

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MiCRoBiOLoGía Y GENÉTICA
iNSTiTVTO HiSPANo ~ LVSo DE iNVESTiGACIONES AGRARIAS



TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

Estudio metagenómico y culturómico de bacterias asociadas a *Phaseolus vulgaris* y *Brassica napus*, implicaciones funcionales y nutricionales de su aplicación como biofertilizantes en cultivos de interés agroalimentario y bioenergético, y evaluación del rol de la putrescina en la interacción bacteria-planta.

Memoria presentada por **Alejandro Jiménez Gómez** para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca.

Fdo. Alejandro Jiménez Gómez

Salamanca, 2020.

Dr. Raúl Rivas González, Profesor Titular del área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y la Dra. Paula García Fraile del área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral con Mención Internacional titulada “Estudio metagenómico y culturómico de bacterias asociadas a *Phaseolus vulgaris* y *Brassica napus*, implicaciones funcionales y nutricionales de su aplicación como biofertilizantes en cultivos de interés agroalimentario y bioenergético, y evaluación del rol de la putrescina en la interacción bacteria-planta”.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 15 de enero de 2020.



Fdo. Raúl Rivas González



Fdo. Paula García Fraile

“La ciencia es una forma de pensar, mucho más que un cuerpo de conocimientos”

Carl Sagan

“La ciencia se compone de errores que a su vez son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne

“La verdadera ciencia enseña por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

“Al carro de la cultura española le falta la rueda de la ciencia”

Santiago Ramón y Cajal

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo”

Margarita Salas



	<u>Índices</u>
	
	



Índices

1. Índice de contenidos (Pág. III).
 2. Índice de figuras (Pág. IX).
 3. Índice de tablas (Pág. XVIII).
 4. Abreviaturas y símbolos (Pág. XXIV).
-

Índice de contenidos.

- **Introducción** (Pág. 1).
 1. Agricultura: Problemas y retos actuales (Pág. 3).
 2. Interacciones beneficiosas planta – microorganismo (Pág. 4).
 - 2.1 Importancia de los bioinoculantes (Pág. 4).
 - 2.2 Modificaciones e influencia del uso de biofertilizantes en la rizosfera (Pág. 5).
 - 2.3 Análisis de la biodiversidad bacteriana (Pág. 6).
 3. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal (Pág. 7).
 - 3.1 Síntesis de sustancias asimilables por las plantas (Pág. 7).
 - 3.1.1 Fijación de nitrógeno (Pág. 7).
 - 3.1.2 Producción de fitohormonas (Pág. 9).
 - 3.1.3 Movilización de nutrientes (Pág. 10).
 - 3.1.3.1 Solubilización de fosfato (Pág. 10).
 - 3.1.3.2 Solubilización de potasio (Pág. 11).
 - 3.1.3.3 Producción de sideróforos (Pág. 12).
 4. Enzimas involucradas en la interacción planta-microorganismo (Pág. 13).
 - 4.1 Enzimas que degradan la pared celular vegetal (Pág. 13).
 - 4.1.1 Celulasas (Pág. 14).
 - 4.1.2 Xilanasas (Pág. 15).
 - 4.1.3 Pectinasas (Pág. 15).
 - 4.2 Poliaminas (Pág. 15).
 5. Bacterias PGPB utilizadas como biofertilizantes en cultivos de interés agroalimentario e industrial (Pág. 16).
 - 5.1 Género *Rhizobium* (Pág. 18).
 - 5.2 Género *Pseudomonas* (Pág. 19).
 - 5.3 Género *Bacillus* (Pág. 20).
 6. Cultivos de interés agroalimentario y/o bioenergético (Pág. 20).
 - 6.1 *Spinacia oleracea* L. (Pág. 20).
 - 6.2 *Cichorium endivia* L. (Pág. 21).
 - 6.3 *Coriandrum sativum* L. (Pág. 22).

- 6.4 *Brassica napus* L. (Pág. 22).
- 7. Análisis, estudio y edición de genomas bacterianos. Repercusión en las interacciones mutualistas planta-microorganismo (Pág. 23).
 - 7.1 Análisis de genomas bacterianos (Pág. 25).
 - 7.2 CRISPR-Cas9 (Pág. 26).
 - 7.3 Aplicaciones del sistema de edición genética CRISPR-Cas9 en las interacciones planta – microorganismo (Pág. 29).
- **Objetivos** (Pág. 33).
- **Materiales y métodos** (Pág. 37).
 - 1. Microorganismos utilizados en el estudio (Pág. 39).
 - 1.1 Recolección de muestras (Pág. 39).
 - 1.2 Aislamiento de cepas bacterianas (Pág. 39).
 - 1.3 Mantenimiento y conservación de los aislados (Pág. 40).
 - 2. Análisis de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal (Pág. 40).
 - 2.1 Solubilización de fosfato (Pág. 40).
 - 2.2 Producción de sideróforos (Pág. 40).
 - 2.3 Determinación de grupo de sideróforos producido (Pág. 41).
 - 2.4 Producción de ácido indol-acético (Pág. 41).
 - 3. Estudio de la capacidad de colonización de los aislados (Pág. 43).
 - 3.1 Producción de celulosa (Pág. 43).
 - 3.2 Producción de celulasas (Pág. 43).
 - 3.3 Estudio de la capacidad de producción de biofilms (Pág. 43).
 - 3.4 Ensayo de adhesión y cohesión bacterianas en cepas del género *Pseudomonas* (Pág. 45).
 - 4. Técnicas bioquímicas (Pág. 45).
 - 4.1 Determinación cualitativa de la producción de celulosa por parte de cepas del género *Rhizobium* a partir de celulasas comerciales (Pág. 45).
 - 4.2 Determinación de la producción de pectinasas (Pág. 46).
 - 4.3 Determinación de la producción de xilanasas (Pág. 46).
 - 4.4 Determinación y análisis de la producción de putrescina (Pág. 47).
 - 5. Técnicas de biología molecular (Pág. 48).
 - 5.1 Extracción de ADN (Pág. 48).
 - 5.1.1 Extracción de ADN total (Pág. 48).
 - 5.1.2 Extracción de ADN de muestras vegetales (Pág. 48).
 - 5.1.3 Extracción de ADN total para secuenciación de genomas (Pág. 48).

- 5.1.4 Extracción de ADN plasmídico (Pág. 48).
- 5.2 Amplificación de ADN mediante PCR (Pág. 49).
 - 5.2.1 Obtención de perfiles 879F-RAP (Pág. 49).
 - 5.2.1.1 Análisis de los perfiles RAPD (Pág. 50).
 - 5.2.2 Amplificación y secuenciación del gen ribosómico ARNr 16S (Pág. 50).
- 5.3 Electroforesis (Pág. 51).
- 5.4 Análisis de las secuencias de ADN (Pág. 51).
- 5.5 Secuenciación de amplicones y análisis de los genomas (Pág. 51).
- 5.6 Conjugación bacteriana (Pág. 52).
 - 5.6.1 Marcaje de cepas del género *Rhizobium* con una proteína fluorescente GFP mediante conjugación biparental (Pág. 52).
 - 5.6.2 Marcaje de cepas del género *Pseudomonas* con una proteína fluorescente GFP mediante conjugación biparental (Pág. 53).
- 5.7 Transformación bacteriana (Pág. 54).
 - 5.7.1 Transformación por choque térmico de la cepa *E. coli* S17.1 con los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR (Pág. 54).
 - 5.7.2 Transformación por electroporación de la cepa CDVBN10 con los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR (Pág. 54).
 - 5.7.3 Transformación por electroporación de la cepa CDVBN10 Δ cpa con el plásmido pPHU231cpa (Pág. 55).
- 5.8 Edición de genomas mediante la técnica de edición genética CRISPR/Cas9 (Pág. 55).
- 5.9 Diseño y construcción del plásmido pPHU231cpa (Pág. 58).
- 6. Métodos de inmunohistoquímica (Pág. 59).
- 7. Ensayos en planta (Pág. 60).
 - 7.1 Desinfección y germinación de semillas en superficie (Pág. 61).
 - 7.2 Inoculación de semillas en placa (Pág. 61).
 - 7.3 Inoculación de semillas en maceta (Pág. 61).
 - 7.4 Inoculación de plantas en condiciones de invernadero (Pág. 62).
 - 7.5 Inoculación de plantas en ensayo de campo (Pág. 63).
 - 7.6 Análisis del material vegetal (Pág. 63).
 - 7.6.1 Análisis de macro/microelementos (Pág. 63).
 - 7.6.2 Análisis de compuestos fenólicos (Pág. 64).
- 8. Técnicas microscópicas (Pág. 64).
 - 8.1 Observación de raíces al microscopio óptico (Pág. 64).
 - 8.2 Observación de raíces al microscopio electrónico (Pág. 65).

8.3 Observación de raíces al microscopio confocal (Pág. 65).

- **Resultados y discusión** (Pág. 67).

- **Capítulo I** (Pág. 69).
 1. Análisis metagenómico de amplicones de nódulos de *P. vulgaris* y raíces de *B. napus* L. (Pág. 71).
 2. Recolección de muestras y aislamiento bacteriano (Pág. 73).
 3. Análisis de la diversidad bacteriana mediante la realización de perfiles 879F-RAPD (Pág. 75).
 4. Análisis del gen ribosómico ARNr 16S (Pág. 83).
 5. Análisis del culturoma de nódulos de *P. vulgaris* L. y raíces de *B. napus* L. (Pág. 87).
 6. *Microvirga brassicacearum* sp. nov. especie aislada del interior de las raíces de *Brassica napus* L. (Pág. 91).
 - 6.1 Caracterización genotípica (Pág. 92).
 - 6.1.1 Análisis del genoma y búsqueda de genes con potencial interés (Pág. 93).
 - 6.2 Caracterización fenotípica (Pág. 94).
 - 6.3 Caracterización quimiotaxonómica (Pág. 94).
 - 6.4 Descripción de *Microvirga brassicacearum* sp. nov. (Pág. 95).

- **Capítulo II** (Pág. 97).
 1. Análisis in vitro de los mecanismos PGP (Pág. 99).
 - 1.1 Producción de sideróforos (Pág. 99).
 - 1.2 Solubilización de fosfato (Pág. 101).
 - 1.3 Producción de celulosa (Pág. 102).
 - 1.4 Producción de enzimas líticas de polímeros vegetales (Pág. 104).
 2. Estudio *in silico* de los genomas de las cepas seleccionadas (Pág. 112).
 - 2.1 Descripción general de los genomas (Pág. 113).
 - 2.2 Análisis de genes de interés implicados en la promoción del crecimiento vegetal (Pág. 115).
 - 2.2.1 Genes implicados en la fijación de nitrógeno (Pág. 115).
 - 2.2.2 Genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas (Pág. 115).
 - 2.2.3 Genes implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos (Pág. 118).
 - 2.2.4 Genes implicados en el metabolismo del hierro (Pág. 119).
 - 2.2.5 Genes implicados en el metabolismo del fósforo (Pág. 120).

- 2.2.6 Genes implicados en la tolerancia a la salinidad y la solubilización de potasio (Pág. 121).
 - 2.3 Análisis de genes de interés implicados en la colonización (Pág. 122).
 - 2.3.1 Genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos (Pág. 122).
 - 2.3.2 Genes relacionados con la producción de biofilms (Pág. 124).
- **Capítulo III** (Pág. 127).
 1. Determinación de la producción de ácido indol-acético (Pág. 130).
 2. Determinación de la formación de biofilms *in vitro* (Pág. 131).
 3. Determinación de la producción de celulosa (Pág. 132).
 4. Análisis de la capacidad de colonización mediante microscopía óptica de fluorescencia (Pág. 133).
 5. Análisis de la promoción del crecimiento. (Pág. 134).
- **Capítulo IV** (Pág. 143).
 1. Estudio de la colonización de las cepas PEPV40, SCCPVE07 y CDVBN10 en raíces de escarola y cilantro mediante técnicas de microscopía electrónica (Pág. 147).
 2. Análisis de la promoción del crecimiento bajo condiciones normales y de estrés salino inducido (Pág. 151).
 - 2.1 Ensayo en cámara iluminada (Pág. 151).
 - 2.2 Ensayo en invernadero (Pág. 155).
 3. Evaluación y análisis del contenido nutricional (Pág. 159).
 4. Evaluación y análisis de compuestos fenólicos (Pág. 161).
- **Capítulo V** (Pág. 171).
 1. Diseño y obtención del mutante knock-out CDVBN10 Δ cpa mediante tecnología CRISPR/Cas9 (Pág. 174).
 2. Diseño de la complementación y obtención del mutante CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa (Pág. 176).
 3. Determinación de la producción de putrescina (Pág. 176).
 4. Análisis de la formación de biofilms de las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa (Pág. 178).
 5. Análisis de las curvas de crecimiento de las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa (Pág. 179).
 6. Evaluación de la producción de sideróforos (Pág. 180).
 7. Análisis y evaluación de las deformaciones y redirecciones de los pelos radiculares (Pág. 181).

8. Estudio de la colonización de las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa mediante microscopia confocal y electrónica (Pág. 185).
 9. Caracterización de la actividad celulolítica (Pág. 188).
 10. Análisis de la adhesión y cohesión bacterianas de las cepas CDVBN10 Y CDVBN10 Δ cpa (Pág. 189).
 11. Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. (Pág. 190).
 - 11.1 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. en los primeros estadios de desarrollo (Pág. 190).
 - 11.2 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. en condiciones de estrés salino e invernadero (Pág. 194).
 - 11.3 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. en condiciones de campo (Pág. 197).
- **Discusión general** (Pág. 201).
 - **Conclusiones** (Pág. 213).
 - **Summary** (Pág. 217).
 1. Introduction (Pág. 219).
 2. Objective (Pág. 219).
 3. Results and discussion (Pág. 219).
 4. Conclusions (Pág. 228).
 - **Conclusions** (Pág. 229).
 - **Bibliografía** (Pág. 233).
 - **Anexo** (Pág. 273).

Índice de figuras.

- **Figura 1:** Mapa de aridez de la Península Ibérica. Fuente: Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2017. (Pág. 4).
- **Figura 2:** Representación esquemática de algunos mecanismos PGP de microorganismos PGPR y PGPBE. Modificado de Celador-Lera et al., (2018). (Pág. 8).
- **Figura 3:** Composición de la pared celular vegetal, formada por los polisacáridos de hemicelulosa, celulosa y pectina. Modificado de McCann y Roberts (1994). (Pág. 13).
- **Figura 4:** *Spinacia oleracea* L. (Pág. 21).
- **Figura 5:** *Cichorium endivia* L. (Pág. 21).
- **Figura 6:** *Coriandrum sativum* L. (Pág. 22).
- **Figura 7:** *Brassica napus* L. (Pág. 23).
- **Figura 8:** Esquema de las tres generaciones de secuenciación de genomas bacterianos. Modificado de Loman y Pallen (2015). (Pág. 24).
- **Figura 9:** Alineamiento de secuencias SRSR de distintas especies. Con fondo negro, las posiciones conservadas. Las flechas indican el carácter palindrómico de las repeticiones (Mojica et al., 2000). (Pág. 27).
- **Figura 10:** Esquema del sistema de edición genética CRISPR-Cas9. La construcción sgRNA, formada por la secuencia crRNA (específica del ADN diana) y la secuencia tracrRNA que interactúa con Cas 9, permite la actividad endonucleasa de la proteína. Modificado de Jinek et al., (2012). (Pág. 28).
- **Figura 11:** Los DSB inducidos por la acción de la proteína Cas9 promueven la edición de genes. En esta figura se representan ambas vías de reparación del corte. NHEJ puede resultar en mutaciones InDel aleatorias y, por tanto, cambios en la pauta de lectura. HDR, al disponer de un molde de reparación, es capaz de dar lugar a una edición precisa y exacta en el lugar de corte. Modificado de Ran et al., (2013). (Pág. 29).
- **Figura 12:** Mapa de representación del plásmido pHc60. (Pág. 52).

- **Figura 13:** Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de nódulos de alubias crecidas en suelo del municipio San Cristóbal de la Cuesta utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos. (Pág. 76).
- **Figura 14:** Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de nódulos de alubias crecidas en suelo del municipio de Machacón utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos. (Pág. 77).
- **Figura 15:** Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de raíces de colza crecidas en el municipio de Peleas de Arriba utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos. (Pág. 78).
- **Figura 16:** Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de raíces de colza crecidas en el municipio de Castellanos de Villiquera utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos. (Pág. 79).
- **Figura 17:** Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining a partir de las secuencias del gen ARN ribosómico 16S que muestra la relación entre la cepa CDVBN77T y el resto de las especies del género *Microvirga*. La significancia de cada rama se indica mediante un porcentaje calculado con 1000 repeticiones, mostrando solo aquellos valores que fueron superiores al 50%. La escala indica una sustitución de nucleótidos por cada 100. Adaptado de Jiménez-Gómez et al., (2019). (Pág. 92).
- **Figura 18:** Representación gráfica de la anotación automática y el análisis funcional mediante RAST del genoma de *Microvirga brassicacearum* CDVBN77T. (Pág. 93).
- **Figura 19:** Aislados sembrados en medio M9-Cas-Agar en los que se observa la producción o ausencia de sideróforos. (Pág. 100).

