecticida contra el gusano de la raíz del maíz (WCR, <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)	De La Torre Ruiz <i>et al.</i> 2016; Wei <i>et al.</i> , 2018
<i>P. orientalis</i>	Actividad antagonista contra <i>Erwinia amylovora</i> , el agente causal de la bacteriosis bacteriana del fuego en <i>Rosaceae</i> .	Zengerer <i>et al.</i> , 2018
<i>P. palleroniana</i>	Solubiliza P, produce sideróforos y fija nitrógeno atmosférico.	Ngamau <i>et al.</i> , 2012; Nongkhaw <i>et al.</i> , 2014
<i>P. plecoglossida</i>	Producen IAA, sideróforos y solubilizaron P. Aumento de tolerancia frente a estrés por metales como el cromo (Cr).	Dharni <i>et al.</i> , 2014
<i>P. protegens</i>	Produce sideróforos, solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico. Agente de control biológico, presenta actividad antifúngica, antioomycete e insecticida.	Kupferschmied <i>et al.</i> , 2014; Ngamau <i>et al.</i> , 2012
<i>P. putida</i>	Produce IAA	Belimov <i>et al.</i> , 2001; Miliute <i>et al.</i> , 2015; Perez <i>et al.</i> , 2009; Sgroy <i>et al.</i> , 2009

<i>P. syringae</i>	Agente de control biológico, inhibe el crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hunziker <i>et al.</i> , 2015; Miliute <i>et al.</i> , 2015
<i>P. trivialis</i>	Produce IAA.	Ramírez Rodríguez <i>et al.</i> , 2010
<i>P. veronii</i>	Produce IAA. Agente de biocontrol, actividad nematocida e inhibe el crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Dickeya dianthicola</i> .	Hunziker <i>et al.</i> , 2015; Peñafiel Jaramillo <i>et al.</i> , 2016; Montes <i>et al.</i> , 2016
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico.	Nongklaw <i>et al.</i> , 2014
<i>R. terrigena</i>	Fija nitrógeno atmosférico.	Ngamau <i>et al.</i> , 2012
<i>Serratia plymuthica</i>	Produce IAA, sideróforos, quitinasas, glucanasas y proteasas. Agente de biocontrol, actividad antifúngica y antimicrobiana.	Berg <i>et al.</i> , 2000; De Vleeschauwer and Hofte, 2007; Ngamau <i>et al.</i> , 2012
<i>S. quinivorans</i>	Agente de biocontrol, actividad antifúngica y antimicrobiana. Solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico.	Nascimento <i>et al.</i> , 2016
<i>S. ureilytica</i>	Fija nitrógeno atmosférico.	Ngamau <i>et al.</i> , 2012
<i>Staphylococcus aureus</i>	Produce IAA, lipasas, quitinasas y solubiliza P.	Almeida Lopes <i>et al.</i> , 2015
<i>S. haemolyticus</i>	Produce IAA.	Ramírez Rodríguez, 2010
<i>S. pasteurii</i>	Produce sideróforos, lipasas y solubiliza P.	Almeida Lopes <i>et al.</i> , 2015; Ramírez Rodríguez, 2010
<i>Yokenella regensburgei</i>	Solubiliza P y fija nitrógeno atmosférico.	Ngamau <i>et al.</i> , 2012

4. Ensayo a campo: Trigo

Once cepas de organismos endófitos se evaluaron en ensayos de campo sobre un cultivar de trigo, de las cuales 8 son aislados de cebada (CE11, CS3, CS5, CT8, CR2, CR3, CR21 y CR27) y 3 de trigo (TE15, TS3 y TT5). Como características de selección de las cepas para ensayar se priorizaron la producción de IAA, solubilización de fosforo, género o especie, grupo de riesgo, cultivo y órgano.

Con el fin de determinar el efecto de la aplicación de bacterias se determinó el número de espigas por metro cuadrado. Todas las parcelas presentaron un número de plantas inferior al deseado considerando la densidad de siembra, esto pudo deberse a que el lote era bajo y como consecuencia del exceso de lluvias estuvo inundado entre la siembra y la emergencia del cultivo. Las plantas inoculadas con la cepa TS3 fueron las que presentaron el mayor número de espigas con una media de 115 espigas/m². Por el contrario, las plantas inoculadas con CR27 presentaron el menor número de espigas, 67 espigas/m². Las plantas de la parcela control el número de espigas promedio fue de 107 espigas/m². En cualquier caso es importante destacar que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 11).

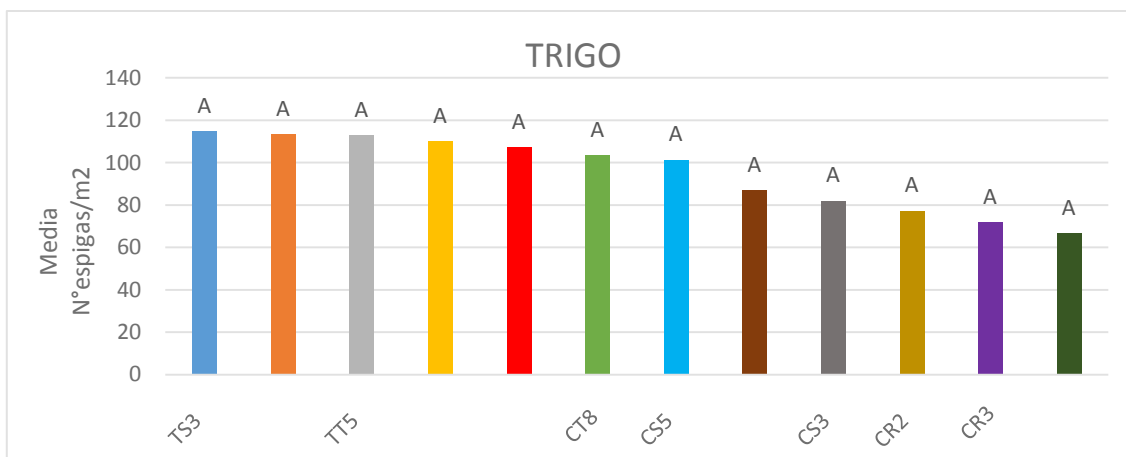


Figura 11: Media de plantas por metro cuadrado de las parcelas inoculadas y control, ensayo de trigo. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

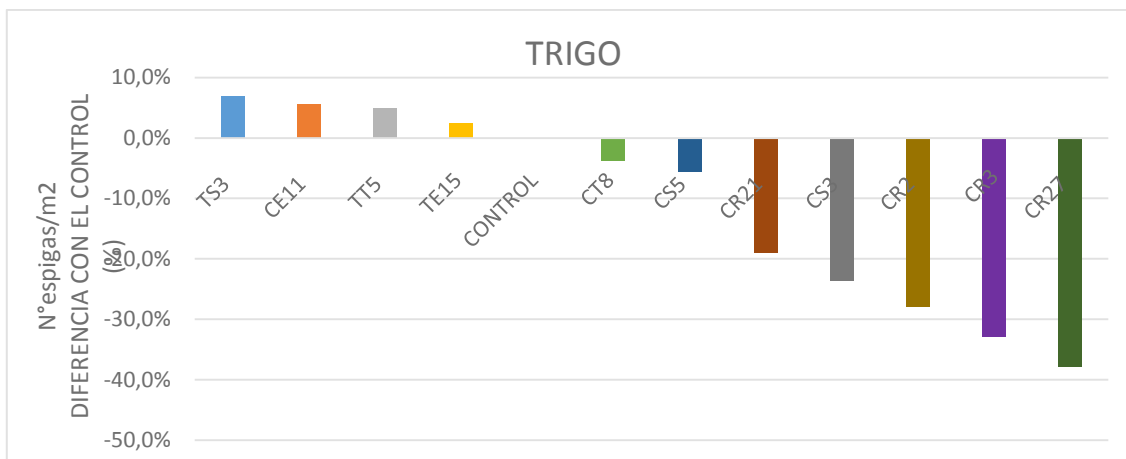


Figura 12: Porcentaje de diferencia en el N° de espigas/m² entre las cepas y el control sin inoculación, ensayo de trigo.

Por otro lado se procedió a analizar el peso de espigas y en este sentido aquellas provenientes de plantas inoculadas con siete cepas (TE15, TT5, TS3, CR27, CR2, CR21 Y CE11) mostraron una media superior a las de las plantas control (Fig. 13). Las plantas inoculadas con la cepa TE15 presentaron espigas con un peso 16,8% superior al de las plantas control, las plantas inoculadas con la cepa TT5 presentaron un peso 10,4% superior al control, y las inoculadas con TS3, CR27, CR2, CR21 y CE11 un 2,6%, 4,9%, 2,8%, 1,1% y un 0,6% mayor (Fig. 14). Estos resultados se pueden explicar al menos en parte por el número de espigas por metro cuadrado que no fue uniforme (Fig. 11), es decir que un menor número de espigas probablemente resulto en un aumento de peso de las espigas. Las plantas inoculadas con CR21, CR2 y CR27 presentaron menos espigas por m² que las plantas control no inoculadas (Fig. 11). En los cuatro tratamientos restantes, por otro lado, las plantas inoculadas con la cepa TS3 presentaron un 6,8% más de espigas por m² que el tratamiento control no inoculado, y las plantas inoculadas con CE11, TT5 y TE15, presentaron plantas con un 5,6%, 5% y 2,5% mayor de espigas que el control (Fig. 12). Si bien diversos tratamientos realizados con los endófitos seleccionados resultaron en un peso de espigas superiores al control, las diferencias no fueron significativas. Solo la

diferencia de peso de espigas entre las plantas inoculadas con TE15 y CS3 fue significativa (Fig. 13).

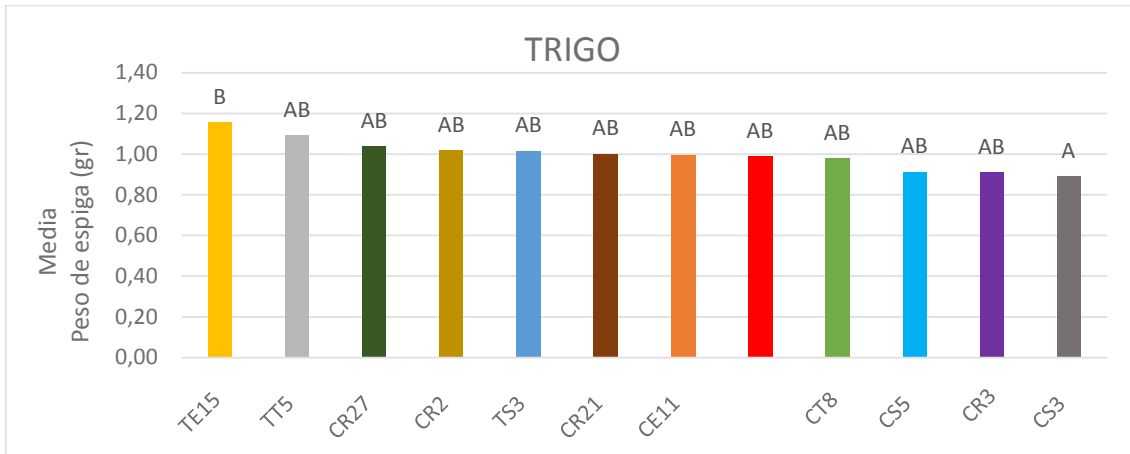


Figura 13: Media del peso de espigas de las parcelas inoculadas y control, ensayo de trigo. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.



Figura 14: Diferencia en el peso de la espiga entre las cepas y el control sin inoculación, ensayo de trigo.

En lo que hace al número de granos por espiga, los resultados estuvieron relacionados con los del peso de espigas, las plantas tratadas con siete cepas presentaron un número de granos superior al tratamiento control (Fig. 15). De la misma manera que cuando se analizó el peso de espigas el número de granos se encontró relacionado tal cual era de esperar con el número de espigas por metro cuadrado (Fig. 11). Las parcelas correspondientes a las plantas inoculadas con CR27, CR2, y CT8 presentaron un número

de espigas inferior al control (Fig.11). Nuevamente, las plantas inoculadas con las cepas, TE15, TT5, TS3 y CE11; presentaron un 19,7%, 17%, 8,6% y 8,1% mayor número de granos respectivamente que el control (Fig. 16). En cualquier caso solo el número de granos de las plantas inoculadas con TE15 y CS3 fue significativamente distinto (Fig. 15).

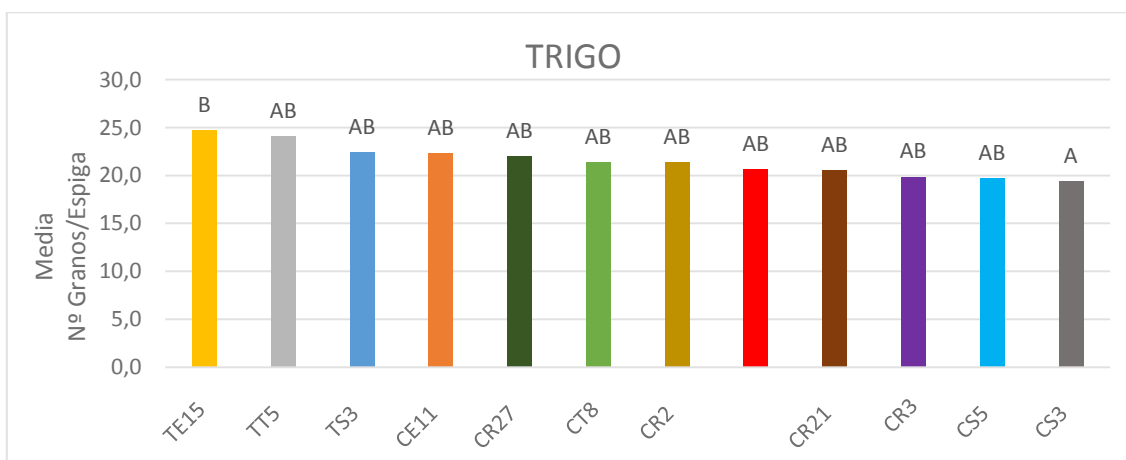


Figura 15: Media del número de granos por espigas de las parcelas inoculadas y control, ensayo de trigo. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

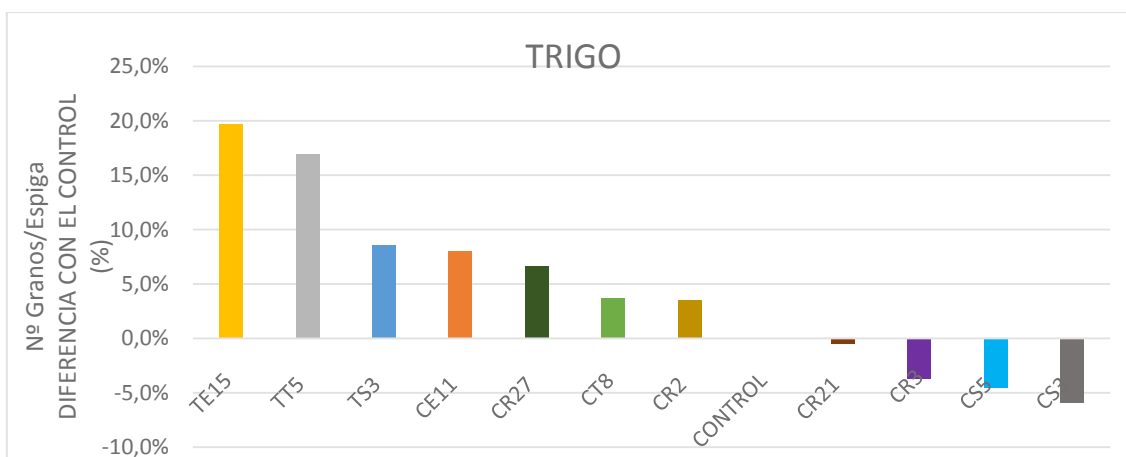


Figura 16: Diferencia en el Nº de granos por espiga entre las cepas y el control sin inoculación, ensayo de trigo.