- **Figura 20:** Placa de medio Pikovskaya en la que se observa la solubilización de fosfato por parte de algunos de los aislados de este estudio. (Pág. 102).
- **Figura 21:** Aislados sembrados en medio de cultivo suplementado con Rojo Congo en los que se observa la diferencia en la producción de celulosa. (Pág. 103).
- **Figura 22:** Fotografía de los aislados en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración rojiza indica ausencia de celulosa en el medio y por tanto una actividad celulítica positiva. (Pág. 105).
- **Figura 23:** Fotografía de los aislados en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración rojiza indica ausencia de pectina en el medio y por tanto una actividad pectinasa positiva. (Pág. 106).
- **Figura 24:** Fotografía de los aislados en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración indica ausencia de xilano en el medio y por tanto una actividad xilanásica positiva. (Pág. 107).
- **Figura 25:** Representación gráfica de la anotación automática y el análisis funcional mediante RAST de los genomas obtenidos en el presente estudio. a) *Bacillus halotolerans* SCCPVE07, b) *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10, c) *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y d) *Rhizobium laguerreae* MACPV40. (Pág. 114).
- **Figura 26:** Esquema obtenido mediante KEGG de la ruta metabólica de síntesis del ácido indol acético. En verde se representan las enzimas presentes en los genomas de *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y *Rhizobium laguerreae* MACPV40. (Pág. 117).
- **Figura 27:** Producción de biofilms en superficies inertes por parte de la cepa *R. laguerreae* PEPV40. Se indica la producción de biofilms en 24, 48 y 72 horas en una superficie abiótica (placas multipocillo). Las barras de error indican el error estándar. Barras con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 131).

- **Figura 28:** Ensayo de floculación realizado con la cepa *R. laguerreae* PEPV40. A) Crecimiento en YMB más Rojo congo (izquierda) e YMB (derecha) tras 5 días de incubación. B) Tratamiento de los flóculos. Izquierda: flóculos sin tratar. Derecha: flóculos tratados con 10 U mL⁻¹ de celulasas comerciales de *Trichoderma viridae*. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 132).
- **Figura 29:** Evaluación de la capacidad de la cepa *R. laguerreae* PEPV40_GFP para colonizar raíces de espinaca. Se muestran las fotografías obtenidas a 3 (A, D), 5 (B, E) y 7 (C, F) días post inoculación. El tamaño de la barra de las figuras A, B y C representa 60 µm. El tamaño de la barra de las figuras D, E y F representa 12 µm. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 133).
- **Figura 30:** Evaluación del efecto de la inoculación de la cepa *R. laguerreae* PEPV40 en los primeros estadios del desarrollo vegetal de plantas de espinaca. Evolución de la longitud de la parte aérea y de la raíz. Barras indican el error estándar. Los histogramas con las barras y las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, P= 0.05 en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 134).
- **Figura 31:** Evaluación del efecto de la inoculación de la cepa *R. laguerreae* PEPV40 en los primeros estadios del desarrollo vegetal de plantas de espinaca. Evolución de la longitud de la parte aérea y de la raíz. Se muestran ejemplares representantes de los tres días de análisis (izquierda = 3 dpi, centro = 5 dpi y derecha = 7 dpi). El tamaño de la barra representa 1 cm. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 135).
- **Figura 32:** Promoción del desarrollo vegetal de plantas de espinaca en condiciones de invernadero. Número de hojas (A), longitud de la parte aérea (B), peso fresco de la parte aérea (C) y peso seco de la parte aérea (D). Las barras indican el error estándar. Los histogramas con las barras y las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, P= 0.05 en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 136).
- **Figura 33:** Promoción del desarrollo vegetal de plantas de espinaca en condiciones de invernadero. (A) Plantas de espinaca tamaño "baby". (B) Plantas

- de espinaca tamaño “adulto”. El tamaño de las barras representa 270 mm. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 137).
- **Figura 34:** Análisis del contenido de clorofila en hojas (Unidades SPAD). Las barras indican el error estándar. Los histogramas con las barras y las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher’s Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 137).
 - **Figura 35:** Microscopia de fluorescencia de raíces de cilantro inoculadas con las cepas seleccionadas CDVBN10_GFP (A y D), PEPV40_GFP (B y E) y SCCPVE07 (C y F). Raíces teñidas con ioduro de propidio ($10 \mu\text{M}$). A), B) y C) corresponden a los 7 dpi y D), E) y F) a los 14 dpi. Las barras de las fotografías C), D) y F) corresponden a $100 \mu\text{m}$, las de las fotografías A), B) y E) a $200 \mu\text{m}$. (Pág. 149).
 - **Figura 36:** Microscopia de fluorescencia de raíces de escarola inoculadas con las cepas seleccionadas CDVBN10_GFP (A y D), PEPV40_GFP (B y E) y SCCPVE07 (C y F). Raíces teñidas con ioduro de propidio ($10 \mu\text{M}$). A), B) y C) corresponden a los 7 dpi y D), E) y F) a los 14 dpi. Las barras de las fotografías B), D), E) y F) corresponden a $100 \mu\text{m}$, las de las fotografías A) y C) a $200 \mu\text{m}$. (Pág. 150).
 - **Figura 37:** Resultado a los 30 dpi de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plantas de cilantro desarrolladas en cámara iluminada. Plantas regadas con medio Fahräeus (A) y regadas con medio Fahräeus NaCl 100mM (B). (Pág. 154).
 - **Figura 38:** Resultado a los 30 dpi de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plantas de escarola desarrolladas en cámara iluminada. Plantas regadas con medio Fahräeus (A) y regadas con medio Fahräeus NaCl 100mM (B). (Pág. 154).
 - **Figura 39:** Comparación del fenotipo mostrado por plantas de cilantro bajo condiciones normales (A) [(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa CDVBN10] y bajo condiciones de estrés salino (B) [(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07]. Comparación del fenotipo mostrado por plantas de escarola bajo condiciones normales (C) [(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa PEPV40] y bajo condiciones de estrés salino

- (D)[(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07]. (Pág. 157).
- **Figura 40:** Diseño del plásmido pSEVA-gRNAT-cpa. Contiene los 20 ribonucleótidos (crRNA) al lado del motivo adyacente del protoespaciador (PAM) y la secuencia de ARN tracrRNA. (Pág. 174).
 - **Figura 41:** Plásmido pSEVA-gRNAT-cpa-HR. Deriva del plásmido pSEVA-gRNAT-cpa. Contiene los 20 ribonucleótidos (crRNA) al lado del motivo adyacente del protoespaciador (PAM), la secuencia sgRNA y los 1000 pares de bases aguas abajo (HAL) y aguas arriba (HAR) del gen *cpa*. (Pág. 175).
 - **Figura 42:** Esquema del fragmento amplificado con los primers NCAKO-F y NCAKO-R para la cepa CDVBN10 y el mutante knock-out CDVBN10 Δ cpa. (Pág. 175).
 - **Figura 43:** Gel de electroforesis donde se observa la diferencia en el tamaño de la zona amplificada entre colonias de la cepa CDVBN10WT y colonias de la cepa CDVBN10 Δ cpa. (*) representa el marcador usado de 1Kb. (Pág. 176).
 - **Figura 44:** Gel de electroforesis donde se observa el tamaño de la banda amplificada con el primer universal M13. Este número corresponde a las pares de bases del gen *cpa* más las pares de bases de la secuencia del plásmido adyacentes al gen. (*) representa el marcador usado de 1Kb. (Pág. 176).
 - **Figura 45:** Ruta bacteriana de biosíntesis de putrescina. Se detalla en azul la implicación de la enzima n-carbamoyl putrescina amidasa (N-carbamoyl putrescine amidohydrolase). Adaptado de Sekula et al., (2016). (Pág. 177).
 - **Figura 46:** Resultados de las absorbancias medidas para las cepas correspondientes a las 16 y 24 horas de crecimiento a 28 °C en TY. Los valores son la media de 3 medidas tomadas por cada una de las cepas. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $p = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). (Pág. 178).
 - **Figura 47:** Curva de crecimiento bacteriano. Resultado de las absorbancias medidas para las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa. Cada valor representa la media de 3 medidas tomadas por cada una de las cepas. Las barras de error representan el error estándar. (Pág. 180).

- **Figura 48:** Análisis de la producción de sideróforos por parte de las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Las placas que se muestran son un representante de las 3 placas por cepa que se realizaron. (Pág. 180).
- **Figura 49:** Análisis del tipo de sideróforos producido por parte de las cepas CDVBN10 (wild type), CDVBN10 Δ cpa (KO) y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Las placas que se muestran son un representante de las 3 placas por cepa que se realizaron. (Pág. 181).
- **Figura 50:** Recuento de las redirecciones en los pelos radiculares de los tratamientos control, CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa, CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M de putrescina exógena, CDVBN10 Δ cpa + 1mM de putrescina exógena y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $p = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). (Pág. 182).
- **Figura 51:** Detalle de las redirecciones en los pelos radiculares de los diferentes tratamientos control (A y B), CDVBN10 (C y D), CDVBN10 Δ cpa (E y F), CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M de putrescina exógena (G y H), CDVBN10 Δ cpa + 1mM de putrescina exógena (I y J). (Pág. 183).
- **Figura 52:** Detalle de las deformaciones en los pelos radiculares de plantas de *B. napus* inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. La escala corresponde a 200 μ m. (Pág. 184).
- **Figura 53:** Fotografías de microscopía electrónica de raíces de colza a 7dpi que muestran la colonización bacteriana y formación de biofilms por parte de las cepas CDVBN10 (A y B) y CDVBN10 Δ cpa (C y D). La escala de A) corresponde a 3 μ m, C) a 5 μ m y B) y D) a 20 μ m. (Pág. 185).
- **Figura 54:** Fotografías de microscopía confocal en las que se muestran raíces de colza a los 10 dpi (A y D) y 35 dpi (B, C, E y F) inoculadas con las cepas CDVBN10_synGFP (A - C) y CDVBN10 Δ cpa_synGFP (D - F). Las raíces están teñidas con Yoduro de Propidio (rojo). A) y D) detalle de la superficie radicular. B), C), E) y F) cortes transversales de la raíz donde se observa tanto la colonización de los pelos radiculares como la colonización interior del córtex. (Pág. 187).

- **Figura 55:** Ensayo de actividad carboximetilcelulásica de las cepas siguientes: A) CDVBN10, B) CDVBN10 Δ cpa, C) CDVBN10 + 500 μ M Put, D) CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M Put, E) 500 μ M Put. Las tres columnas corresponden a las tres replicas realizadas por cada tratamiento. (Pág. 188).
- **Figura 56:** Resultados del ensayo de adhesión y cohesión bacteriana. A) Detalle de los anillos formados en el matraz debido a la adhesión bacteriana tras el crecimiento en agitación. B) Detalle de los biofilms adheridos a la base del matraz formados por ambas cepas. Los matraces son un representante significativo de las tres replicas realizadas por cada tratamiento. (Pág. 190).
- **Figura 57:** Representación de la longitud (A) y el peso seco (B) de la parte aérea de plantas de *Brassica napus* L. crecidas en condiciones de cámara iluminada y tras la inoculación con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa. Además, se incluyendo tratamientos con diferentes concentraciones de putrescina exógena añadida. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher's Protected LSD (Least significant differences). (Pág. 191).
- **Figura 58:** Comparación del fenotipo mostrado por plantas de colza a los 21 dpi bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestra una representación de los 4 tratamientos realizados. De izquierda a derecha: control negativo, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa y plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. (Pág. 192).
- **Figura 59:** Representación de la longitud (A) y el peso seco (B) de la parte aérea de plantas de *Brassica napus* L. crecidas en condiciones de cámara iluminada y tras la inoculación con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher's Protected LSD (Least significant differences). (Pág. 193).
- **Figura 60:** Detalle de la comparación del fenotipo mostrado por plantas de colza a los 21 dpi bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestra una representación significativa de los 4 tratamientos realizados. De izquierda a derecha: control negativo, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, plantas

- inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa y plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. (Pág. 194).
- **Figura 61:** Representación de los valores de peso húmedo (A) y peso seco (B) de la parte aérea de plantas de *Brassica napus* L. crecidas en condiciones de invernadero (45 dpi) y tras la inoculación con la cepa wild type CDVBN10, el mutante knock-out CDVBN10 Δ cpa y la complementación CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Hoagland y medio Hoagland + 200 mM NaCl. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). (Pág. 195).
 - **Figura 62:** Resultados del ensayo de campo. A la izquierda se muestra en detalle un ejemplar representante del tratamiento control y a la derecha un ejemplar representante del tratamiento con la cepa CDVBN10. La escala representa 12 cm. (Pág. 197).
 - **Figura 63:** Resultados del ensayo de campo. Representación de los valores de número de vainas (A), peso seco de las semillas por planta (g) y peso seco de la parte aérea (C) de plantas correspondientes al tratamiento control (izquierda) y plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 (derecha). Se representan los valores medios de las diferentes parcelas de muestreo. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.01$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). (Pág. 198).
 - **Figure 64:** Spinach growth promotion in greenhouse experiments. (A) Baby spinach. (B) Adult spinach. Bar 270 mm. Modified from Jiménez-Gómez et al., 2018. (Pág. 222).
 - **Figure 65:** Electron microscopy photographs of rape roots at 7 dpi showing bacterial colonization and biofilm formation by strains CDVBN10 (A and B) and CDVBN10 Δ cpa (C and D). Bar A) corresponds to 3 μ m, C) to 5 μ m and B) and D) to 20 μ m. (Pág. 227).
 - **Figure 66:** Phenotypes displayed by *B. napus* roots hairs after inoculation with CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa, CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M of exogenous putrescine,

CDVBN10Δcpa + 1mM of exogenous putrescine and CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa. Error bars with the same letter indicate that the values are not statistically significant, $p = 0.05$ based on Fisher's Protected LSD (Least significant differences). (Pág. 227).

Índice de tablas.

- **Tabla 1:** Ejemplos de bacterias PGPB inoculadas en cultivos hortícolas de interés agroalimentario o bioenergético. Modificado de Jiménez-Gómez et al., (2017). (Pág. 17).
- **Tabla 2:** Composición del medio YMA. (Pág. 275).
- **Tabla 3:** Composición del medio TSA. (Pág. 275).
- **Tabla 4:** Composición de los medios 869 y 869 - 1/10. (Pág. 275).
- **Tabla 5:** Composición de la solución III. (Pág. 275).
- **Tabla 6:** Composición del medio JMM. (Pág. 276).
- **Tabla 7:** Composición de la solución de elementos traza. (Pág. 276).
- **Tabla 8:** Composición de la solución de vitaminas. (Pág. 276).
- **Tabla 9:** Composición del medio TY. (Pág. 276).
- **Tabla 10:** Composición del medio M9. (Pág. 277).
- **Tabla 11:** ADN plasmídico utilizado en la presente tesis doctoral. (Pág. 49).
- **Tabla 12:** Composición del medio LB. (Pág. 277).
- **Tabla 13:** Concentraciones de los reactivos para la obtención de perfiles RAPD. (Pág. 49).
- **Tabla 14:** Condiciones para la obtención de perfiles RAPD. (Pág. 49).
- **Tabla 15:** Primers utilizados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. (Pág. 50).
- **Tabla 16:** Volúmenes de los reactivos para la amplificación del gen ARNr 16S. (Pág. 50).
- **Tabla 17:** Condiciones para la amplificación del gen ARNr 16S. (Pág. 50).
- **Tabla 18:** Composición del medio mínimo. (Pág. 277).
- **Tabla 19:** Primers utilizados para la comprobación de la electroporación bacteriana realizada. (Pág. 55).

- **Tabla 20:** Primers utilizados en la metodología CRISPR/Cas9 diseñados en la Tesis Doctoral. (Pág. 56).
- **Tabla 21:** Concentraciones de los reactivos para la edición genética. (Pág. 56).
- **Tabla 22:** Condiciones de PCR para la edición genética. (Pág. 56).
- **Tabla 23:** Cepas de *E. coli* obtenidas mediante edición genética. (Pág. 57).
- **Tabla 24:** Condiciones para la amplificación de los fragmentos upstream y downstream. (Pág. 57).
- **Tabla 25:** Primers utilizados en la comprobación del mutante knock-out CDVBN10 Δ *cpa*. (Pág. 58).
- **Tabla 26:** Concentraciones de los reactivos para la comprobación de la cepa CDVBN10 Δ *cpa*. (Pág. 58).
- **Tabla 27:** Condiciones para la comprobación de la cepa CDVBN10 Δ *cpa*. (Pág. 58).
- **Tabla 28:** Primers utilizados para la amplificación y comprobación del gen *cpa*. (Pág. 59).
- **Tabla 29:** Concentraciones de los reactivos para la amplificación del gen *cpa*. (Pág. 59).
- **Tabla 30:** Condiciones para la amplificación del gen *cpa*. (Pág. 59).
- **Tabla 31:** Composición del tampón PBS. (Pág. 60).
- **Tabla 32:** Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los filos mayoritarios correspondientes a las muestras de nódulos de alubia procedentes de ambos municipios. (Pág. 72).
- **Tabla 33:** Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los géneros mayoritarios correspondientes a las muestras de nódulos de alubia procedentes de ambos municipios. (Pág. 72).
- **Tabla 34:** Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los filos mayoritarios correspondientes a las muestras de raíces de colza procedentes de ambos municipios. (Pág. 73).
- **Tabla 35:** Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los géneros mayoritarios correspondientes a las muestras de raíces de colza procedentes de ambos municipios. (Pág. 73).