En lo que hace al peso de los granos por espiga, se reflejaron los resultados descritos anteriormente (Fig. 17). Las plantas provenientes de las parcelas inoculadas con las cepas TE15 , TT5 , TS3 , CR2 , CR21 , CR27 Y CE11 presentaron medias 19,2%,

9,9%, 3,5%, 3%, 0,4%, 4,3% y 2,6% respectivamente superiores al de las plantas control (Fig. 18), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados de la misma manera que los anteriores y los resultados de las parcelas de los tratamientos CR2, CR21 y CR27 serían una consecuencia de la densidad de espigas. Solo se observaron diferencias significativas cuando se analizan los resultados de las plantas inoculadas con TE15 y las cepas CS3 y CR3 (Fig. 17).



Figura 17: Media del peso de granos por espigas de las parcelas inoculadas y control, ensayo de trigo. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

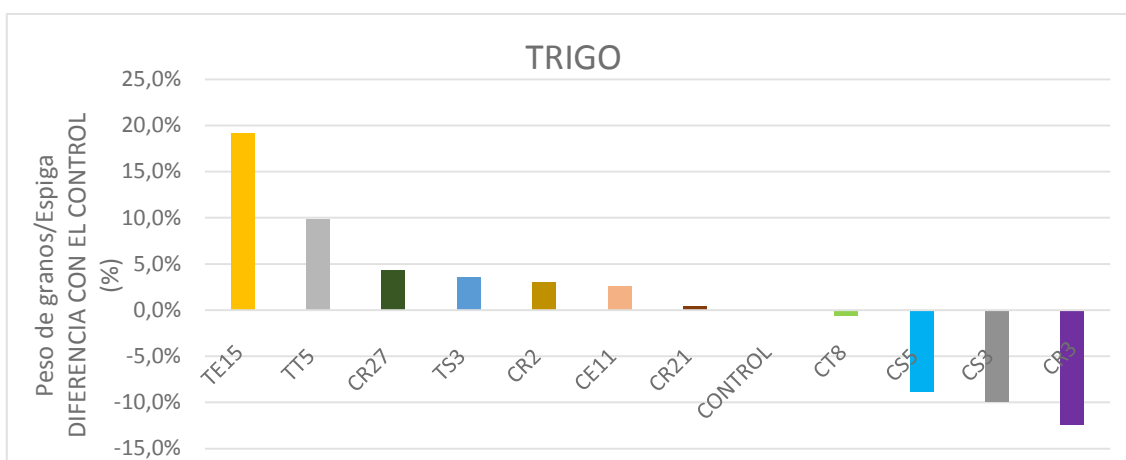


Figura 18: Diferencia en el peso de granos por espiga entre las cepas y el control sin inoculación, ensayo de trigo.

Por último, con los datos obtenidos se estimó un rendimiento medio de las cepas. Tal como se ve en la figura 19, las cepas TE15, TT5, TS3 y CE11 fueron las únicas cuyo rendimiento superó el del ensayo control, pero aun sin lograr una diferencia significativa.

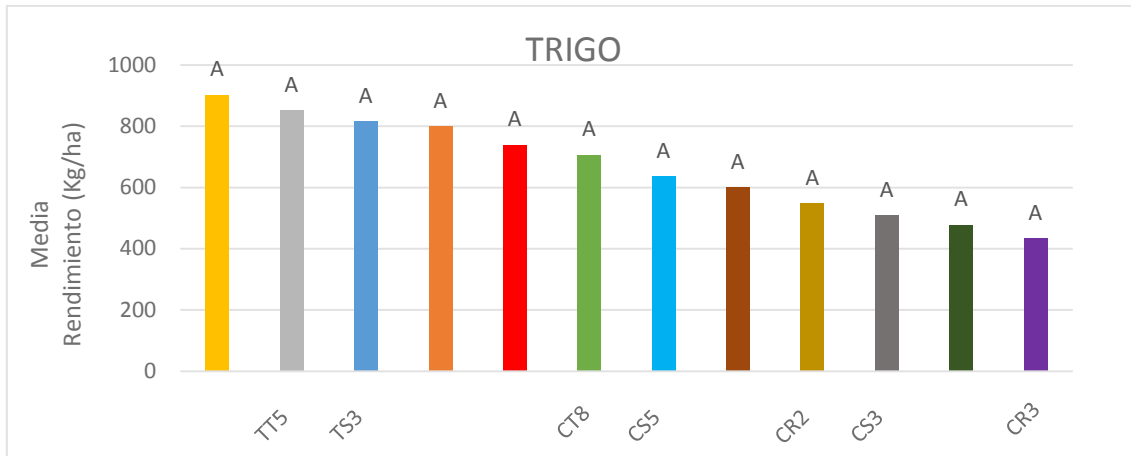


Figura 19: Media del rendimiento en kilogramos por hectárea de los ensayos en trigo. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

En cada uno de los componentes del rendimiento del trigo, los mismos cuatro endófitos indujeron en las plantas tratadas aumentos consistentes de los parámetros. Como se ve en la Tabla 10; las estirpes TS3, TT5 y CE11 presentan dos características importantes en común, todas son productoras de IAA y solubilizan fosfatos. Además, TS3 produce lipasas y proteasas; TT5 proteasas y exopolisacáridos; y CE11 exopolisacáridos. Las plantas inoculadas con la cepa bacteriana TE15 presentaron los mayores valores en lo que hace a componentes del rendimiento, sin embargo no produce IAA, no solubiliza fosfatos y es la única que produce sideróforos. Esta cepa también produce proteasas y lipasas.

Tabla 10: Resultados de la caracterización fenotípica de las muestras CE11, TE15, TT5 y TS3.

Muestra	IAA	Solub. P	Lipasas	Proteasas	Exopolisac.	Sideróforos
CE11	3	2			3	
TE15			3	3		3
TT5	2	2		2	1	
TS3	2	2	2	2		

5. Ensayo a campo: Maíz

En función de la caracterización fenotípica y genotípica de los aislados, se seleccionaron 10 cepas 5 se aislaron de cebada (CE11, CS3, CT8, CR2 y CR27), 4 de trigo (TE9, TE15, TS3 y TT5) y 1 de maíz (MH8). La selección de los aislados fue realizada priorizando la producción de IAA, solubilización de fósforo, género o especie, grupo de riesgo, cultivo y órgano.

En el ensayo de maíz realizado en la siembra temprana, las parcelas correspondientes a siete cepas TE9, MH8, CS3, TS3, TE15, CR2 y CT8 presentaron una media del peso de espiga superior a la del control (Fig. 20). TE9 presentó un peso de espiga 20,4% superior al de las plantas control y MH8, CS3, TS3, TE15, CR2y CT8 un 13,3%, 13,0%, 10,3%, 6,6%, 5,8% y un 3,7%, respectivamente (Fig. 21). Nuevamente estos resultados se relacionan negativamente con el número de espigas por parcela de cada tratamiento. (Fig. 22), ya que un menor número de espigas seguramente impacta en el peso de las mismas. Las plantas inoculadas con las bacterias MH8 y CR2 presentaron un menor número de espigas que el control, 9,3% y 11,6% respectivamente. El resto de las parcelas correspondientes a las distintas bacterias presentaron una mayor cantidad de espigas que las plantas de la parcela control, CT8 48,8%, TE15 23,3%, TS3 20,9% y TE9 7%. Solo la parcela de maíz inoculada con CS3 no mostró diferencias respecto del control. La cepa CT8 tuvo una diferencia significativa del número de espigas con respecto al control (Fig. 22).

La parcela correspondiente al inoculo conteniendo TT5, presentó un peso de espiga 6,7% inferior al de la parcela control, pero superó en un 25,6% en la cantidad de espigas. Esto estaría mostrando el efecto de la bacteria sobre el crecimiento del maíz. Es importante destacar que esta misma cepa también provocó aumentos de rendimiento en plantas de trigo.

Si bien la inoculación con los organismos endófitos generaron plantas que superaron al cultivo sin inocular, no se observaron diferencias significativas respecto del control (ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 20). Esto es también algo típico de los tratamientos con bioinsumos, el efecto de la aplicación de bioinsumos se hace visible estadísticamente cuando se analiza un número alto de ensayos y/o cuando se dan situaciones de stress, situación en la que los endófitos o bioinsumos le dan una ventaja adaptativa a las plantas.