- **Tabla 36:** Resumen de las cepas bacterianas aisladas de nódulos de *P. vulgaris* L. (Pág. 74).
- **Tabla 37:** Resumen de las cepas bacterianas aisladas del interior de raíces de *B. napus* L. (Pág. 74).
- **Tabla 38:** Aislados de nódulos de alubias crecidas en el suelo proveniente del municipio San Cristóbal de la Cuesta. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos. (Pág. 80).
- **Tabla 39:** Aislados de nódulos de alubias crecidas en el suelo proveniente del municipio de Machacón. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos. (Pág. 80).
- **Tabla 40:** Aislados de raíces de colza crecidas en el suelo proveniente del municipio de Peleas de Arriba. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos. (Pág. 81).
- **Tabla 41:** Aislados de raíces de colza crecidas en suelos del municipio de Castellanos de Villiquera. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos. (Pág. 82).
- **Tabla 42:** Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en un suelo procedente de San Cristóbal de la Cuesta con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas. (Pág. 83).
- **Tabla 43:** Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en un suelo procedente de Machacón con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas. (Pág. 84).
- **Tabla 44:** Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en un suelo procedente de Peleas de Arriba con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas. (Pág. 85).
- **Tabla 45:** Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en un suelo procedente de Castellanos de Villiquera con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas. (Pág. 85).

- **Tabla 46:** Biodiversidad bacteriana obtenida de los aislados de nódulos de alubia de ambos municipios. Se detalla el filo, el género y las especies a las cuales pertenecen las 85 cepas. (Pág. 87).
- **Tabla 47:** Biodiversidad bacteriana obtenida de los aislados de raíces de colza de ambos municipios. Se detalla el filo, el género y las especies a las cuales pertenecen las 112 cepas. (Pág. 89).
- **Tabla 48:** Composición de ácidos grasos de la cepa CDVBN77 y de las especies tipo más cercanas del género *Microvirga*. 1, CDVBN77T; 2, *Microvirga flavescens* c27j1T; 3, *Microvirga aerophila* DSM 21344T; *Microvirga subterranea* DSM 14364T. Adaptado de Jiménez-Gómez et al., (2019). (Pág. 95).
- **Tabla 49:** Caracterización de los mecanismos PGP in vitro producidos por los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en San Cristóbal de la Cuesta (Salamanca). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa. (Pág. 108).
- **Tabla 50:** Caracterización de los mecanismos PGP in vitro producidos por los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en Machacón (Salamanca). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa. (Pág. 109).
- **Tabla 51:** Caracterización de los mecanismos PGP in vitro producidos por los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en Peleas de Arriba (Zamora). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa, (NG) indica crecimiento bacteriano negativo. (Pág. 110).
- **Tabla 52:** Caracterización de los mecanismos PGP in vitro producidos por los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en Castellanos de Villiquera (Salamanca). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa, (NG) indica crecimiento bacteriano negativo. (Pág. 110).
- **Tabla 53:** Características generales de los genomas de *Bacillus halotolerans* SCCVPE07, *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10, *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y *Rhizobium laguerreae* MACPV40. (Pág. 113).
- **Tabla 54:** Porcentaje de similitud entre la secuencia aminoacídica de la endoglucanasa anotada en *B. halotolerans* SCCVPE07 con las secuencias

- disponibles en bases de datos públicas tras el uso de la herramienta BLASTp. (Pág. 123).
- **Tabla 55:** Resultado del análisis nutricional de las plantas de espinaca en condiciones de invernadero. Se muestran tanto las espinacas tamaño “baby” como las espinacas tamaño “adulto”. (Pág. 138).
 - **Tabla 56:** Resultado del análisis nutricional de las plantas de espinaca en condiciones de invernadero. Se muestra el contenido de ácido cafeico y ácido ferulico. Los valores se muestran en nanogramos por gramo de muestra. Se estableció la cantidad de < 3 ng/g como límite de detección. (n.d= no detectado). (Pág. 140).
 - **Tabla 57:** Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de cilantro bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Fahræus (M.F.) y medio Fahræus + 100 mM NaCl (M.F. - 100 mM NaCl). (Pág. 153).
 - **Tabla 58:** Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de escarola bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Fahræus (M.F.) y medio Fahræus + 100 mM NaCl (M.F. - 100 mM NaCl). (Pág. 153).
 - **Tabla 59:** Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de cilantro bajo condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 158).
 - **Tabla 60:** Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de escarola bajo condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 158).
 - **Tabla 61:** Resultados del análisis elemental de las plantas de cilantro en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 160).
 - **Tabla 62:** Resultados del análisis elemental de las plantas de escarola en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con

- agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 161).
- **Tabla 63:** Resultado del análisis de ácidos fenólicos de las plantas de cilantro en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 163).
 - **Tabla 64:** Resultado del análisis de ácidos fenólicos de las plantas de escarola en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 163).
 - **Tabla 65:** Contenido total de los ácidos fenólicos en los diferentes tratamientos. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S.-100 mM NaCl). (Pág. 164).
 - **Tabla 66:** Resultados del análisis de flavonoles de las plantas de cilantro en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 166).
 - **Tabla 67:** Resultados del análisis de flavonoles de las plantas de escarola en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl). (Pág. 166).
 - **Tabla 68:** Concentración de putrescina analizada mediante cromatografía líquida (HPLC) de las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. (Pág. 177).
 - **Tabla 69:** Resultado de la inoculación de las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa en plántulas de *Brassica napus* L. bajo condiciones de invernadero tras 45 días de crecimiento. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Hoagland y medio Hoagland + 200 mM NaCl. (Pág. 196).
 - **Table 70:** Phenolic acids of coriander plants in greenhouse conditions. Data from plants irrigated with water (C.N) and saline solution - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl) are shown. (Pág. 225).

- **Table 71:** Phenolic acids of escarole plants in greenhouse conditions. Data from plants irrigated with water (C.N) and saline solution - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl) are shown. (Pág. 225).

Abreviaturas y símbolos.

DPI	Días post inoculación.	PAs	Poliaminas
YMA	Yeast Mannitol Agar	GHs	Glucosil hidrolasas
YMB	Yeast Mannitol Broth	GTs	Glicosil transferasas
ON	Overnight	PLs	Polisacárido liasas
GFP	Green Fluorescent Protein	CEs	Carbohidrato esterasas
RPM	Revoluciones por minuto	MCS	multiclonins site
°C	Grados centígrados	®	Marca registrada
pb	Pares de bases	cm	Centímetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico	CMC	Carbometilcelulosa
et al.,	Y colaboradores	g	Gramos
sp.	especie	mg	Miligramos
LB	Luria-Berthani	M	Molar
µL	Microlitros	mM	Milimolar
KO	Knock-out	Kb	kilobase
F	Forward	R	Reward
AIA	Ácido indol acético	mL	Mililitros
TAE	Tris acético EDTA	EDTA	Ácido etilendiaminoetetracético
HAL	Homology arm Left	HAR	Homology arm right
wt	Wild Type, cepa silvestre	UV	Ultravioleta
HoT	Hole on the tip	Had	Root hair deformation
RaT	Redirections at the tipe	h	horas
TY	Tryptone yeast	VRB	Violet red agar
PCR	Polymerase chain reaction	dNTP	Desoxinucleótidos-5'-fosfato
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology	BLAST	Basic Local Alignment Search tool



Introducción

1. Agricultura: Problemas y retos actuales.

La agricultura es el conjunto de actividades económicas y técnicas relacionadas con el tratamiento de los terrenos agrícolas para la producción de alimentos. Desde comienzos del siglo XX se han desarrollado nuevas tecnologías y maquinarias que han permitido el aumento de las producciones agrícolas, las cuales han satisfecho la demanda creciente de alimentos.

Pasada la mitad del siglo XX tuvo lugar la llamada *Revolución Verde*, período en la historia en el que aumentaron significativamente los rendimientos agrícolas debido a los siguientes motivos:

- Mejora genética vegetal, donde se realizó una selección de los mejores rasgos genéticos, adaptación a diferentes ambientes y una resistencia a estreses tanto abióticos como bióticos (Khush, 2001).
- Mejora en las técnicas de riego, modificaciones en los tiempos de siembra-cosecha, un mejor control de malas hierbas y un aumento en la aplicación de fertilizantes y pesticidas químicos (Zeng et al., 2014).

Fueron tales los beneficios alcanzados que si se analizan los rendimientos en cultivos como trigo, maíz, arroz y patata, las porcentajes que reflejan el aumento en su producción gracias a esta revolución fueron del 208 %, 157 %, 109 % y 78 %, respectivamente (Pingali, 2012).

Sin embargo, a pesar de las mejoras alcanzadas, esta *Revolución Verde* también desencadenó destacables desventajas, como fue el aumento de plagas y enfermedades en los terrenos, debido a las grandes extensiones de monocultivos. Además, el uso desmedido de cantidades excesivas de fertilizantes químicos añadidos incrementó la contaminación de aguas subterráneas, causando los consiguientes efectos en los subsistemas acuáticos, la pérdida de diversidad genética y problemas en la salud humana (Conway y Futures, 1988).

Actualmente la población mundial supera la cifra de 7000 millones de personas y, se calcula que esta cifra aumentará hasta los 9700 millones en 2050 (Berners-Lee et al., 2018). Así pues, existe la necesidad alarmante e indiscutible de aumentar la producción de alimentos y los rendimientos de los cultivos, sin afectar ni desembocar en más problemas para el medio ambiente (Jiménez-Gómez et al., 2018).

En el entorno científico existe un contexto generalizado sobre cómo el actual modo de producción y consumo energético está provocando una alteración climática global. El impacto generado en los ecosistemas causa destacables problemas como el incremento de las temperaturas, el aumento de la salinidad en los suelos o el aumento e intensidad de las sequías (Dai et al., 2018).

Se estima que el 33 % de las tierras cultivadas presentan altos niveles de salinidad y que el ritmo anual de salinización aumenta un 1 % anualmente, así pues, de continuar con esta dinámica, en el año 2050 el 50 % de las tierras dedicadas a la agricultura presentarán altas concentraciones salinas. Además, cada año se pierden 12.000 millones de hectáreas debido a la desertificación, la erosión y la sequía. Solamente en el territorio español más de dos terceras partes, hoy en día se consideran áreas áridas, semiáridas o subhúmedas secas (figura 1) (Ministerio de Agricultura y Pesca, alimentación y Medio Ambiente, 2017).

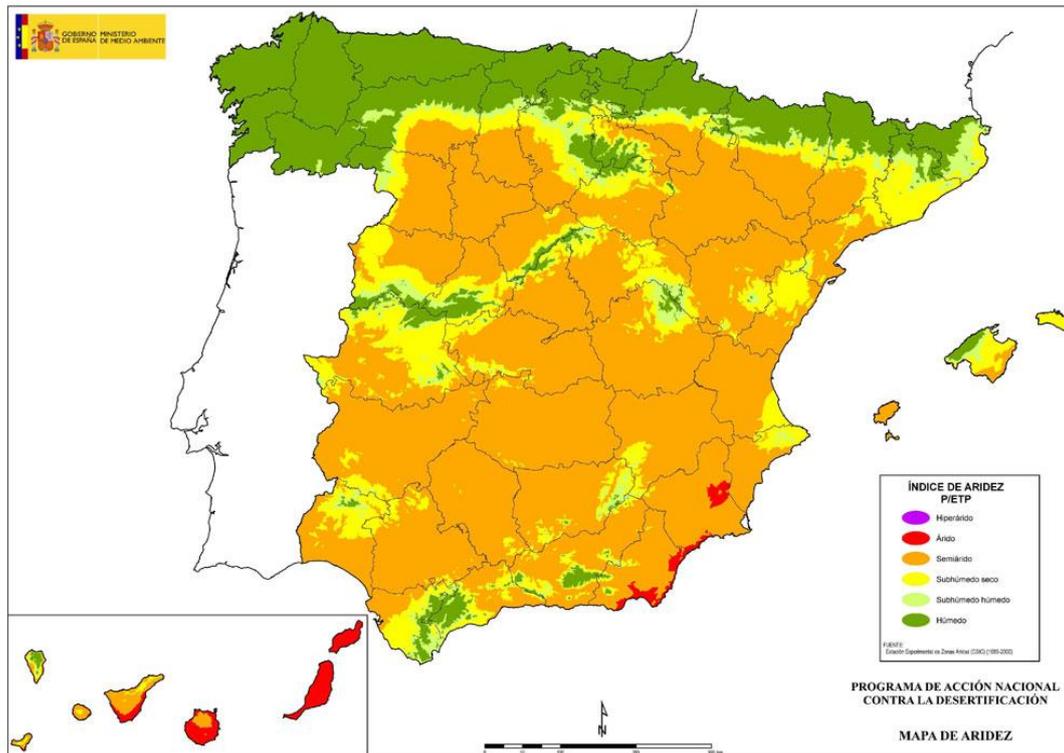


Figura 1: Mapa de aridez de la Península Ibérica. Fuente: Página web del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2017.

En este sentido, el reto científico del siglo XXI es aún mayor, la búsqueda de nuevas alternativas que puedan satisfacer la demanda de alimentos en el entorno actual, sin agravar la problemática ambiental ni la salud humana, debe ser considerado de prioridad extrema en la sociedad (Loboguerrero et al., 2019).

2. Interacciones beneficiosas planta-microorganismo.

2.1 Importancia de los bioinoculantes.

Una de las alternativas propuestas al problema mencionado anteriormente es el uso y la aplicación de fertilizantes basados en microorganismos beneficiosos, generalmente conocidos como PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), los cuales tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas a través de diferentes

mecanismos (directos y/o indirectos) denominados ampliamente mecanismos PGP (*Plant Growth Promoting mechanisms*) (García-Fraile et al., 2017).

Normalmente estos microorganismos son habitantes comunes de la rizosfera (PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), pero algunas especies son capaces de vivir como epífitos sobre los tejidos vegetales o incluso dentro de su huésped vegetal, como los endófitos (PGPBE: *Plant Growth Promoting Bacterial Endophytes*) (Celador-Lera et al., 2018).

Rhizobium es un género bacteriano al cual pertenecen múltiples especies endofíticas. Además, son múltiples los estudios que analizan y evalúan la simbiosis de este género bacteriano con plantas leguminosas. Fruto de esta interacción beneficiosa entre bacteria – planta se han diseñado biofertilizantes muy eficaces basados en distintas cepas y especies del género *Rhizobium* (Singh et al., 2018; Tan et al., 2015).

Las combinaciones de una o varias cepas bacterianas, tanto del género *Rhizobium* como de otros géneros con potencial interés, son realizadas y formuladas a través de productos comerciales, los cuales son aplicados a los campos de cultivo aumentando su rendimiento y disminuyendo el porcentaje de fertilizantes químicos aplicados (García-Fraile et al., 2017).

Por otro lado, cabe mencionar que actualmente existe en los consumidores una mayor conciencia del sistema de producción, seguridad y calidad alimentaria (Mishra et al., 2019). En este sentido, debido al aumento de la conciencia ambiental global, son muchos los países que están adaptando e incluyendo nuevas iniciativas y políticas, cuyos fines principales son la protección del medio ambiente y la transformación a sistemas de producción más sostenibles y seguros (Celador-Lera et al., 2018).

2.2 Modificaciones e influencia del uso de biofertilizantes en la rizosfera.

La rizosfera es aquella porción del suelo donde el sistema radicular de las plantas crece y se desarrolla. Juega un papel destacable en el balance del ecosistema del suelo, debido a los complejos procesos biológicos y ecológicos que ocurren en ella, así como las interacciones entre los distintos organismos (Wang et al., 2019).

Todos estos procesos influyen a las comunidades bacterianas presentes, así pues, es de considerable interés investigar sus variaciones dentro del conocimiento de las relaciones planta – bacteria, y en concreto en el beneficio en los rendimientos agrícolas. El estudio de estas comunidades bacterianas se centra, entre otros aspectos, en la producción bacteriana de hormonas, la disponibilidad de nutrientes para los cultivos y la reducción natural de los perjuicios causados por patógenos vegetales (Marschner et al., 2004).