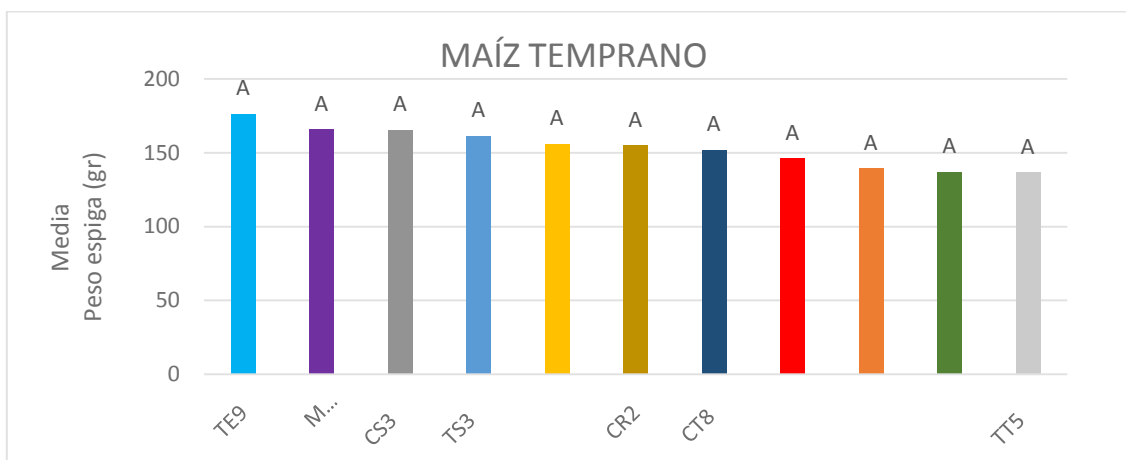


Figura 20: Media del peso de espiga de las parcelas inoculadas y control sin inoculación, ensayo de maíz temprano. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

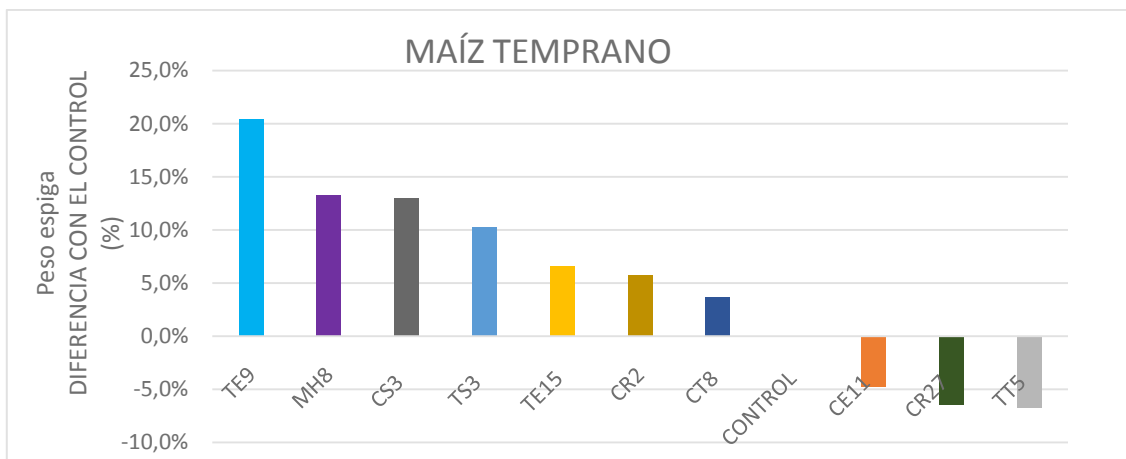


Figura 21: Diferencia en el peso de espiga entre las cepas y el control sin inoculación, ensayo de maíz temprano.

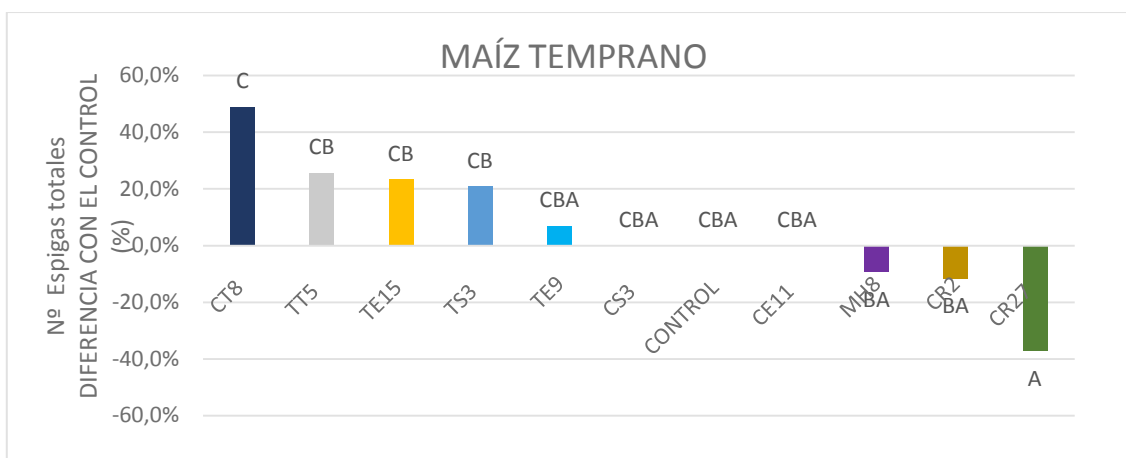


Figura 22: Porcentaje de diferencia en el número de espigas logradas entre las cepas y control sin inoculación, ensayo de maíz temprano. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

Con los datos del nº de espigas por unidad de superficie y el peso de las espigas se calculó el rendimiento de los ensayos en kilogramos por hectárea. En la estimación del rendimiento, al peso de las espigas se le descontó el peso del marlo, para el cual se consideró un valor aproximado del 20% del peso. Como se ve en la figura 23, las cepas CT8, TS3, TE15, TE9, TT5, CS3 y MH8 alcanzan rendimientos mayores que el control, pero solo uno, CT8, logra una diferencia estadística significativa.

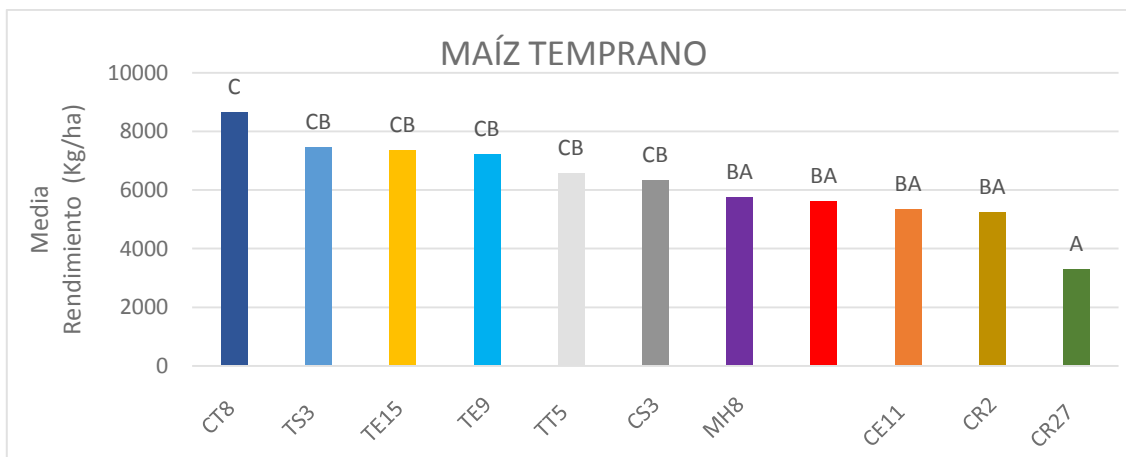


Figura 23: Media del rendimiento en kilogramos por hectárea de los ensayos en maíz temprano. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

En lo que hace al maíz en siembra tardía, los resultados difieren de los obtenidos en la siembra temprana (Fig. 24). Solo las plantas inoculadas con la estirpe CR27 presentaron un peso de espiga y cantidad de espigas superiores al tratamiento control, 1,9 y 11%, respectivamente (Fig. 25 y Fig. 26). Nuevamente es importante destacar que las diferencias muestran tendencias ya que no fueron estadísticamente significativas. La parcela inoculada con la cepa CT8 se perdió por lo tanto se eliminó del ensayo.

Las plantas de la parcela inoculada con TS3 superaron en el número de espigas al control en un 22,9 %, aunque presentó una merma del peso de espiga del 3,7%. Por otro lado las plantas inoculadas con el aislado CE11 superaron al control en un 25,7% en el número de espigas, sufriendo una reducción del peso de espiga de solo un 11,1%. Lo cual es lógico considerando que la misma cantidad de fotosintatos se reparte en un mayor número de espigas. Aun así estos datos sugieren que los endófitos modificaron el rendimiento del maíz. También en este caso el aislado TS3 mostró resultados consistentes en cuanto a la promoción del rendimiento en los ensayos de trigo y maíz temprano, mientras que CE11 solo en trigo.

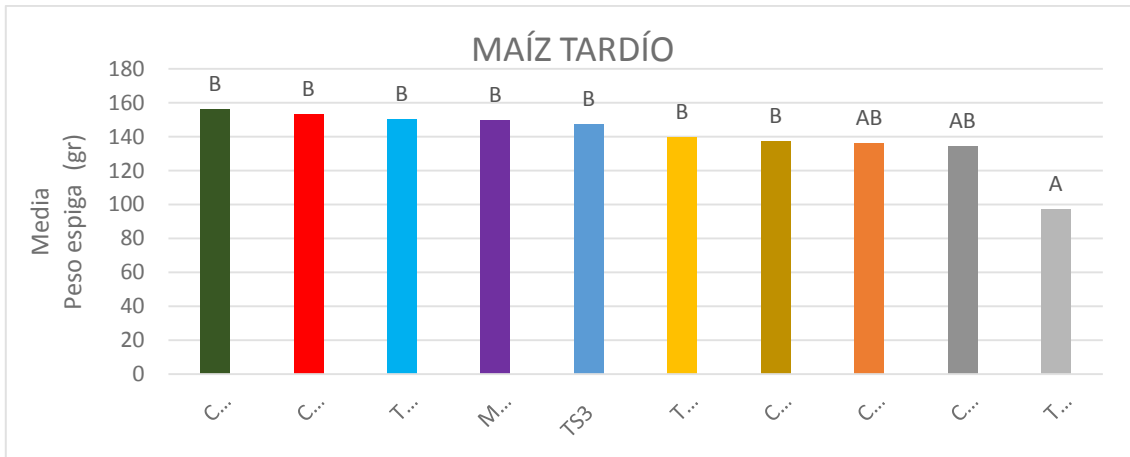


Figura 24: Media del peso de espiga de las parcelas inoculadas y control sin inoculación, ensayo de maíz tardío. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

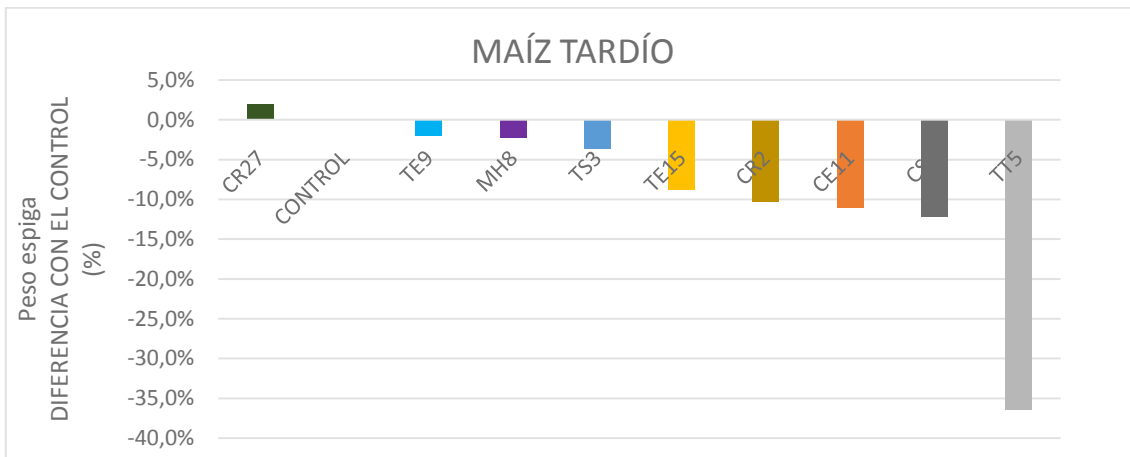


Figura 25: Diferencia en el peso de espiga entre las cepas y el control sin inoculación, ensayo de maíz tardío.

Al calcular el rendimiento, las cepas TS3, CR27, CE11, CS3 y MH8 superan la media de rendimiento del control pero sin ser una diferencia estadística significativa (Fig. 27). Comparando los resultados con los del maíz temprano, se repiten las cepas TS3, CS3 y MH8. Si bien los cálculos son estimativos, es de destacar que la cepa TS3 superó al control en los dos cultivos de maíz, siendo 33% superior en el temprano y 18% en el tardío.

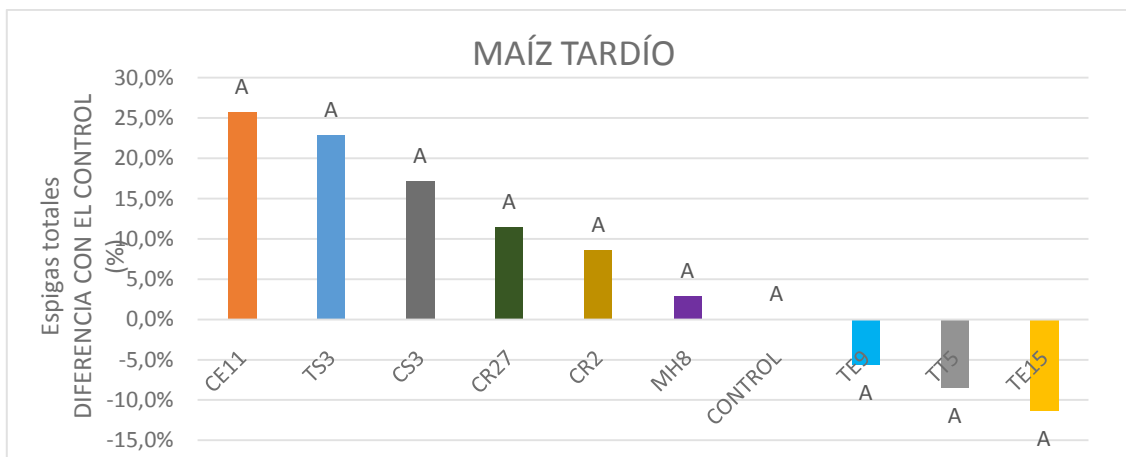


Figura 26: Diferencia en el número de espigas logradas entre las cepas y control sin inoculación, ensayo de maíz tardío. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

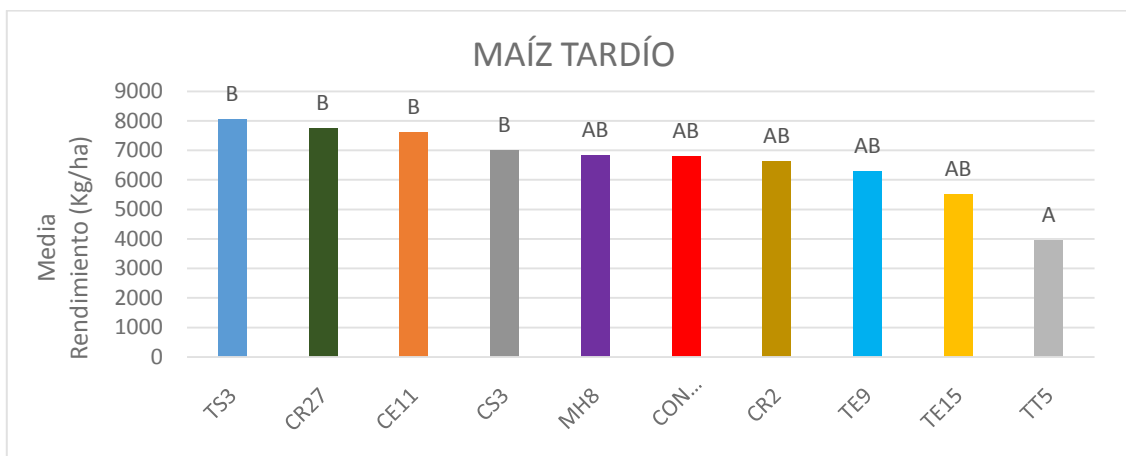


Figura 27: Media del rendimiento en kilogramos por hectárea de los ensayos en maíz tardío. Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas para un test de Tukey, $P < 0.05$.