Aunque las comunidades bacterianas que habitan en la rizosfera varían y cambian con el paso del tiempo, a día de hoy existen estudios que sugieren que hay una dependencia e interacción con el tipo de cultivo y, por tanto, los exudados radiculares secretados (Marschner et al., 2004).

En este sentido, las comunidades bacterianas y su relación con los cultivos son modificadas tras la aplicación prolongada de cualquier biofertilizante. Los estudios y análisis de la rizosfera realizados tras el empleo y aplicación de biofertilizantes bacterianos muestran que las comunidades mantienen en cierta medida el equilibrio entre géneros, pero, sin embargo, como es lógico, con una predominancia de las bacterias utilizadas en los inóculos. Según Shen et al., (2015) las poblaciones microbianas de la rizosfera de cultivos de banana infectados con *Fusarium* e inoculadas durante dos años con un biofertilizante basado en una cepa de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* sufrieron los siguientes cambios: 1) aumento de la diversidad bacteriana y reducción de la diversidad fúngica, 2) reducción de la abundancia de *Fusarium* y, 3) aumento de la variabilidad de taxones candidatos a reducir los signos de infección por *Fusarium* en las plantas.

Así pues, es posible la modificación de las comunidades bacterianas que habitan en la rizosfera mediante la aplicación de biofertilizantes, pero, sin embargo, se debe tener en cuenta la existencia de otros factores influyentes, como son las condiciones físicoquímicas del suelo, las cuales pueden favorecer o disminuir el crecimiento bacteriano (Shen et al., 2015).

2.3 Análisis de la biodiversidad bacteriana.

Dentro del estudio de la interacción planta – microorganismo son importantes las investigaciones que analizan la biodiversidad bacteriana asociada, ya sea aquella presente en el suelo, en la rizosfera, o en los propios cultivos.

Los primeros estudios *in vitro* de la biodiversidad bacteriana se basaron en el aislamiento e identificación de las cepas aisladas, todo ello realizado a través de métodos de microbiología básica, seguido de la amplificación y secuenciación del gen ribosómico ARNr 16S (Lagier et al., 2012). Sin embargo, en este tipo de estudios culturómicos existe un elevado porcentaje de especies bacterianas “no cultivables”, las cuales bien por la inhibición de otros aislados o bien por los requerimientos adicionales y condiciones en su aislamiento no son capaces de crecer. Se calcula que hasta el 99 % de la biodiversidad microbiana permanece indetectable (Sarhan et al., 2019)

Así pues, surgieron los estudios metagenómicos, los cuales hacen referencia a la aplicación de las técnicas genómicas en el estudio de las comunidades microbianas en sus entornos naturales (Chen y Pachter, 2005). La metagenómica surgió tras la observación de que la mayoría de los microorganismos no se pueden cultivar o aislar en

condiciones de laboratorio. Los estudios metagenómicos se basan en que tanto las bacterias cultivables como las no cultivables son formas de vida y, por tanto, disponen de información genética contenida en el ADN, así pues, el estudio y análisis del ADN aporta los datos necesarios para un estudio completo de la biodiversidad bacteriana.

En los últimos años, tanto estudios culturómicos como metagenómicos han ampliado de forma significativa, además, la información disponible en las relaciones e interacciones planta – microorganismo, se han descubierto nuevas especies con potencial interés (Fould et al., 2001) y se ha descrito la función de múltiples genes (Leveau, 2007), lo que demuestra indudablemente, la importancia de los estudios de la biodiversidad bacteriana en la relación e interacción con las plantas.

3. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal.

La promoción del crecimiento vegetal debido a la acción bacteriana es consecuencia de diferentes mecanismos (directos e indirectos, figura 2) como son la fijación biológica de nitrógeno (Fox et al., 2016), el abastecimiento de otros nutrientes o minerales que se encuentran en una forma no disponible para los cultivos (Singh y Kapoor, 1999), la producción de fitohormonas (Passari et al., 2016), o el control biológico de fitopatógenos (Yigit y Dikilitas, 2007). Este último gracias a la producción de agentes antifúngicos o antibacterianos, la producción de sideróforos, la depredación directa, la competencia por los nutrientes y la adquisición sistemática de resistencia o inmunidad (Pérez-Montaña et al., 2014).

3.1 Síntesis de sustancias asimilables por las plantas.

3.1.1 Fijación de nitrógeno.

El nitrógeno es el principal nutriente para el desarrollo vegetal y la productividad de los cultivos. Sin embargo, a pesar de su abundancia en la atmósfera terrestre (78 %) es el nutriente más limitante para las plantas ya que no se encuentra en una forma asimilable (Mur et al., 2017).

Por fortuna, existen unas bacterias, denominadas diazotrófas, las cuales tienen la habilidad para reducir el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio a través de un sistema catalítico enzimático denominado nitrogenasa, muy sensible al oxígeno. El nitrógeno orgánico es convertido en formas asimilables por las plantas y por los mismos microorganismos, pudiendo suplir de esta manera los requerimientos de nitrógeno en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos u otros compuestos orgánicos (Geisseler et al., 2010).

Otra de las formas en que las plantas obtienen y absorben nitrógeno se ha descrito a través de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la cual actúa como principal fuente de nitrógeno para los ecosistemas terrestres. En esta simbiosis las bacterias

deben diferenciarse en bacteroides para crear el ambiente anaerobio requerido. Estos bacteroides obtienen la energía de los compuestos glucídicos que son cedidos por la planta y proceden de la fotosíntesis. En cambio, la planta se beneficia asimilando el nitrógeno fijado por los bacteroides (Herridge et al., 2008).

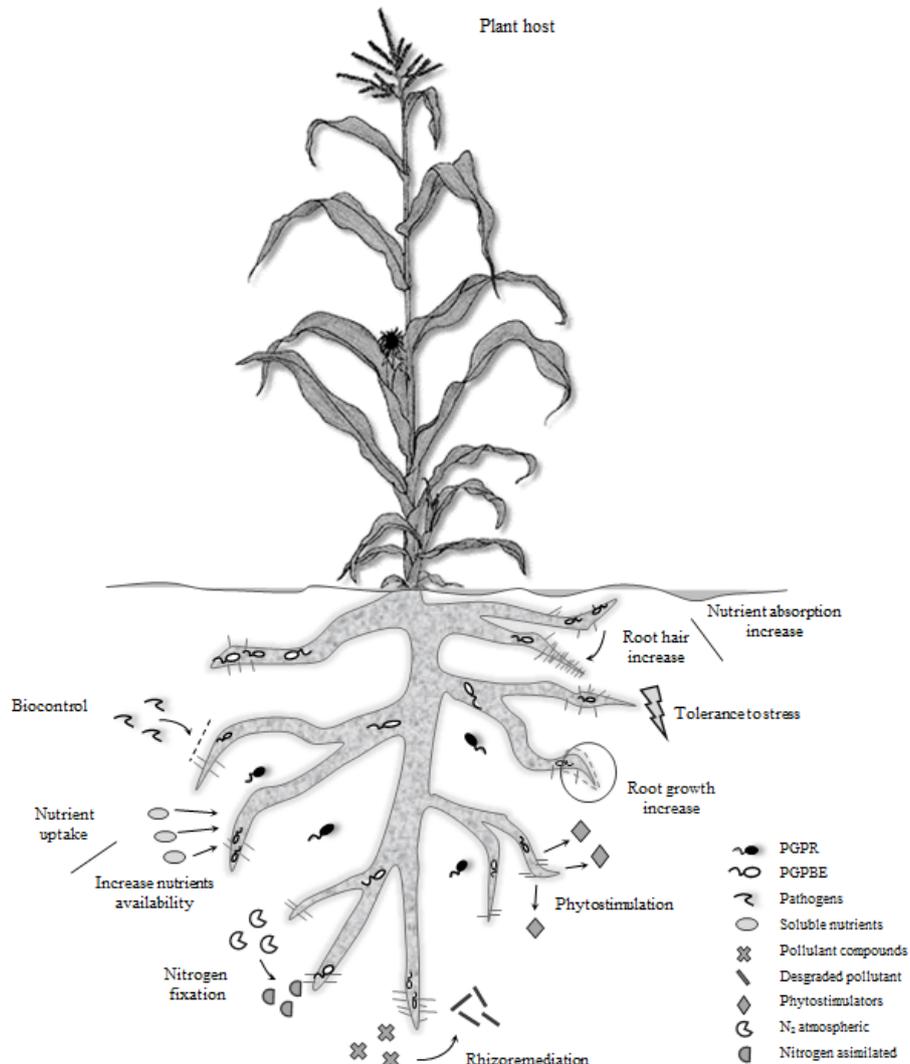


Figura 2: Representación esquemática de algunos mecanismos PGP de microorganismos PGPR y PGPBE. Modificado de Celador-Lera et al., (2018).

Se estima que la cantidad de nitrógeno fijado mediante la fijación biológica es de unas 175 millones de toneladas al año, siendo 35 millones fijados por microorganismos en vida libre, mientras que los 140 millones restantes se deben a la fijación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa (Herridge et al., 2008).

Existen muchas bacterias diazotróficas que habitan en los suelos y son capaces de fijar y convertir el nitrógeno atmosférico sin la necesidad de interactuar de forma directa con otros seres vivos, algunos ejemplos pueden ser especies pertenecientes a los géneros bacterianos *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus* (Mus et al., 2016).

En la bibliografía encontramos que bacterias de los géneros *Burkholderia* spp., *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. además de ser descritas como fijadoras libres de nitrógeno, son promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de maíz tras su inoculación (Puri et al., 2015; Riggs et al., 2001; Shaharoon et al., 2006).

Muchos proyectos científicos describen el efecto beneficioso de la inoculación de bacterias pertenecientes a los géneros *Azoarcus* spp., *Azospirillum* spp. y *Burkholderia* spp. y en concreto a la fijación y el contenido en nitrógeno en cultivos de arroz, uno de los cultivos de mayor interés alimentario y económico. Estas bacterias son capaces de penetrar en las raíces de las plantas de arroz y aumentar significativamente los compuestos nitrogenados en el cultivo (Kao et al., 2003).

3.1.2 Producción de fitohormonas.

Las hormonas vegetales, también llamadas fitohormonas, son moléculas orgánicas involucradas en múltiples procesos del crecimiento y desarrollo vegetal. La producción de fitohormonas por parte de las especies bacterianas interviene beneficiosamente en su interacción con los cultivos (Spaepen, 2015), así pues su estudio y análisis es esencial en las investigaciones de las relaciones planta – bacteria. Existen varios tipos de fitohormonas entre los que se encuentran las auxinas, las giberelinas, las citoquininas y el etileno (Immanen et al., 2016).

Las auxinas actúan como moléculas clave en los procesos de estimulación y desarrollo celular en plantas (Tanimoto, 2005). Dentro de este grupo se encuentra el ácido indolacético (AIA), una de las auxinas más estudiada en la interacción planta-microorganismo. Esta hormona tiene la capacidad de inducir la producción de raíces adventicias, aumentando así el entorno necesario para el desarrollo de las comunidades bacterianas en la rizosfera. Algunos de los géneros en los cuales se han descrito bacterias productoras de AIA son *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* y *Burkholderia* (Flores et al., 2018; Greetatorn et al., 2019; Kalappurakkal et al., 2018; Rivera et al., 2018).

Las giberelinas, en cambio, son fitohormonas asociadas a la germinación de la semilla, la elongación del tallo, la floración y el desarrollo del fruto (Boğa et al., 2009). Algunas giberelinas estimulan el crecimiento vegetal incrementando la elongación celular, otras sin embargo lo aumentan incrementando la división celular (Jupe et al., 1988). La producción de giberelinas por cepas bacterianas y fúngicas en géneros como *Gibberella*, *Aspergillus*, *Rhizobium*, *Fusarium*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* es un proceso muy estudiado (Pandya y Desai, 2014; Bilkay et al., 2010).

Nosheen et al., (2016) demostraron que dos especies de los géneros *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp. producían grandes cantidades de giberelinas y mejoraban la

cantidad y calidad de los cultivos de cártamo (azafrán silvestre) tras su inoculación. Park et al., (2017) demostraron que la cepa de *Bacillus aryabhattai* SRB02 con alta producción de giberelinas GA4, GA7 y GA14 no solo mejoraba la promoción del crecimiento de cultivos de soja, sino que también disminuía significativamente los efectos causados por el estrés oxidativo y nitrosativo.

Las citoquininas, otro de los grupos principales de fitohormonas, juegan un gran papel en el desarrollo y crecimiento vegetal de manera similar a los anteriores. Además, las citoquininas influyen en la dominancia del meristemo apical, la organogénesis y el retraso de la senescencia (Mens et al., 2018). Heckmann et al., (2011) demostraron la interacción y efecto de las citoquininas en la inducción y formación de nódulos y, Sokolova et al., (2011) demostraron como dos cepas de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium*, productoras de altas cantidades de citoquininas, promueven el crecimiento y desarrollo de cultivos de pepino.

Por último, el etileno es una hormona vegetal que regula la maduración de los frutos, la apertura de las flores y la abscisión de las hojas (Reid, 1985), además de intervenir en la germinación de las semillas y la formación de las raíces secundarias (Saleem et al., 2018). Sin embargo, la producción de altos niveles de etileno incide en procesos tan importantes como el alargamiento de las raíces o incluso la fijación de nitrógeno en leguminosas (Ahmad et al., 2013).

Algunos microorganismos producen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa), la cual hidroliza el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), molécula precursora de etileno en plantas (Yang y Hoffman, 1984), obteniendo amoníaco y α -ketobutirato, los cuales pueden ser usados como fuentes de nitrógeno y carbono. Así pues, estas bacterias disminuyen los niveles de etileno en las plantas, previniendo algunos de los efectos negativos producidos por su alta concentración (Glick et al., 2007).

3.1.3 Movilización de nutrientes.

En la literatura encontramos múltiples artículos que describen, analizan y detallan los mecanismos PGP que presentan las bacterias usadas como biofertilizantes, entre los que se encuentran la movilización de nutrientes necesarios para el desarrollo vegetal. Como se ha señalado anteriormente los microorganismos juegan un papel esencial en la descomposición de la materia orgánica y la conversión de nutrientes imprescindibles para las plantas, como lo son el fosfato o el potasio, en formas disponibles (Duarah et al., 2011).

3.1.3.1 Solubilización de fosfato.

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente más utilizado por las plantas (Sharma et al., 2013). Así pues, los fertilizantes químicos contienen formas

solubles de fósforo, las cuales se añaden a los cultivos con la intención de maximizar su productividad. Sin embargo, una gran parte de las formas solubles precipita en el suelo, convirtiéndose en formas poco solubles, que pueden ser consideradas no disponibles para las plantas. Debido a esta problemática, los agricultores añaden fertilizantes en exceso, lo que desemboca en problemas de índole medio ambiental y económico (Vassilev y Vassileva, 2003).

En este sentido, el uso y aplicación de bacterias solubilizadoras de fosfato representa un sustituto alternativo al empleo masivo de fertilizantes químicos. En la bibliografía encontramos múltiples artículos que analizan la promoción del crecimiento en distintas especies vegetales tras la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato (Suleman et al., 2018).

Los principales mecanismos descritos por los cuales los microorganismos solubilizan el fósforo mineral son la producción de ácidos orgánicos, como el acético o glutámico, o las fosfatasas ácidas, como fosfodiesterasas o fosfotriesterasas (Goswami et al., 2016). Cepas pertenecientes a géneros como *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Flabovacterium* han sido descritas por ser eficientes solubilizando diferentes formas de fósforo (Dastager y Damare, 2013).

3.1.3.2 Solubilización de potasio.

El potasio es el tercer macronutriente esencial más importante para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Debido a que más del 90 % del potasio se encuentra en roca insoluble o minerales de silicato, la concentración de potasio soluble en el suelo es muy baja (Gouda et al., 2018).

La deficiencia de potasio se ha convertido en una limitación destacable en el desarrollo de los cultivos. Sin las cantidades adecuadas de este elemento, las plantas presentan raíces poco desarrolladas, la tasa de crecimiento es lenta y en general se obtiene un rendimiento menor. Así pues, es prioritario encontrar una vía alternativa de disponibilidad de potasio que asegure una absorción adecuada por parte de los cultivos (Lue et al., 2016).

El uso de bacterias solubilizadoras de potasio se ha convertido en una estrategia medioambiental para suplir la falta de este elemento en las plantas. Este tipo de bacterias utilizadas son capaces de solubilizar el potasio contenido en silicatos como mica, illita y ortoclasa (Lee et al., 2005), todo ello a través de la producción y excreción de ácidos orgánicos (Ullman et al., 1996).

En la bibliografía múltiples especies del género *Bacillus* y *Paenibacillus*, solubilizadoras de potasio, han sido descritas por aumentar el crecimiento y desarrollo de los cultivos y, además, en algunos casos se ha observado un aumento significativo en el contenido global de potasio en los cultivos (Han et al., 2006; Sangeeth et al., 2012).