CONCLUSIONES:

Del análisis de muestras vegetales recolectadas a campo de cebada, maíz y trigo, con el interés de aislar bacterias endófitas, identificarlas genotípicamente y evaluar sus características fenotípicas para comprobar su potencialidad como promotoras del crecimiento de las plantas, concluimos que:

- Una gran diversidad de bacterias endofíticas aisladas de un gran número de plantas agrícolas sugiere que las bacterias juegan un papel integral en el equilibrio de la fisiología de las plantas y el funcionamiento de los agroecosistemas.
- La simbiosis planta-PGPR incluye un gran número de especies de ambas partes. A su vez, dicha relación es de carácter poco específico ya que una especie bacteriana puede colonizar más de una especie vegetal y viceversa.
- Las especies bacterianas pueden colonizar cualquier tejido si bien no se distribuyen uniformemente en la planta.
- No hay relación entre un órgano en particular y la producción de IAA, ya que el órgano con mayor número de especies bacterianas productoras de IAA fue distinto en cada cultivo.
- El rendimiento no es función de la carga de endófitos ni de ningún rasgo promotor del crecimiento en particular o su combinación.
- Optimizar el uso de las interacciones cultivos-PGPR presenta un gran potencial para contribuir a prácticas agrícolas más sustentables, atendiendo a la protección de los recursos y a la seguridad y sanidad de los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Abd Alla M. H., Bagy M. M. K., Nafady N. A., Morsy F. M., Mahmoud G. A.-E. 2016. Activation of Riboflavin Production by *Bacillus subtilis* (KU559874) and *Bacillus tequilensis* (KU559876). *EC Bacteriology and Virology Research*.

Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. 2004. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkish Journal of Biology*. 29-34.

Ahmad S., Daur I., Al-Solaimani S. G., Mahmood S., Bakhshwain A. A., Madkour M.H., Yasir M. 2016. Effect of rhizobacteria inoculation and humic acid application on canola (*BRASSICA NAPUS L.*) CROP. *Pak. J. Bot.* 48(5): 2109-2120.

Ahmed H. A., Ebrahim W., Mikhailovna P. A., Henrich B., Proksch P. 2015. Extraction and Identification of some metabolites produced by antagonistic apple plant bacteria *Brevibacterium halotolerans*. *International Journal of Advanced Research*. 3(10): 1208-1217.

Alami Y., Achouak W., Marol C., Heulin T. 2000. Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. *Applied and environmental microbiology*. 66(8): 3393-3398.

Ali A., Bashir U., Akhtar N., Haider M. S. 2016. Characterization of growth promoting rhizobacteria of leguminous plants. *Pakistan Phytopathological Society*. 28(1): 57-60.

Ali A., Haider M. S., Mushtaq S., Khokhar I., Mukhtar I., Hanif S., Akhtar N. 2012. In Vitro, Controlling the Establishment of *Xanthomonas Campestris* with different Bacterial Bioagents. *Bangladesh J Microbiol.* 29(1): 37-40.

Almeida Lopes K.B., Carpentieri-Pipolo V., Oro T.H., Stefani Pagliosa E., Degrassi G. 2015. Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. *Journal of Applied Microbiology*. 120(3): 740-55.

Ambawade M. S., Pathade G. R. 2015. Production of Gibberellic Acid by *Bacillus siamensis* BE 76 Isolated from Banana Plant (*musa spp*). *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 4(7): 394-398.

Bacon C. W., Hinton D. M. 2002. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biological Control*. 23(3): 274-284.

Belimov A. A., Dodd I. C., Safronova V. I., Hontzeas N. and Davies W. J. 2007. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany*. 58(6): 1485-1495.

Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.J., Stepanok V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol.* 47(7): 642-52.

Berg G. 2000. Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymuthica* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 88(6): 952-960.

Burd G. I., Dixon D. G., Glick B. R. 1998. A Plant Growth-Promoting Bacterium That Decreases Nickel Toxicity in Seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 3663-3668.

Chan WY, Dietel K, Lapa SV, Avdeeva LV, Borriss R, Reva ON. 2013. Draft Genome Sequence of *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium. *Genome Announc.* 1(3): 233-13.

Chuang C., Kuo Y.L., Chao C., Chao W. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43: 575-584.

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. *Microb Ecol.* 62(1): 188-97.

Dastager S.G., Deepa C.K., Pandey A. 2011. Growth enhancement of black pepper (*Piper nigrum*. L) by a newly isolated *Bacillus tequilensis* NII-0943. *Biologia.* 6(5): 801-806.

De La Torre Ruiz N., Ruiz Valdiviezo V. M., Rincón Molina C. I., Rodríguez Mendiola M., Arias Castro C., Gutiérrez Miceli F. A., Palomeque Dominguez H., Rincón Rosales R. 2016. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Braz J Microbiol.* 47(3): 587–596.

De Laurentis V. L., De Bortoli S. A., Polanczyk R. A., Vacari A. M., Pires Veiga A. C., Placidi De Bortoli C., Linhares Volpe H. X. 2014. *Kluyvera ascorbata*: A Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) to Manage *Plutellaxylostella* (L., 1758) (Lepidoptera:Plutellidae). *International Journal of Research in Agricultural Sciences.* 1(5).

De Vleeschauwer D., Hofte M. 2007. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 2(46).

Dharni S., Srivastava A.K., Samad A., Patra D.D. 2014. Impact of plant growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* cv. bourbon) grown on tannery sludge amended soil. *Chemosphere.* 117:433-439.

Döbereiner, J., Baldani, V.L., Baldan, J.I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI. Disponible en: <https://www.google.com.ar/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiMguOJvXVAhVGkpAKHZ-FDywQFggIMAA&url=http%3A%2F%2Fainfo.cnptia.embrapa.br%2Fdigital%2Fbitstream%2Fitem%2F98370%2F1%2FComo-isolar-e-identificar-bacterias.pdf&usq=AFQjCNGE1fmscpw4YIUAvQtu65eRa8xhjQ>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Dunleavy J. M. 1989. *Curtobacterium plantarum* sp. nov. Is Ubiquitous in Plant Leaves and Is Seed Transmitted in Soybean and Corn. *International journal of systematic bacteriology.* 39(3): 240-249.

Egamberdieva D. 2011. Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions. *PLANT SOIL ENVIRON.* 57(3): 122–127.

Egamberdieva D., Jabborova D., Mamadalieva N. 2013. Salt-tolerant *Pseudomonas extremorientalis* Able to Stimulate Growth of *Silybum marianum* under Salt Stress. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 7(1): 7-10.

Fankem Henri, Ngo Nkot Laurette, Deubel Annette, Quinn John, Merbach Wolfgang, Etoa François-Xavier, Nwaga Dieudonné. 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. *African Journal of Microbiology Research*. 2: 171-178. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/253063510_Solubilization_of_inorganic_phosphates_and_plant_growth_promotion_by_strains_of_Pseudomonas_fluorescens_isolated_from_acidic_soils_of_Cameroon. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Foley J.A., DeFries R., Asner G. P., Barford C., Bonan G., Carpenter S. R., Chapin F. S., Coe M. T., Daily G. C., Gibbs H. K., Helkowski J. H., Holloway T., Howard E. A., Kucharik C. J., Monfreda C., Patz J. A., Prentice I.C., Ramankutty N., Snyder P. K. 2005. Global Consequences of Land Use. *Science*. 309 (5734): 570–574. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/rome2007/docs/Global_Consequences_of_Land_Use.pdf. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Glick B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*. 21: 383-393.

Guevara Avendaño E., Luna Rodríguez M., Aguilar P. O., Iglesias Andreu L. G., Trigós A., Martínez Hernández M. 2014. Effect of Rhizobacteria Indole producing on the Development of *Capsicum annuum* var. Jalapeño M. *International Research Journal of Biological Sciences*. 3(10): 22-27.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*. 43: 895–914. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Walter_Mahaffee/publication/237194410_Endophytic_Bacteria_in_Agricultural_Crops/links/0f31752d70ef0b19c7000000/Endophytic-Bacteria-in-Agricultural-Crops.pdf. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Harun Or Rashid M., Hwang J. H., Chung Y. R. 2017. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* YC7010, an endophytic bacterium with plant growth promoting, antimicrobial and systemic resistance inducing activities in rice. *Korean Journal of Microbiology*. 53(4): 329-331.

Hassan T. U., Bano A. 2015. The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 15(1): 190-201.

Hunziker L., Bönisch D., Groenhagen U., Bailly A., Schulz S., Weisskopf L. 2015. *Pseudomonas* Strains Naturally Associated with Potato Plants Produce Volatiles with High Potential for Inhibition of *Phytophthora infestans*. *Appl Environ Microbiol*. 81(3): 821-830.

Jeong H., Jeong D.E., Kim S.H., Song G.C., Park S.Y., Ryu C.M., Park S.H., Choi S.K. 2012. Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613T. *J Bacteriol*. 194(15): 4148-9.

Kado, C.I., Heskett, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 60: 969-976. Disponible en:

http://apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n06_969.PDF. Último acceso: 20/8/2017.

Kakade P. D., Chaphalkar S. R. 2017. Isolation and Purification of Antibacterial Peptide from *Bacillus safensis*, Endophytica Bacteria from *Anthocephalus kadamba*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 6(1): 504-511.

Kamala Kannan S., Lee K.J., Park S.M., Chae J.C., Yun B.S., Lee Y.H., Park Y.J., Oh B.T. 2010. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. J Basic Microbiol. 50(2): 200-205.

Kang S. M., Khan A. L., Hamayun M., Khan Shinwarl Z., Kim Y. H. Joo G. J., Lee I. J. 2012. *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. Pak. J. Bot. 44(1): 365-372.

Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., Gupta, V.K. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. Archives of Applied Science Research. 4: 1763-1770. Disponible en: <file:///C:/Users/juanmanuel/Downloads/AASR-2012-4-4-1763-1770.pdf>. Último acceso: 20/8/2017.

Kupferschmied P., Péchy Tarr M., Imperiali N., Maurhofer M., Keel C. 2014. Domain Shuffling in a Sensor Protein Contributed to the Evolution of Insect Pathogenicity in Plant-Beneficial *Pseudomonas protegens*. PLOS Pathogens. 10(2).

Kwak Y., Park G. S., Shin J. H. 2016. High quality draft genome sequence of the type strain of *Pseudomonas lutea* OK2T, a phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium. Standards in Genomic Sciences. 11(51).

Li H., Ding X., Wang C., Ke H., Wu Z., Wang Y., Liu H., Guo J. 2016. Control of Tomato yellow leaf curl virus disease by *Enterobacter asburiae* BQ9 as a result of priming plant resistance in tomatoes. Turkish Journal of Biology. 40: 150-159.

Loaces I. 2013. Caracterización de bacterias endofíticas productoras de sideróforos en arroz. M. Tesis. Facultad de Química. Universidad de la Republica Uruguay.

Loper, J.E., Schroth M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology. 76: 386-389. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n04_386.PDF. Último acceso: 20/8/2017.

Macleod K. 2016. The effect of *pseudomonas koreensis* on the level of drought tolerance of the *lianthus annuus* (Tesis de maestría). Faculty of Science, University of the Witwatersrand, Johannesburg.

Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kwon S.W., Sa T.M. 2010. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60(10): 2490-2495.

Melo I. S., Souza W. R., Silva L. J., Santos S. N., Assalin M. R., Zucchi T. D. and Queiroz S. C. N. 2016. Antifungal Activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 Isolated from the Antarctic Hair Grass *Deschampsia antárctica*. British Microbiology Research Journal. 14(3): 1-11.

Meng Q., Jiang H., Hao J. 2016. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*. 98: 18-26.

Miliute I., Buzaitė O., Baniulis D., Stanys V. 2015. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 102(4): 465–478.

Montes C., Altimira F., Canchignia H., Castro A., Sánchez E., Miccono M., Tapia E., Sequeira A., Valdés J., Tapia P., González C., Prieto H. 2016. A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: a grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences*. 11:76.

Mwita L., Chan W.Y., Pretorius T., Lyantagaye S.L., Lapa S.V., Avdeeva L.V., Reva O.N. 2016. Gene expression regulation in the plant growth promoting *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 stimulated by maize root exudates. *Gene*. 590(1): 18-28.

Nascimento F., Espada M., Barbosa P., Rossi M.J., Vicente C.S., Mota M. 2016. Non-specific transient mutualism between the plant parasitic nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and the opportunistic bacterium *Serratia quinivorans* BXF1, a plant-growth promoting pine endophyte with antagonistic effects. *Environ Microbiol*. 18(12): 5265-5276.

Naseem H. Bano A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*. 9(1): 689-701.

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 170: 265-270. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/170/1/265/454487/An-efficient-microbiological-growth-medium-for>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Ngamau C. N., Matiru V. N., Tani A., Muthuri C. W. 2012. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African Journal of Microbiology Research*. 6(34): 6414-6422.

Nongkhilaw FM, Joshi SR. 2014. Epiphytic and endophytic bacteria that promote growth of ethnomedicinal plants in the subtropical forests of Meghalaya, India. *Rev Biol Trop*. 62(4): 1295-308.

ONU (Organización de las Naciones Unidas). Revision of World Population Prospects 2017. Disponible en: https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Ossowicki A., Jafra S., Garbeva P. 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS ONE*. 12(3):174362.

Pallavi K. P., Gupta P. C. 2013. Psychrotolerant strain *Kluyvera intermedia* solubilizes inorganic phosphate at different carbon and nitrogen source. *The Bioscan*. 8(4): 1197-1201.

Park K., Paul D., Ryu K. R., Kim E. Y., Kim Y. K. 2006. *Bacillus vallismortis* Strain EXTN-1 Mediated Systemic Resistance against Potato virus Y and X in the Field. *The Plant Pathology Journal*. 22(4): 360-363.

Patel R. R., Thakkar V. R., Subramanian B. R. 2015. A *Pseudomonas guariconensis* strain capable of promoting growth and controlling collar rot disease in *Arachis hypogaea* L. *Plant Soil*. 390: 369–381.

Peix A., Rivas R., Santa Regina I., Mateos P. F., Martínez Molina E., Rodríguez Barrueco C., Velázquez E. 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 847–850.

Peñafiel Jaramillo M. F., Torres Navarrete E. D., Barrera Álvarez A. E., Prieto Encalada H. G., Morante Carriel J., Canchignia Martínez H. F. 2016. Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid “Thompson seedless” in vitro. *Ciencia y Tecnología*. 2016. 9(1): 31-36.

Perez C. A., Rojas S., J.Vale, Helson M. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 1(2): 286-301.

Ramírez Bahena M. H., Cuesta M. J., Flores Félix J. D., Mulas R., Rivas R., Castro Pinto J., Branás J., Mulas D., González Andrés F., Velázquez E., Peix A. 2014. *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 2338–2345.

Ramírez Bahena M. H., Cuesta M. J., Tejedor C., Igual J. M., Fernández Pascual M., Peix A. 2015. *Pseudomonas endophytica* sp. nov., isolated from stem tissue of *Solanum tuberosum* L. in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 2110–2117.

Ramírez Rodríguez D. 2010. Bacterias endofíticas aisladas de fresa (*Fragaria × ananassa* Dutch.) y su impacto sobre plantas de interés agrícola (Tesis de maestría). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de estudios de posgrado e investigación. Departamento de Microbiología. México, D. F.

Rariz G., Martínez A., Ferrando L., Menes R. J., Fernández Scavino A. 2013. Caracterización e interacciones entre bacterias con propiedades promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de arroz. *Revta. Agron. N. O. Argent.* 33(2): 13-24.