3.1.3.3 Producción de sideróforos.

Además de ser un cofactor en múltiples rutas biosintéticas e intervenir en la fotosíntesis, el hierro es un elemento crucial para el desarrollo de la planta (Zuo y Zhang, 2011). Las plantas usan dos estrategias para obtener las formas específicas de hierro; La primera es la acidificación de suelo, con la reducción de Fe^{3+} , y la sucesiva absorción por parte de las células radiculares de las formas de Fe^{2+} , la segunda estrategia es la secreción de sideróforos con el objetivo de solubilizar y adsorber el hierro disponible, el cual es transportado a las células radiculares a través de las proteínas de membrana (Radzki et al., 2013). Sin embargo, muchas veces estas dos estrategias no son suficientes para satisfacer la deficiencia de hierro en los cultivos.

En este sentido, se recurre a la inoculación y aplicación de microorganismos con capacidad para producir y secretar sideróforos. Estos sideróforos forman un complejo con el hierro férrico insoluble que se une a la superficie de la célula bacteriana (Gouda et al., 2018). Este complejo se transporta dentro de la célula, donde el hierro se convierte en la forma ferrosa soluble (Fe^{2+}). Hoy en día se conocen más de 500 tipos de sideróforos excretados por los microorganismos bajo condiciones limitantes de hierro. Dependiendo de los ligandos del oxígeno, los sideróforos pueden clasificarse en tres tipos (Rütschlin et al., 2018).

Tipo hidroxamato: estos sideróforos son los que se encuentran en la naturaleza con más facilidad. Forman un complejo octaédrico hexadentado con el hierro Fe^{3+} , estableciendo una unión fuerte entre ambas partes del complejo que protege los complejos contra la hidrólisis y la degradación enzimática (Winkelmann, 2007). Son producidos por bacterias como las pertenecientes al género *Pseudomonas* (Kannahi et al., 2014) y hongos del género *Trichoderma* (Vinale et al., 2014) y *Fusarium* (Haselwandter et al., 2013).

Tipo catecolato: son producidos exclusivamente por bacterias, en su gran mayoría por bacterias endofíticas (Gobelak y Hiller, 2017). En la bibliografía están descritas especies de géneros tan diversos como *Rhizobium* (Joshi et al., 2009), *Streptomyces* (Fiedler et al., 2001), *Magnetospirillum* (Calugay et al., 2006) y *Azotobacter* (Yoneyama et al., 2011) entre otros. Según Leong y Neilands (1982), algunas especies del género *Pseudomonas* son capaces de producir un sideróforo mixto tipo catecolato e hidroxamato.

Tipo carboxilato: este último tipo de sideróforos es producido principalmente por hongos, en concreto perteneciente a la familia de los Zigomicetos y bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Staphylococcus* (Pérez-Miranda et al., 2007). La rizobactina, producida por *Rhizobium meliloti* DM4, es el sideróforo de tipo carboxilato mejor caracterizado (Persmark et al., 1993).

4. Enzimas involucradas en la interacción planta-microorganismo.

4.1 Enzimas que degradan la pared celular vegetal.

Para las plantas, la pared celular vegetal es la estructura que determina la forma celular, es una cubierta externa que envuelve las células vegetales aportándoles soporte y protección (Cosgrove et al., 2000). Es una estructura altamente organizada (figura 3), la cual está formada principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y en menor medida pectina (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). La composición y porcentajes varían entre las distintas especies vegetales, incluso en una misma planta, de acuerdo con la edad, el tejido y grado de desarrollo (Zhang et al., 2000).

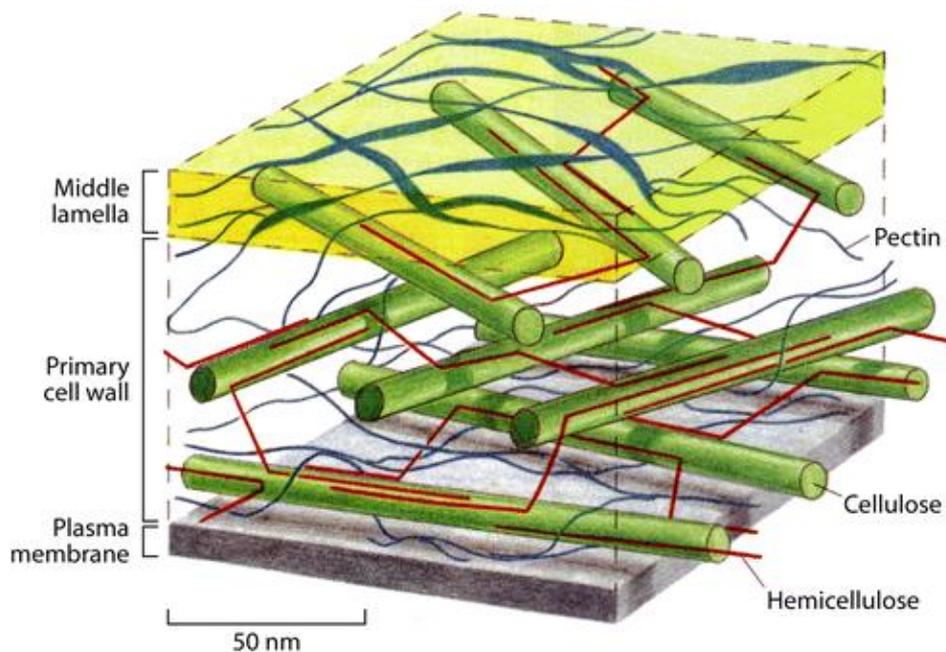


Figura 3: Composición de la pared celular vegetal, formada por los polisacáridos de hemicelulosa, celulosa y pectina. Modificado de McCann y Roberts (1994).

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, constituye el principal componente de la pared celular. Está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa) (Levy et al., 2002). La configuración de este tipo de enlace facilita que la celulosa forme cadenas largas y lineales unidas entre sí mediante puentes de hidrógenos y fuerzas de Van der Waals formando una estructura cristalina organizada y resistente a la hidrólisis. Sin embargo entre el 5 % y 20 % de la celulosa es no cristalina o amorfa, no está organizada y facilita la degradación enzimática (Béguin y Aubert, 1994).

La hemicelulosa constituye entre el 25 % y 30 % del peso seco total de madera. Es un polímero complejo de heteropolisacáridos, formado principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa). La hemicelulosa se puede clasificar en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomanos y glucanos unidos

por enlaces β -1,3 y β -1,4. El xilano, formado por la unión β -1,4 de unidades de D-xilosa, es el componente más abundante de la hemicelulosa, constituye más del 70 % de su composición.

La lignina es el tercer polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa y la hemicelulosa. Es altamente resistente a la hidrólisis y degradación química y biológica. En la pared celular aporta soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque bacteriano o fúngico (Kumar et al., 2008).

La lignina y la hemicelulosa crean una matriz amorfa donde las fibras de celulosa están embebidas y protegidas frente a un amplio abanico de degradación (Sánchez, 2009).

En el estudio de las interacciones planta-microorganismo es esencial el análisis de la producción de enzimas de carácter bacteriano o fúngico que son capaces de degradar o alterar la composición de la pared celular vegetal. En primer lugar, la hidrólisis y degradación bacteriana o fúngica de los componentes celulares aporta a los microorganismos una fuente de carbono excepcional, la cual permite su desarrollo y proliferación (Wilson, 2011). En segundo lugar, es un mecanismo de entrada al interior muy eficaz (Yang et al., 2017). Por una parte, para aquellos organismos beneficiosos, cuya interacción con el hospedador en el interior es más íntima, se evita la competencia microbiana del exterior, se accede continuamente a los nutrientes, y existe una protección frente a diferentes estreses (Hallmann et al., 1997). Por otra parte, también supone destacables ventajas para los microorganismos patógenos, los cuales están en contacto directo con su hospedador y para los cuales la entrada al interior es clave en el proceso infectivo y colonizador (Bulgarelli et al., 2013). Así pues, el análisis de la producción de este tipo de enzimas es fundamental en la interacción planta - microorganismo.

4.1.1 Celulasas.

Las celulasas son O-glucósido hidrolasas (GH) que hidrolizan el enlace β -1,4 de la celulosa. Especies fúngicas como *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *Fusarium solani*, o *Aspergillus niger* se han descrito por su propiedad celulolítica. En cuanto a las bacterias con actividad celulolítica más comunes encontramos los géneros *Cellulomonas spp.*, *Clostridium spp.*, *Streptomyces spp.*, *Bacillus spp.* y *Thermonospora spp.* (Menéndez et al., 2015). De las 122 familias de O-glucósido hidrolasas, 14 corresponden a celulasas, las cuales se clasifican de acuerdo con su actividad enzimática en tres grupos: exoglucanasas (CBH, EC 3.2.1.74; 1,4- β -D-glucano-glucohidrolasa y EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasa), endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa) y β -glucosidasas (BGL, EC 3.2.1.21) (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).

4.1.2 Xilanasas.

Las xilanasas son las principales enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa. En este grupo se encuentran las endoxilanasas (EC 3.2.1.8; endo-1,4- β -D-xilanasas), las cuales actúan sobre la cadena principal del polisacárido rompiendo los enlaces entre las unidades del xilano liberando oligosacáridos.

Las xilanasas, igual que las enzimas celulolíticas, poseen una estructura que contiene dominios catalíticos de unión. Los dominios catalíticos determinan la especificidad de sustrato y favorecen la unión de la enzima con el sustrato (Pérez et al., 2002).

Este tipo de enzimas se ha descrito en diversas especies fúngicas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Agaricus* y *Magnaporthe* (Polizeli et al., 2005). En cuanto a las bacterias, a pesar de poseer unos menores niveles de actividad en este tipo de enzimas se han descrito genes responsables de su biosíntesis en bacterias pertenecientes a géneros como *Aeromonas*, *Bacillus* o *Pseudomonas* (Charlton et al., 2018; Nuyens et al., 2001; Rasika, 2017).

4.1.3 Pectinasas.

Las pectinasas son un tipo de enzimas con gran interés y uso creciente en la industria, sobre todo en el sector alimentario (Amin et al., 2019). Generalmente las pectinasas representan la unión de varias enzimas que incluyen pectina liasas, poligalacturonasas y pectinesterasas (Rebello et al., 2017).

La hidrólisis de la pectina se realiza gracias a la acción de varias enzimas pectinolíticas, las cuales son clasificadas en base al mecanismo de acción. Las pectinesterasas (PE, EC 3.1.1.11) catalizan el grupo metoxilo de la pectina, formando ácido pectídico, sin embargo, las poligalacturonasas (PG, EC. 3.2.1.15) y polimetilgalacturonasas (PMG) causan la hidrólisis de la pectina.

En la bibliografía se ha descrito la producción de este tipo de enzimas por parte de hongos de los géneros *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Trichoderma*, *Pichia* y *Candida* (Jayani et al., 2005) y bacterias de los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Cryptococcus* y *Pseudomonas* (Alimardani-Theuil et al., 2011).

4.2 Poliaminas

Las poliaminas, son aminas alifáticas de naturaleza policatiónica y bajo peso molecular, compuestas por al menos dos grupos amino (Majumdar et al., 2019). En la composición de las poliaminas se encuentran átomos de nitrógeno cargados positivamente, lo que les permite una interacción con macromoléculas como los fosfolípidos, el ADN, el ARN, proteínas o componentes de la pared celular (Garg y Sharma, 2019).

Las poliaminas se biosintetizan en todo tipo de células, así pues, dentro del estudio de las interacciones planta – microorganismo, las producciones por parte de las bacterias, aunque sean menores, no deben menospreciarse. Las poliaminas más abundantes en las plantas son la putrescina, la espermidina y la espermina (Michael, 2016) mientras que en las bacterias son la putrescina y la espermidina (Wortham et al., 2007).

Las investigaciones de las funciones de las poliaminas en las bacterias han mostrado sus efectos en el crecimiento celular, la biosíntesis de sideróforos o la formación de biofilms, ambos, parámetros ampliamente estudiados en los trabajos de investigación relacionados con bacterias PGPR (Wortham et al., 2007).

En estudios realizados en los últimos años se ha comprobado como la adición exógena de poliaminas desencadena en incrementos tanto en el peso como en la longitud de la parte aérea de cultivos de interés económico y agroalimentario como *Medicago truncatula* (López-Gómez et al., 2017), arroz (Farooq et al., 2009) o datilera común (Naser et al., 2016).

Además, en las interacciones planta-microorganismo, las poliaminas han sido descritas también por su importancia en el desarrollo y la respuesta a estreses (Pottosin y Shabala, 2014). En este sentido, las poliaminas pueden actuar como fuente y vía de reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o como activadores de la síntesis de enzimas antioxidantes (Kusano et al., 2008).

Se ha comprobado que la adición de poliaminas de forma exógena mejora los efectos causados por estrés salino o hídrico, debido a una mejora en los índices K^+/Na^+ , un incremento de la actividad antioxidante o un incremento en la acumulación de osmolitos (Sharma et al., 2013).

5. Bacterias PGPB utilizadas como biofertilizantes en cultivos de interés agroalimentario e industrial.

En los últimos años se ha descrito el efecto beneficioso del uso de biofertilizantes en el desarrollo vegetal y la calidad de los cultivos, entre los que además se encuentra la reducción de los efectos negativos de las fitoenfermedades. El rol y uso tan importante de las bacterias PGPB en la agricultura es fácilmente observable debido a la amplitud de estudios publicados hasta la fecha (tabla 1).

La problemática actual de los fertilizantes químicos mencionada anteriormente desemboca en un interés generalizado por métodos alternativos o suplementarios, los cuales son menos contaminantes y ayudan a la consecución de una agricultura más sostenible (Ladha et al., 1997). En este sentido, el uso e inoculación de bacterias PGPB es una eficaz y prometedora solución alternativa a los fertilizantes ricos en nitrógeno,

fósforo y potasio, tanto para cultivos hortícolas de interés agroalimentario como bioenergéticos (Çakmakçı et al., 2017).

Tabla 1: Ejemplos de bacterias PGPB inoculadas en cultivos hortícolas de interés agroalimentario o bioenergético. Modificado de Jiménez-Gómez et al., (2017).

Especie bacteriana	Cultivo	Efecto producido	Referencia
<i>Rhizobium laguerreae</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Aumento en el rendimiento y calidad del cultivo	Jiménez-Gómez et al., 2018
<i>Pseudomonas</i> sp. 19FV1T	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento del contenido en vitamina C	Bona et al., 2017
<i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento del contenido en vitamina C	Shen et al., 2016
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB2 y FZB42	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento del contenido en vitamina C	Gül et al., 2008
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Mejora en el contenido total de flavonoides	Ochoa-Velasco et al., 2016
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Brassica oleracea</i>	Incremento en el contenido de clorofila	Turan et al., 2014
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Eruca sativa</i>	Aumento del crecimiento de la parte aérea	Kamran et al., 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Nasturtium officinale</i>	Aumento de la capacidad antioxidante	Pignata et al., 2015
<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Variovorax</i> spp.	<i>Brassica napus</i>	Incremento de clorofila en las hojas	Dąbrowska et al., 2017
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Brassica napus</i>	Aumento del desarrollo vegetal	Lally et al., 2017
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Brassica juncea</i>	Aumento del contenido en fósforo	Rajkumar et al., 2013
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Aumento de desarrollo radicular	Sabry et al., 1997
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Zea mays</i>	Promoción del crecimiento vegetal bajo altas concentraciones de metales pesados	Islam et al., 2016
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SAY09	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mejora del contenido nutricional	Zhou et al., 2017
<i>Pseudomonas putida</i> 41, <i>Azotobacter chroococcum</i> 5, <i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Incremento de la actividad antioxidante	Khavazi et al., 2010
<i>Burkholderia tropica</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumento del número y peso de los frutos	Bernabeu et al., 2015

<i>Pseudomonas putida</i> P13 y <i>Pantoea agglomerans</i> P5	<i>Cucumis sativus</i>	Aumenta el rendimiento	Isfahani et al., 2013
<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus lentus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	Incremento de la actividad antioxidante y mejora del contenido de clorofila en las hojas	Heidari y Golpayegani, 2012
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PETP01	<i>Capsicum annuum</i>	Incremento de la actividad antioxidante	Silva et al., 2014
<i>Paenibacillus polymyxa</i> RC14	<i>Brassica oleracea</i>	Incremento del contenido nutricional	Yildirim et al., 2016
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PEPV16	<i>Daucus carota</i>	Aumento el peso seco radicular y el contenido nutricional	Flores-Félix et al., 2013
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PEPV16	<i>Lactuca sativa</i>	Aumento el peso seco de la parte aérea y el contenido nutricional	Flores-Félix et al., 2013
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Eruca sativa</i>	Mejora del contenido nutricional	Kamran et al., 2016
<i>Rhizobium leguminosarum</i> E15 y <i>Rhizobium radiobacter</i> L5	<i>Eruca sativa</i>	Aumento de la longitud y peso seco de la parte aérea	de Souza et al., 2016
<i>Streptomyces rochei</i> CMJ571 y <i>S. anulatus</i> CX14W	<i>Valerianella locusta</i>	Mejora en la tasa de germinación	Kunova et al., 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Nasturtium officinale</i>	Aumento de la capacidad oxidante	Pignata et al., 2015
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Zea mays</i>	Aumento de la biomasa total del cultivo	Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001
<i>Azotobacter chroococcum</i> y <i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Mentha pulegium</i>	Mejora del desarrollo vegetal bajo condiciones de sequía. Aumento de la biosíntesis de metabolitos secundarios	Asghari et al., 2020

Así pues, con el fin de incrementar el rendimiento y la calidad de los cultivos, en la presente Tesis doctoral se eligieron y seleccionaron bacterias de diferentes géneros para evaluar su efecto e interacción en distintos tipos de cultivos hortícolas de gran demanda actual.

5.1 Género *Rhizobium*.

Desde que en 1889 se describiese *Bacillus radicicola* y, posteriormente se renombrase como *Rhizobium leguminosarum*, a la primera bacteria aislada de nódulos de leguminosa, son múltiples los estudios ecológicos, genotípicos y taxonómicos

realizados en este género, el cual, a día de hoy cuenta con más de 110 especies (Kang et al., 2019).

Los aislados del género *Rhizobium* proceden principalmente de nódulos y raíces de leguminosas, sin embargo, también se han aislado de muestras tan diversas como aguas contaminadas, arena de playa, lagos salinos o suelos petrolíferos (Kaur et al., 2011).

Este género es ampliamente conocido debido a la fijación biológica de nitrógeno que ocurre en la simbiosis con plantas leguminosas. Pero además, desde las últimas décadas también se ha estudiado su papel como promotor del crecimiento vegetal en plantas no-leguminosas (Naher et al., 2003; Dardanelli et al., 2008; Flores-Félix et al., 2013; Flores-Félix et al., 2018). En estos estudios se resaltan incrementos destacables tanto de la parte aérea como de la parte radicular, desembocando en aumentos en los rendimientos de los cultivos de forma significativa. Además en los últimos años, diversos estudios muestran una mejora en el contenido nutricional de macro y micronutrientes, así como de ácidos fenólicos y otros compuestos bioactivos en diversas plantas inoculadas con distintas cepas del género *Rhizobium* (Flores-Félix et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2018).

5.2 Género *Pseudomonas*.

Pseudomonas es un género perteneciente al filo Proteobacteria caracterizado por su ubicuidad en el medio ambiente y su importancia en múltiples procesos ambientales. Es un género bacteriano compuesto actualmente por más de 200 especies (Oueslati et al., 2019).

Las especies pertenecientes a este género han sido aisladas en una alta variedad de lugares, se han aislado cepas de *Pseudomonas* de muestras de suelo, tejidos humanos, lagos salados, plantas o animales, entre otros lugares. Así pues, las especies de este género presentan una multitud de estilos diferentes de vida (Peix et al., 2018).

Las especies de *Pseudomonas* se conocen por sus capacidades para utilizar un rango amplio de compuestos orgánicos como fuentes de energía (Lessie y Phibbs, 1984), resistir a una amplia variedad de compuestos antimicrobianos importantes para la salud humana (Breidenstein et al., 2011) y producir una amplia gama de metabolitos secundarios (Loper et al., 2014).

Dentro de este género se han descrito algunas cepas como las causantes de enfermedades en plantas, peces, insectos y otros animales (Tian et al., 2018). Debido a su rol en biorremediación, control biológico, promoción del desarrollo vegetal y muchos otros procesos medioambientales, sus capacidades metabólicas y las funciones ecológicas han sido estudiadas con interés (Al-Waily y Hassan, 2019; Prieto et al., 2011; Rabhi et al., 2018). De hecho, entre los miembros de este género se encuentran

organismos modelo para multitud de estudios de microbiología ambiental e interacciones planta-microorganismo, ya sea beneficioso o patógeno (Kasak et al., 1997), como *Pseudomonas fluorescens* (Govind, 2011).

5.3 Género *Bacillus*.

Bacillus es un género perteneciente al filo Firmicutes, este género está compuesto hoy en día por más de 350 especies, las cuales han sido aisladas de nichos tan dispares como tejidos humanos, plantas, suelos árticos, lagos, sedimentos marinos, desiertos o animales (Reddy-Sultanpuram et al., 2017).

En la bibliografía encontramos que las especies del género *Bacillus* presentan un amplio rango de funcionalidades e interacciones con las especies vegetales. Entre ellas, se encuentra la promoción del crecimiento vegetal de cultivos como tomate o pimiento (García et al., 2004; Mena-Violante et al., 2007), y su correspondiente mejora en la calidad nutricional, o su habilidad para la producción de sideróforos y por tanto una mejora en la disponibilidad de hierro (Yu et al., 2011). Además, se ha descrito la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en formas asimilables para su hospedador (Cherif-Silini et al., 2016).

Otras de las características más estudiadas en cepas pertenecientes al género *Bacillus* dentro de la interacción planta-microorganismo son sus efectos como agente de biocontrol o su potencial antifitopatogénico (Borriss, 2017; Zouari et al., 2016). Además, se ha descrito como cepas de este género pueden inducir la respuesta sistémica de las plantas en contacto con fitopatógenos y, por tanto, reducir los efectos negativos causados en los cultivos (Rahman, 2017).

6. Cultivos de interés agroalimentario y/o bioenergético.

6.1 *Spinacia oleracea* L.

Spinacia oleracea L. (figura 4) o espinaca es una planta anual de la familia Amaranthaceae. La planta, originaria del sudeste asiático, está formada por un tallo ramificado, con longitud de hasta 15 centímetros, del que surgen un conjunto de hojas dispuestas en forma circular o roseta, con una longitud máxima de 20 centímetros aproximadamente.

La espinaca es de gran interés culinario y es cultivada como verdura por sus grandes hojas comestibles de color verde oscuro, siendo estas la única parte de la planta que se consume (Jiménez-Gómez et al., 2018).

En cuanto a las propiedades nutritivas, la espinaca es una hortaliza gran cantidad de compuestos fenólicos, siendo un vegetal muy rico y variado en componentes antioxidantes (Zapata et al., 2014).



Hasta la fecha son escasas las publicaciones existentes que analizan el efecto en el desarrollo vegetal y el contenido nutricional de las hojas de espinaca tras la inoculación bacteriana. Nautiyal et al., (2008) evaluaron el efecto de la cepa *Bacillus lentimorbus* NRRL B-30488, y Jiménez-Gómez et al., (2016) y Jiménez-Gómez et al., (2018) evaluaron el efecto tras el empleo de las cepas *Rhizobium sp.* PEPV12 y *R. laguerreae* PEPV40. Estas dos últimas fruto del presente periodo doctoral.

Figura 4: *Spinacia oleracea* L.

6.2 Cichorium endivia L.

Cichorium endivia L. (figura 5), también conocida como escarola o endivia es una planta herbácea perenne de la familia Asteraceae. Procedente de Europa y del norte de África se emplea de forma global como alimento en distintas formas. La abundante presencia de compuestos antioxidantes, minerales y vitaminas en este alimento lo han convertido en un cultivo muy atractivo para su consumo (Serna et al., 2013).

Las exportaciones en España han aumentado más de un 650 % en los últimos 100 años y el valor del mercado ha aumentado más del 90 % (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2017).



El contenido nutricional de la planta muestra una amplia variedad de compuestos fenólicos, que incluyen flavonoides y derivados de ácido hidroxiciámico, lo cual le aporta una elevada acción antioxidante (Mascherpa et al., 2012). Se ha estudiado el potencial terapéutico para combatir enfermedades orales, inflamatorias y gastrointestinales (Ferrazzano et al., 2011). Además, se ha observado y descrito un efecto protector en el hígado contra el estrés oxidativo en modelos *in vivo* e *in vitro* (Chen et al., 2011).

Figura 5: *Cichorium endivia* L.

Aunque se ha estudiado la mejora del contenido nutricional tras la aplicación de distintos tipos de brasinoesteroides (Serna et al., 2013), hasta la fecha no hay trabajos publicados en los que se haya analizado el desarrollo vegetal y/o contenido nutricional tras la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal como bioinoculantes.

6.3 Coriandrum sativum L.

El cilantro, nombre común de *Coriandrum sativum* L. (figura 6), de origen mediterráneo, es una planta herbácea anual de la familia Apiaceae. Sus hojas y semillas son muy apreciadas alimentariamente debido a sus propiedades medicinales. El porte vegetal puede alcanzar una altura de hasta 130 cm. Los primeros signos de su uso se documentan hace más de 7000 años. Actualmente es de gran relevancia en la gastronomía tradicional de Latinoamérica, China e India, siendo este último el principal país productor.

A pesar de que el cilantro es un cultivo capaz de tolerar una considerable variedad de suelos, no es posible cultivar esta planta y obtener rendimientos aceptables en condiciones de elevada salinidad (Vanies da Silva Sá et al., 2016).

Las semillas de cilantro son muy ricas en nutrientes, contienen hasta un 2 % de aceites esenciales, en su mayoría linalool. Además, en la parte aérea los aldehídos alifáticos dominan el perfil químico del aceite esencial, dando lugar a unas características organolépticas destacables (Msaada et al., 2017).

Además del interesante uso culinario, el balance de ácidos grasos presentes en el aceite de sus semillas hace que esta especie vegetal sea también idónea para la fabricación de biodiesel, cobrando así, especial interés en el diseño industrial.

A pesar de haberse estudiado el uso de compuestos de interés procedentes del cilantro en la industria farmacéutica, alimentaria e industrial, hasta la fecha existen pocos casos en lo que se ha analizado el efecto de bacterias PGPR en el desarrollo y la promoción vegetal.



Figura 6: *Coriandrum sativum* L.

6.4 Brassica napus L.

La colza (figura 7) es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia Brassicaceae. Es una especie vegetal cuyos principales productores son la Unión Europea, Canadá, Estados Unidos, China e India. Sólo en nuestro país la producción total ha aumentado un 295 % desde el año 2010, llegando a superar las 6700 hectáreas dedicadas a este cultivo y siendo la especie oleaginosa a la que se dedica mayor superficie de cultivo (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2018).



Debido a las características organolépticas del procesado y su contenido nutricional, su producción se destina como forraje para el ganado, aceite vegetal para el consumo humano y biodiesel (Xiao et al., 2019).

El alto contenido en carotenoides que contienen sus semillas, sobre todo de luteína y β -carotenos, hace que se incremente el interés y las producciones destinadas a la industria alimentaria y de cosméticos (Hannoufa et al., 2014).

Figura 7: *Brassica napus* L.

7. Análisis, estudio y edición de genomas bacterianos. Repercusión en las interacciones mutualistas planta-microorganismo.

Desde que hace más de dos décadas se publicase la primera secuenciación de del genoma bacteriano de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995), la metodología y los avances en secuenciación y análisis de ácidos nucleicos han cambiado drásticamente. Hoy en día, tenemos a nuestro alcance en bases de datos públicas multitud de secuencias de ADN, ARN, proteínas o incluso otro tipo de información biológica importante (Kaloudas et al., 2019). Estos avances en bioinformática nos han permitido comprender mejor cómo evolucionan las bacterias, la interacción entre ellas y con su entorno. Hoy en día, la secuenciación de genomas bacterianos amplía de forma significativa la información disponible y abre la puerta a multitud de aplicaciones científicas de la microbiología (Land et al., 2015).

Hace más de dos décadas los avances y progresos científicos comenzaron con el *Whole genome shotgun sequencing* (figura 8), la llamada “Primera Generación”, con proyectos enfocados y dirigidos a organismos modelo como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Burland et al., 1993; Glaser et al., 1993), o incluso el proyecto de la secuenciación del genoma humano (Craig-Venter et al., 2001). Esta primera generación consiste en la utilización de didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia, que a través de una electroforesis capilar producen un cromatograma a partir del cual se obtiene la secuencia. Esta tecnología permite secuenciar hasta 96 muestras en unas pocas horas, y la longitud de las secuencias varía entre 500 y 1000 bases.

Sin embargo, pronto llegó la “Generación del alto rendimiento” o “*next-gen*”, trayendo entre sus beneficios la reducción del coste por secuencia o la reducción significativa del promedio de tiempo por cada secuenciación (Metzker, 2009). Los

secuenciadores de esta segunda generación son capaces de generar cientos de miles de reacciones de secuencias en paralelo gracias a la inmovilización de las reacciones en una superficie sólida. La primera secuenciación masiva en paralelo está basada en la *pirosecuenciación* del ADN. Se trata de una técnica no fluorescente que mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido. Finalmente se produce una imagen que se analiza para proporcionar un flujograma que, tras interpretarse en el ordenador se obtiene la secuencia de nucleótidos.

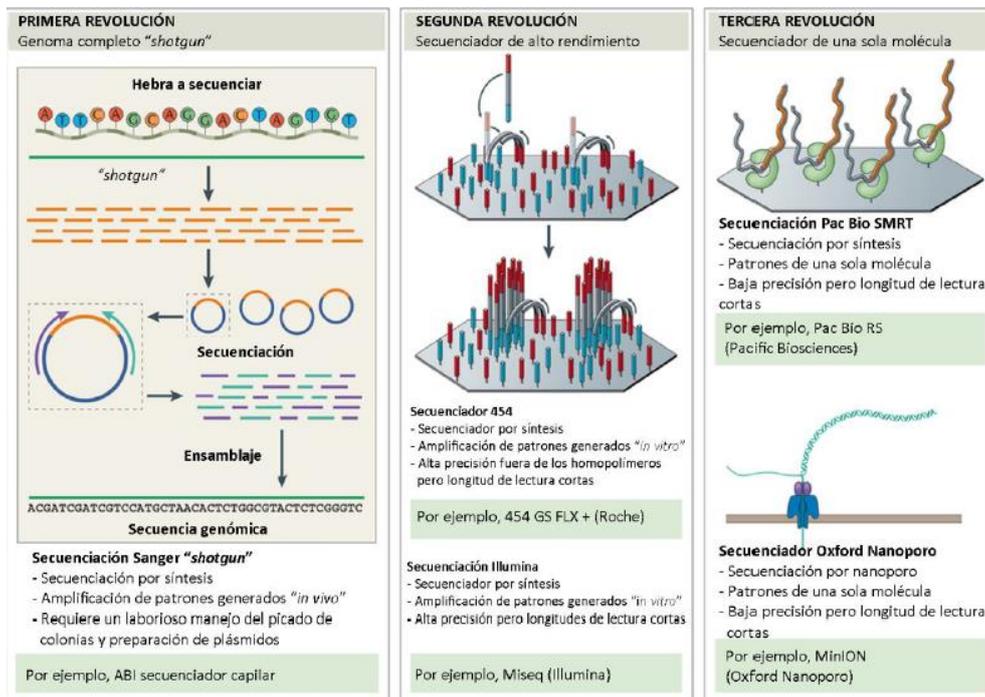


Figura 8: Esquema de las tres generaciones de secuenciación de genomas bacterianos. Modificado de Loman y Pallen (2015).

Por último, se ha desarrollado la "Tercera generación" o "*Single molecule real time sequencing*". Esta generación se basa en la secuenciación a tiempo real de miles de millones de pequeñas moléculas únicas de ADN adheridas a una superficie sólida. Esta tecnología permite generar de forma fiable fragmentos de hasta 1000 nucleótidos. Se trata de un enfoque diferente, ya que lo que se tiene anclado a una superficie sólida es la ADN polimerasa.

Cabe destacar que gracias a los métodos de secuenciación masiva desarrollados en los últimos años se puede llevar a cabo un análisis de la biodiversidad bacteriana de diferentes muestras. Este proceso se realiza a través de la pirosecuenciación por *barcoding* (amplicones provenientes de un solo gen). Se ha demostrado ampliamente la efectividad de identificar las especies bacterianas y, por tanto, analizar su biodiversidad, a través de la comparación de pequeños fragmentos de la región hipervariable del gen

ARNr 16S con las bases de datos de este gen usado en taxonomía bacteriana (Huse et al., 2008).

Además, en el campo de la interacción planta-microorganismo la utilización de técnicas de secuenciación masiva nos permite analizar una gran cantidad de información genética, la cual puede ser usada para la realización de estudios *in silico* de los procesos empleados por las bacterias para la consecución de una promoción del crecimiento vegetal (Belbahri et al., 2017).

7.1 Análisis de genomas bacterianos.

Las técnicas de secuenciación de genomas bacterianos permiten conocer el potencial de nuestros aislados sin la necesidad de realizar ensayos *in vitro*, de esta forma se puede realizar un análisis de los genomas mediante la búsqueda directa de genes, ya sea a través de la utilización de programas específicos para ello o la realización de una búsqueda dirigida de los genes de interés (Carro et al., 2018).