Rooney A. P., Dunlap C. A., Flor-Weiler L. B. 2016. *Acinetobacter lactucae* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (*Asteraceae: Lactuca sativa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 3566–3572.

Ruangsanka S. 2014. Identification of phosphate-solubilizing bacteria from the bamboo rhizosphere. *ScienceAsia*. 40: 204–211.

Samainab E., Tuinenc E., Jeandetd P., Aussenace T., Selima S. 2017. Biological control of septoria leaf blotch and growth promotion in wheat by *Paenibacillus* sp. strain B2 and *Curtobacterium plantarum* strain EDS. *Biological Control*. 114: 87-96.

Sang M. K., Kim E. N., Han G. D., Kwack M. S., Jeun Y. C., Kim K. D. 2014. Priming-Mediated Systemic Resistance in Cucumber Induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology*. 104(8): 834-42.

Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 160: 46–56. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Bernhard_Schwyn/publication/20204289_Universal_CAS_assay_for_the_detection_and_determination_of_siderophores/links/53d24ded0cf228d363e9315f/Universal-CAS-assay-for-the-detection-and-determination-of-siderophores.pdf. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Selvakumar G., Joshi P., Nazim S., Mishra P. K., Bisht J. K. and Gupta H. S. 2009. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biologia*. 64(2): 239-245.

Sgroy V., Cassán F., Masciarelli O., Del Papa M.F., Lagares A., Luna V. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85(2): 371-381.

Shafi J., Mingshan J., Zhiqiu Q., Xiuwei L., Zumin G., Xinghai L., Yang Z., Peiwen Q., Hongzhe T., Wunan C. and Kai W. 2016. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 61(3): 3039-3042.

Sunar K., Dey P., Chakraborty U., Chakraborty B. 2015. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of Basic Microbiol*. 55(1): 91-104.

Tejera Hernández B., Rojas Badía M. M., Heydrich Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 42(3): 131-138.

Tsavkelova E., Cherdyntseva T., Botina S., Netrusov A. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*. 162: 69-76 Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306000942>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Upadhyay S. K., Singh J. S., and Singh D. P. 2011. Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Soil Science Society of China. Pedosphere*. 21(2): 214-222. **USDA (United States Department of Agriculture).** Grain: World Markets and Trade. Disponible en: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

USDA (United States Department of Agriculture). World Agricultural Production. 2017. Disponible en: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Vacheron J., Desbrosses G., Renoud S., Padilla R., Walker V., Muller D., Prigent Combaret C. 2017. Differential Contribution of Plant-Beneficial Functions from *Pseudomonas kilonensis* F113 to Root System Architecture Alterations in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Mol Plant Microbe Interact*. 31(2): 212-223.

Vandana K., Reeta G. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res*. 158: 163–168 Disponible en: <http://site.iugaza.edu.ps/tbashiti/files/2011/02/sdarticle91.pdf>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

Walpolá B. C., Kong W. S. and Yoon M.H. 2013. Solubilization of Inorganic Phosphates and Plant Growth Promotion by *Pantoea* Strains. *Korean J. Soil Sci. Fert*. 46(6): 494-501.

Wei J. Z., O'Rear J., Schellenberger U., Rosen B. A., Park Y. J., McDonald M. J., Zhu G., Xie W., Kassa A., Procyk L., Perez Ortega C., Zhao J. Z., Yalpani N., Crane V. C., Diehn S. H., Sandahl G. A., Nelson M. E., Lu A. L., Wu G. and Liu L. 2018. A

selective insecticidal protein from *Pseudomonas mosselii* for corn rootworm control. *Plant Biotechnology Journal*. 16: 649–659.

Xu J., Deng P., Showmaker K.C., Wang H., Baird S.M., Lu S.E. 2014. The pqqC gene is essential for antifungal activity of *Pseudomonas kilonensis* JX22 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol Lett.* 353(2): 98-105.

Zengerer V., Schmid M., Bieri M., Müller D. C., Remus Emsermann M. N. P., Ahrens C. H. and Pelludat C. 2018. *Pseudomonas orientalis* F9: A Potent Antagonist against Phytopathogens with Phytotoxic Effect in the Apple Flower. *Front Microbiol.* 9: 145.

Zlosnik, J.E., Hird, T.J., Frankel, M.C., Moreira, L.M., Henry, D.A., Speert, D.P. 2008. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 46: 1470–1473. Disponible en: <http://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.201002-0203OC>. Ultimo acceso: 20/8/2017.

ANEXO

Tabla de resultados de la caracterización fenotípica de las muestras de bacterias endófitas aisladas.

Muestra	IA	Solub.	Lipás.	Proteas.	Exopolisac.	Siderof.	Muestra	IA	Solub.	Lipás.	Proteas.	Exopolisac.	Siderof.
CE1	1	2	3	3			MH14	1		2	2		
CE2		1			1		MH15	1		2	3	1	
CE3	1	2	2	3		1	MH16	1		1			
CE4			2	2	1		MH17	1					3
CE5	1	3	2	3			MT1						
CE6	1						MT2			1			3
CE7	1	3	2	3			MT3			1			
CE8	1	3	2	3			MT4			1			3
CE9				2			MT5	1					3
CE10	3	2			3		MT6	1					3
CE11	3	2			3		MT7			2	1		
CE12	1	2					MT8						2
CE13	1						MT9			1	2		
CE14	1		2	3			MT10	1			1		
CE15		3			2		MT11	1					
CE16	1	2			2		MT12				2		
CE17	3	1			1		MT13			1	2		
CS1	3	2	1				MR1						
CS2	2	2					MR2						3
CS3	2	2	4	3			MR3				1	1	
CS4		2	2	2			MR4	1		2	3		1
CS5	2	4			1		MR6	1	3	2		2	1
CS6	2		1				MR7	1		2	2		
CS7		4					MR8	3					1
CT1	1	1					MR10		1	1	3		1
CT2	1	2	3	3			MR11	1	3		2	2	
CT3	1	2					MR12	1	1	2	3		1
CT4	1	2	3	3		1	MR13	1	1	1	1		
CT5	1	3	2	2			MR14		1	1		1	
CT6		2	2				TE1		2			2	
CT7	1		1				TE2						3
CT8	2	2					TE3			1			3
CT9	1	2	1		2		TE4	2			2		1
CT10	1	1			1		TE5						1

CT11	1	4	1		1		TE6				2		
CT12		2			2		TE7	1	2			2	1
CR1	1	2			3		TE8		2	1	3		
CR2	3	2			3	1	TE9			2	1		
CR3	2	3			3		TE10						3
CR4	1	2			2		TE11				1		
CR5	1	2			1		TE12		1		3		
CR6	1	2	4	3	1	1	TE13		3			1	
CR7	1	2			1		TE14			2			2
CR8	1	1	4	2	2		TE15			3	3		3
CR9	3	3			1		TH1			2			
CR10	1	2			3		TH2			1			3
CR11	3	3	2		3		TH3					1	
CR12	1	2	2				TT1	1	1	2	1	1	
CR13	1	4	1				TT2		1	1		1	
CR14	1	1		2	1		TT3			1			
CR15	1	3	2				TT4			1	1		3
CR16	2	3	2				TT5	2	2		2	1	
CR17	3	3	2				TT6			1			
CR18	3	3	1		1		TT7			4			2
CR19	1	2			2		TT8			3			
CR20	1	1		2	1		TT9	1		1	3		
CR21	3	3			1		TT10			1	3		
CR22	3	1					TT11						
CR23	1	2			1		TR1			1			
CR24	1	1		3	1		TR2	1		2	3	1	
CR25	1	1					TR3			2	2		
CR26	3	1	1				TR4						1
CR27	3	3	1				TR5			1			3
CR28	1	2			2		TR6			1			3
MH1	3		1			1	TR7			1	1		3
MH2	2		1				TR8	1		3			
MH3	2					1	TR9			1	1		3
MH4							TR10				1		
MH5	2	2				1	TR11			2	2		
MH6						2	TR12				2		
MH7	3			1		1	TR13				3		
MH8	2	2				1	TR14	1		3	3		3
MH9	1			2		2	TS1			1			
MH10		1	1	3		1	TS2	1	2	2	3		
MH11			2			1	TS3	2	2	2	2		

MH12		2				TS4	1	2	3	2		
MH13		2			1							