Diversos autores han secuenciado y analizado multitud de genomas de bacterias PGPB con interés en la interacción planta-microorganismo con el fin de poder identificar los genes implicados en las potenciales actividades promotoras del crecimiento vegetal o la disminución de los efectos de bacterias u hongos fitopatógenos en los cultivos.

Desde que se aisló hace varias décadas en Texas (EEUU) la cepa *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, han sido muchos los artículos que describen sus efectos positivos en la inhibición de hongos y bacterias fitopatógenas como *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Erwinia carotovora* (Xu y Gross, 1986; Howell y Stipanovic, 1979; Howell y Stipanovic, 1980). También, se ha descrito su capacidad para producir sideróforos como la pioverdina (Paterson et al., 2017). Sin embargo, desde que en 2005 se secuenciase su genoma, el primero de una cepa PGPR de *Pseudomonas* (Paulsen et al., 2005), los avances han sido significativos, llegando a describir 8 clústeres nuevos codificantes para proteínas o pequeñas moléculas, aparte de los 6 que ya se conocían, con roles potenciales en ecología y propiedades promotoras del desarrollo vegetal.

Caso similar ha ocurrido con la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T. Antes de que estuviera disponible la secuenciación de su genoma con la publicación de Chen et al., (2007) ya se había descrito la producción de fitasa (Makarewicz et al., 2006), una enzima encargada de que el fósforo esté disponible para la planta mediante la degradación de fitato extracelular (hexafosfato de inositol). Además, usando la combinación de métodos químicos y genéticos, Idris et al., (2007) demostraron la alta capacidad de FZB42^T para producir ácido indolacético. Sin embargo, una vez que se secuenció el genoma, un análisis en profundidad reveló los genes encargados de producir acetoina (compuesto volátil promotor del crecimiento) y se determinaron los clústeres de los genes *bac* y *dbh*, responsables de la biosíntesis del

péptido antibacteriano bacisilina y del sideróforo bacilliactina (Özcengiz y Ögölür, 2015). A día de hoy, la cepa FZB42^T se comercializa a través del producto Rhizovital 42[®], gracias a la complementación del análisis genómico y los estudios realizados previamente, que demostraban sus propiedades antifúngicas, antibacterianas y nematocidas (Paterson et al., 2017).

En el caso del género *Rhizobium spp.*, los análisis genómicos se han centrado de forma mayoritaria en la fijación biológica del nitrógeno (Ormeño-Orrillo et al., 2012) o estudios taxonómicos que pudiesen clarificar y modificar la taxonomía actual del género (Lopez-Guerrero et al., 2012). Otros estudios como el de Del Cerro et al., (2017) han usado el análisis genómico para reportar la relación de las proteínas NodD1 y NodD2 con la activación de genes simbióticos bajo estrés abiótico.

Además, en la bibliografía encontramos diversos estudios que muestran como gracias al análisis de genomas bacterianos se han descubierto que bacterias PGPR poseen en su información genética genes codificantes para proteínas implicadas en procesos como la tolerancia a estrés hídrico (Zhang et al., 2017), estrés salino (See-Too et al., 2016) o altas concentraciones de metales pesados (Liu et al., 2016).

7.2 CRISPR-Cas9.

En el transcurso de los años 90 fueron múltiples los estudios que detectaron la existencia de conjuntos de secuencias repetidas e interespaciadas en el material genómico de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* o arqueas como *Haloferax volcanii* y *Haloferax mediterranei*. En esta última, se encontraron repeticiones en tándem de unas 30 pares de bases interespaciadas por secuencias no repetidas de 35 a 39 pares de bases en diferentes regiones de su ADN cromosómico y su megaplásmido más grande (Makarova et al., 2011; Mojica et al., 1995).

Gracias al indiscutible desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación se pudo detectar la ubicuidad de las secuencias interespaciadas repetidas en tándem o LTRR (*Long Tandemly Repeated Repetitive*) tanto en bacterias como arqueas (Mojica et al., 2000). En este último trabajo se definió una nueva familia de repeticiones de ADN, referida como repeticiones cortas regularmente interespaciadas o *Short Regularly Spaced Repeats* (SRSR), encontrándose en más del 40 % de las bacterias y alrededor de un 90 % de las arqueas secuenciadas hasta la fecha (figura 9).

Tras un consenso entre los investigadores Jansen y Mojica, se decidió adoptar el acrónimo CRISPR (*Clustered Regularly Intespaced Short Palindromic Repeats*) a estas secuencias repetidas interespaciadas. Este acrónimo es actual y muy utilizado. Sin embargo, hoy en día se conoce que no todas las secuencias son simétricas en su totalidad, ni todas las repeticiones son palíndromos verdaderos (Mojica y Garrett, 2013).

Gracias al estudio de Tang et al., (2002) se constató que de un solo *locus* de CRISPR se transcribían múltiples RNAs, por lo que se llegó a la conclusión de que se transcribía todo el *locus* en forma de ARN precursor, posteriormente denominado pre-crRNA y, a continuación, este pre-crRNA daba lugar a fragmentos de RNA de menor tamaño actualmente conocimos como crRNA.



Figura 9: Alineamiento de secuencias SRSR de distintas especies. Con fondo negro, las posiciones conservadas. Las flechas indican el carácter palindrómico de las repeticiones (Mojica et al., 2000).

De forma coetánea en el tiempo, fueron identificados cuatro genes *Cas* (CRISPR-associated) localizados en regiones contiguas a los *locus* de CRISPR, que no se encontraban en microorganismos carentes de los mismos. Según Jansen et al., (2002) la funcionalidad de estos genes debía ir ligada a la de CRISPR. Debido a la cierta homología con proteínas exonucleasas y helicasas se sugirieron las funciones probables de algunas de estas proteínas *Cas*.

Gracias a los análisis bioinformáticos se detectó que las secuencias espaciadoras eran homólogas a secuencias pertenecientes a ADN vírico. Por tanto, el origen de estas secuencias se encontraba en secuencias procedentes de elementos genéticos patógenos para los microorganismos, en la actualidad reciben el nombre de protoespaciadores (Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Asimismo, se corroboró que los entes portadores de los protoespaciadores ya adquiridos eran incapaces de ser infectados, hecho mediante el cual se determinó la hipótesis de la función de CRISPR como un sistema de defensa adaptativo contra elementos de material genético invasor (Mojica et al., 2005).

Además, Bolotin et al., (2005) describieron la presencia de una secuencia conservada adyacente al protoespaciador, y que en la actualidad, tras observar su ubicuidad en diferentes sistemas CRISPR, se denomina PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) y tiene un papel crucial en el funcionamiento de varios sistemas CRISPR-Cas (Mojica y Garrett, 2013).

Con el transcurso de los años se ha profundizado en los mecanismos de este sistema. En 2008, se constató la actuación de los crRNAs codificados en los espaciadores de CRISPR sobre dianas de ADN (Brouns et al., 2008). Gracias a Garneau et al., (2010) se sabe la importancia del corte del ADN diana por parte de la proteína Cas9, la cual es guiada por los crRNAs y la indispensable presencia de los PAMs. La necesidad de que los crRNAs estén unidos a tracrRNAs formando estructuras de RNA dúplex para que se asocien con Cas9 fue descrito por Deltcheva et al., (2011).

A modo de resumen, los tres componentes fundamentales del sistema CRISPR son la proteína Cas9, el crRNA y el tracrRNA (Jinek et al., 2012). Gracias a Saprunauskas et al., (2011) sabemos que el sistema CRISPR-Cas9 puede transferirse y expresarse de manera heteróloga entre bacterias distintas.

Gracias a la caracterización bioquímica de Cas9 se ha constatado que la enzima purificada es guiada por un crRNA para generar un corte en su correspondiente ADN diana. Además, fusionando las dos estructuras de RNA del sistema (crRNA y tracrRNA), en una construcción abreviada denominada sgRNA (*single guide RNA*), se facilita el corte del ADN diana *in vitro* (Jinek et al., 2012)(figura 10).

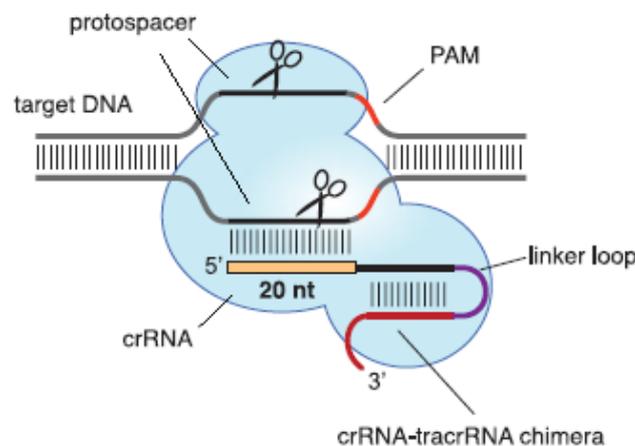


Figura 10: Esquema del sistema de edición genética CRISPR-Cas9. La construcción sgRNA, formada por la secuencia crRNA (específica del ADN diana) y la secuencia tracrRNA que interactúa con Cas 9, permite la actividad endonucleasa de la proteína. Modificado de Jinek et al., (2012).

La metodología de edición genética CRISPR/Cas9 funciona de la siguiente manera:

Una vez que la quimera crRNA-tracrRNA o sgRNA ha conseguido dirigir a la proteína al sitio de unión específica ocurren dos pasos clave (figura 11). En primer lugar se genera un corte en ambas hebras de ADN bicatenario (DSB) diana para la cual se ha diseñado (Urnov et al., 2010). Cuando se ha producido el corte la maquinaria celular de reparación del ADN se pone en marcha. Esta maquinaria endógena puede seguir dos

vías de reparación del ADN: unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación directa por homología (HDR), según se encuentre presente un molde de reparación o no. Dependiendo de la vía se consiguen diferentes tipos de modificación genética (figura 11).

- Mediante la vía NHEJ, donde no se encuentra presente el molde de reparación, los dos fragmentos de DNA bicatenario resultantes del DSB son ligados de nuevo, dando lugar a modificaciones en forma de inserciones o deleciones (*InDel*). Si estas modificaciones se producen en el exón diana, desembocaran en *Knock-outs*, por cambio en la pauta de lectura y/o aparición de codones de terminación prematuros (Ran et al., 2013).
- Si, por el contrario, está disponible el molde de reparación, introducido de forma exógena con las alteraciones en la secuencia deseadas, se activa la vía HDR. Esta vía implica la recombinación homóloga entre el ADN diana que sufrió el corte y el molde de reparación, el cual puede presentarse en forma de ADN bicatenario o monocatenario. Este mecanismo es capaz de resultar en una mutación deseada mediante la sustitución de la secuencia diana por el molde de reparación sintetizado con las modificaciones deseadas (Cong y Zhang, 2014).

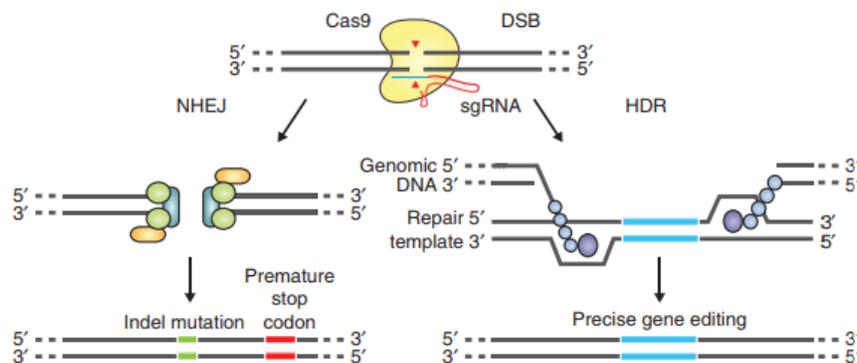


Figura 11: Los DSB inducidos por la acción de la proteína Cas9 promueven la edición de genes. En esta figura se representan ambas vías de reparación del corte. NHEJ puede resultar en mutaciones *InDel* aleatorias y, por tanto, cambios en la pauta de lectura. HDR, al disponer de un molde de reparación, es capaz de dar lugar a una edición exacta en el lugar de corte. Modificado de Ran et al., (2013).

7.3. Aplicaciones del sistema de edición genética CRISPR-Cas9 en las interacciones planta – microorganismo.

Gracias a las aplicaciones en investigación y sus repercusiones en los avances científicos, la edición de genomas a través de la metodología CRISPR-Cas9 es una herramienta de gran uso en laboratorios de todo el mundo.

Dentro de los estudios de fisiología vegetal, CRISPR-Cas9 se ha utilizado en temas de biocontrol o mejora genética de los cultivos tanto en la promoción del crecimiento como en el aumento de sustancias de interés.

En la bibliografía científica podemos encontrar que diversos autores han conseguido reducir el pardeo de manzanas, champiñones y patatas, gracias al silenciamiento de los genes encargados de la biosíntesis de la polifenol oxidasa (Haltermann et al., 2016; Waltz et al., 2016; Nishitani et al., 2016). Según Jiang et al., (2017) la composición de ácidos grasos de las semillas de *Camelina sativa* es mejorada actuando directamente en la modificación del genoma vegetal. Por otro lado, Xu et al., (2016) consiguieron aumentar de forma significativa el peso y tamaño del grano de arroz modificando los genes *GW2*, *GW5* y *TGW6* con esta herramienta de edición génica.

También, encontramos ejemplos muy útiles en biorremediación. Tang et al., (2017) mostraron una bajada en la acumulación de cadmio en planta de arroz gracias al silenciamiento vía CRISPR-Cas9 del gen *OsNramp5*, responsable del transporte de este metal.

Aunque como se ha visto la aplicación de la metodología CRISPR-Cas9 enfocada a ediciones de genomas es muy común y está muy distribuida, hasta la fecha son aún pocos los estudios disponibles cuyo fin principal haya sido el estudio de la interacción planta-microorganismo. Algunos de ellos se presentan a continuación:

Yi y sus compañeros (2018) de la Universidad de Groningen han conseguido detectar la función antifúngica de dos sideróforos (fengicina y surfactina) producidos por *Bacillus subtilis* HS3, ampliando así los conocimientos de esta especie como agente de biocontrol.

Yi et al., (2018) realizaron mutantes bacterianos de la cepa *Bacillus mycoides* EC18 modificando la ruta de biosíntesis de varios sideróforos; por un lado, mostraron que mutantes deficientes de petroctina $\Delta asbA$ aumentan la biomasa y clorofila total de hojas de *Brassica rapa* tras su inoculación. Sin embargo, mutantes de bacillibactina $\Delta dhbB$, redujeron la colonización significativamente. Así pues, quedó descrita la importante función de la bacillibactina en la actividad promotora del crecimiento vegetal por parte de la especie *Bacillus mycoides*.

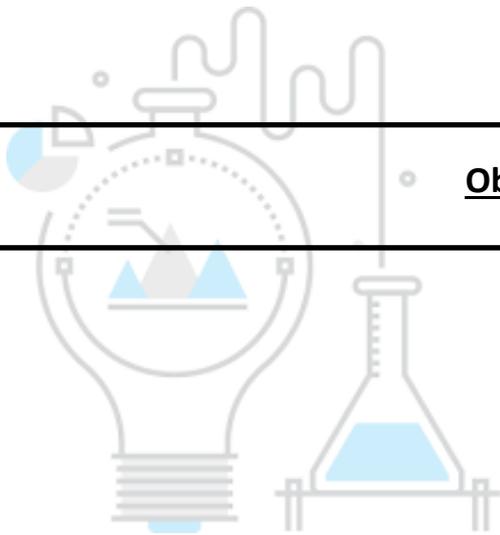
Esta tecnología también ha sido empleada en cultivos para la inducción de resistencias a virus. Los síntomas de los virus causantes del encrespamiento apical de la remolacha (BSCTV) y del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) han sido disminuidos significativamente en plantas modelo como *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* (Baltes et al., 2015; Ji et al., 2015).

Además, dentro de la interacción planta – patógeno, Wang et al., (2014) describieron los análisis realizados con CRISPR-Cas9 en el gen *TaMLO-A1* y su función en

la mejora de la resistencia al mildiu polvoriento causado por *Blumeria graminis* f. sp *tritici* en plantas de trigo.

En este contexto, y debido a la novedad que presenta este tema y a las interesantes aplicaciones que aporta, se decidió utilizar la herramienta de edición genómica CRISPR-Cas9 en la presente Tesis Doctoral para profundizar en la interacción entre un cultivo, la colza, y una cepa endófito del mismo, *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 con capacidad para promover su crecimiento vegetal.

Objetivos

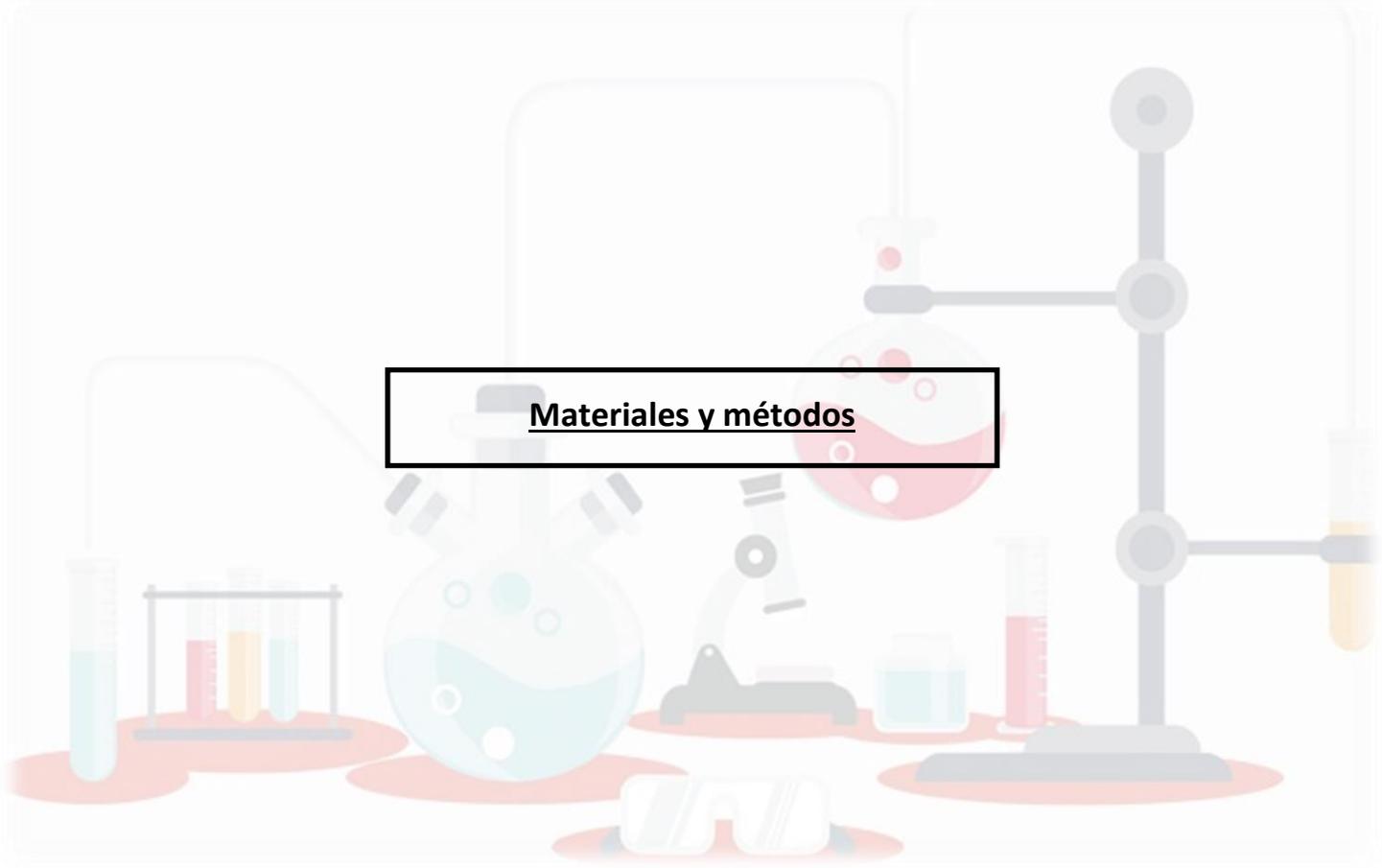


El uso de fertilizantes químicos en la agricultura ha supuesto importantes incrementos en las producciones de los cultivos, sin embargo, estas sustancias generan efectos negativos tanto para el medio ambiente como para la salud humana.

Dentro de las alternativas a estos fertilizantes se encuentra el uso de bacterias PGPR, cuyos efectos en el desarrollo y la calidad de los cultivos han sido estudiados desde las últimas décadas. Dentro de este grupo, se debe hacer especial atención en los microorganismos endófitos, los cuales poseen las características y mecanismos necesarios para poder penetrar en los tejidos vegetales y, lograr así, una relación más íntima con el hospedador evitando la competencia con otras especies presentes en la rizosfera.

Así pues, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el estudio y caracterización de microorganismos endófitos de dos cultivos de interés agronómico, *Phaseolus vulgaris* y *Brassica napus*, analizando el potencial de las cepas aisladas para promover el crecimiento vegetal y mejorar el contenido nutricional de diversos cultivos de interés agroalimentario y bioenergético. Para cumplir con este objetivo general se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar la biodiversidad de endófitos aislados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y raíces de *Brassica napus* a través de un estudio metagenómico y culturómico.
2. Caracterizar fenotípica y genotípicamente los aislados, con el fin de poder seleccionar las bacterias con mejores características PGPR *in vitro*.
3. Secuenciar, anotar y analizar los genomas de las cepas seleccionadas para obtener información sobre los mecanismos bacterianos involucrados en la interacción planta-microorganismo.
4. Estudiar la colonización radicular y la interacción de las cepas seleccionadas con diferentes cultivos de interés agroalimentario y bioenergético.
5. Evaluar la capacidad de los aislados seleccionados para promover el desarrollo vegetal y mejorar la calidad nutricional de cultivos de interés económico sensibles a la salinidad de los suelos.
6. Evaluar el efecto de poliaminas bacterianas involucradas en la interacción, colonización y desarrollo vegetal de cultivos de *Brassica napus*, tanto en condiciones normales como de estrés salino.



Materiales y métodos

1. Microorganismos utilizados en el estudio.

1.1 Recolección de muestras.

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron aislados de dos plantas diferentes. En primer lugar, se utilizaron nódulos de plantas de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) crecidas en suelos de dos municipios de la provincia de Salamanca, San Cristóbal de la Cuesta (41°01'41.0"N - 5°37'24.1"W) y Machacón (40°55'44.2"N - 5°29'55.3"W).

En segundo lugar, los microorganismos fueron aislados de raíces de plantas de colza (*Brassica napus* L.), sembradas en dos suelos procedentes de municipios diferentes, Peleas de Arriba (41°32'60.5N - 5°73'24.7W, perteneciente a la provincia de Zamora) y Castellanos de Villiquera (41°05'04.1N - 5°68'09.2W perteneciente a la provincia de Salamanca). Ambas plantas fueron desenterradas y transportadas al laboratorio donde fueron procesadas en menos de 3 horas.

1.2 Aislamiento de cepas bacterianas.

En primer lugar, para el aislamiento de bacterias del interior de los nódulos de alubia se realizó una selección de nódulos efectivos (color interno rosado). Los nódulos fueron lavados con agua para eliminar los restos de suelo y posteriormente se desinfectaron en superficie sumergiéndolos durante 2 minutos en una solución de cloruro de mercurio HgCl₂ al 2.5 %. Manteniendo las condiciones asépticas, se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril, para eliminar los posibles restos de HgCl₂ (Vincent, 1970). Después se trituraron los nódulos con ayuda de una varilla de cristal estéril, con la cual se sembró el triturado en placas de YMA (anexo I, tabla 2) y TSA (anexo I, tabla 3). Las placas se incubaron a 28 °C durante aproximadamente 21 días, periodo en el que fueron revisadas periódicamente. A partir de las colonias obtenidas, se realizaron aislamientos por agotamiento en estría hasta obtener cultivos puros que se sembraron en el mismo medio y a la misma temperatura.

En segundo lugar, las plantas de colza se recogieron en estado fenológico de roseta, las cuales fueron transportadas al laboratorio donde se lavaron repetidas veces con agua estéril, manteniendo en todo momento las condiciones asépticas. Las raíces fueron cortadas y desinfectadas en superficie usando una solución de hipoclorito sódico al 2% seguido por 5 lavados con agua estéril. Los trozos de raíces fueron machacados en un mortero estéril y disueltos en 900 µL de una solución salina MgSO₄ 10 mM estéril. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁷, las cuales fueron inoculadas (100 µL) en placas Petri con medios de cultivo [YMA, TSA, 869 (Mergeay et al., 1985) y 869 - 1/10 (anexo I, tabla 4)] y se incubaron a 28°C durante 21 días. A partir de las colonias obtenidas, se realizaron aislamientos por agotamiento en estría hasta obtener cultivos puros que se sembraron en el mismo medio y a la misma temperatura.

1.3 Mantenimiento y conservación de los aislados.

El mantenimiento de las cepas de uso rutinario se realizó en placas tipo Petri con su medio de cultivo correspondiente, conservándolas a una temperatura de 4°C.

La conservación a largo plazo se realizó a una temperatura de -80 °C, utilizando una solución crioprotectora de glicerol al 25 %, que fue repartida en criotubos (1.5 mL) previa esterilización en el autoclave. Posteriormente, a partir de los cultivos puros crecidos en los medios correspondientes se prepararon suspensiones celulares de cada uno de los aislados, los cuales fueron guardados en los correspondientes criotubos. Se realizaron tres copias de criotubos por cada cepa.

2. Análisis de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal.

2.1 Solubilización de fosfato.

La capacidad de solubilización de fosfato inorgánico se estudió utilizando el medio Pikovskaya como medio base (Pikovskaya, 1948) además de la adición de fosfato bicálcico (Ca_2PO_3) 5 g/L .

Sobre la superficie de las placas se depositaron 10 μL de una suspensión de cada cepa, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C. Pasado el tiempo de incubación, las cepas cuya solubilización era positiva presentaron un halo alrededor de la colonia.

2.2 Producción de sideróforos.

La capacidad bacteriana para producir sideróforos se evaluó usando el medio de cultivo M9-CAS-AGAR, modificación del medio utilizado por Schwyn y Neilands (1987). La modificación consiste en la adición de un disolvente catiónico HDTMA, el cual estabiliza el complejo Fe-CAS y le aporta un color naranja característico al medio (Alexander y Zuberer, 1991). A continuación, se detallan las 4 soluciones necesarias para realizar este medio de cultivo, que se prepararon y se esterilizaron en el autoclave de forma separada.

2.2.1 Solución I.

Se mezclaron 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (Disueltos en HCl 10 mM), con una solución acuosa de 50 mL de CAS (Chromeazurol S, $1.21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). La solución resultante adquirió un intenso color púrpura.

Posteriormente se mezclaron con 40 mL de una solución de HDTMA ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). La solución resultante tenía un color azul marino denso. Se añadió a las restantes cuando su temperatura fue menor de 50°C.

2.2.2 Solución II.

Para realizar esta solución se juntaron los siguientes reactivos: KH_2PO_4 (0.3g/L), NaCl (0.5g/L), NH_4Cl (1 g/L) y H_2O (750mL), posteriormente se añadieron 30.24 g/L de PIPES (piperazina-N,N'-bis[ácido 2-ethanesulfónico) y se ajustó el pH a 6.8. Se añadió también 15 g de Agar.

2.2.3 Solución III.

Para obtener esta solución se deben mezclar los reactivos de la tabla 5 (anexo I) en 70mL de agua destilada.

2.2.4 Solución IV.

La solución número IV es una disolución de 30 mL de cas-aminoácidos (proviene de la degradación parcial de la caseína) al 10 % p/v, la cual se esteriliza mediante filtración por una membrana de 0.22 μm (MilliporeTM, Amicon, EEUU).

Una vez que estaban las soluciones preparadas y esterilizadas, se mezclaron añaden cuando se encontraban a una temperatura de aproximadamente 50 °C. Siendo la Solución IV la última en ser añadida. Se sirvieron en placas cuadradas de 12 cm x 12 cm.

Sobre la superficie de las placas de depositaron 10 μL de una suspensión de cada cepa, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C, aunque según el crecimiento de la cepa el periodo de evaluación puede aumentar. Las cepas cuya producción de sideróforos era positiva presentaron un halo alrededor de la colonia de color naranja.

2.3 Determinación del grupo de sideróforos producido.

Para el análisis y evaluación del grupo de sideróforos producido se siguió el protocolo descrito por Pérez-Miranda et al., (2007). Las condiciones de ajuste del pH de las soluciones y las concentraciones fueron descritas previamente por Schwyn y Neilands (1987).

2.4 Producción de ácido indol-3-acético.

La capacidad para producir ácido indol-3-acético fue evaluada utilizando el medio JMM (Graham et al., 1989). Los pasos seguidos fueron los siguientes:

La cepa de estudio se sembró en una placa Petri la cual contenía el medio idóneo de crecimiento de dicha cepa, se dejó crecer 5 días a 28°C (ajustar al periodo de crecimiento de la bacteria con la que se trabaje). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó una solución bacteriana en agua destilada estéril, a una densidad de 10^6

UFC/mL según la escala McFarland. Con 100 μ L de la solución se inoculó el medio JMM modificado.

Para la preparación del medio JMM modificado, se partió de una solución base o medio JMM base (anexo I, tabla 6), la cual se esterilizó en el autoclave, con excepción de la solución de vitaminas, que se añadió con posterioridad. El pH debe ajustarse entre 7 y 7.2 con ácido cítrico 0.55 M, el cual se añadió gota a gota para evitar un cambio brusco. Si el pH baja de 7 se ajusta con KH_2PO_4 .

Para la preparación de elementos traza (Panreac™) (anexo I, tabla 7), todos los reactivos se disolvieron en agua destilada, ajustándose el pH a 5.0. Posteriormente se añadió EDTA 1 g/L. Se esterizaron por filtración. Para la preparación de la solución de vitaminas (Fluka™) (anexo I, tabla 8), todos los reactivos se disolvieron en Na_2HPO_4 (pH 7.0). Se esterizaron por filtración.

Una vez preparado el medio base, se separó en viales, añadiendo a cada uno 2 mL de la solución y se esterizaron en el autoclave. Posterior a la esterilización, se añadió la cantidad correspondiente de la solución de vitaminas (1.6 μ L).

La producción de ácido-3-indolácetico se determinó con triptona, debido a su alto contenido en L-triptófano, precursor de este ácido. Así pues, a cada uno de los viales autoclavados se añadieron 20 μ L de L-triptófano.

Para la preparación del L-triptófano es conveniente realizar un stock a 100X, con una concentración final de 0.167 g/L, al diluirlo en agua el pH es muy básico para ajustarlo a pH 7 se añade K_2HPO_4 . Tanto el L-triptófano como el K_2HPO_4 deben esterilizarse por filtración con un tamaño de poro de 22 μ M (Millipore®, Amicon, EEUU). Se conserva a 4°C.

Una vez inoculado los viales con 100 μ L de la solución bacteriana, se incubaron en oscuridad el tiempo idóneo de crecimiento de la cepa de estudio. Se recomienda realizar al menos tres repeticiones por cepa, para poder realizar con posterioridad una media de los resultados obtenidos.

Tras el periodo de incubación se homogenizó la muestra, tras lo cual se recogió 1.5 mL de medio y se centrifugaron durante 1 minuto a 10.000 rpm. El sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración empleando un tamaño de poro de 22 μ M. El filtrado obtenido se analizó mediante cromatografía líquida de HPLC. El análisis fue realizado por el Servicio de Análisis elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca.

3. Estudio de la capacidad de colonización de los aislados.

3.1 Producción de celulosa.

La capacidad bacteriana para producir celulosa fue evaluada utilizando el medio de cultivo correspondiente para el crecimiento de las bacterias, los cuales fueron suplementados con 25 mg/L de colorante Rojo Congo (Sigma®). Este colorante es capaz de unirse a polímeros de 1,4-β-glucosa, por lo que es comúnmente utilizado para la detección de celulosa (Mateos et al., 1992).

Sobre la superficie de las placas se depositaron 10 μL de una suspensión de cada cepa, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C, aunque según el crecimiento de la cepa el periodo de evaluación también puede aumentar. Las cepas cuya producción de celulosa era positiva presentaron una rojo coloración rojiza en la colonia. Según el nivel de producción está coloración varió desde rosa débil a rojo intenso.

3.2 Producción de celulasas.

Los ensayos para determinar la capacidad de los aislados para producir celulasas se llevaron a cabo utilizando el método de doble capa descrito por Mateos et al., (1992). La capa base consiste en el medio de cultivo correspondiente a cada cepa (15 mL), la otra capa superior (5 mL) contiene agarosa y carboximetilcelulosa (CMC, Sigma®) al 1%.

Sobre la superficie de las placas se depositaron 10 μL de una suspensión de cada cepa, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C.

Pasados los días de incubación se retiraron con suavidad las células crecidas en la capa superficial con ayuda de agua destilada y un asa de siembra desechable. Sobre las placas se vertió una solución de Rojo Congo (Sigma®) al 0.1% que cubrió la superficie durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron lavados con NaCl 1 M hasta que se diferenciaron los halos de hidrólisis de celulosa en los que el colorante no se adhirió. Las placas se pueden conservar a 4°C durante 12 horas para mejorar la visibilidad del halo.

3.3 Estudio de la capacidad de producción de biofilms.

La formación de biofilm en placas de poliestireno se llevó a cabo según Fujishige et al., (2006). Este método permite una estimación cuantitativa de la

adhesión bacteriana a sustratos abióticos. Este protocolo se realiza en placas multipocillo, lo que permite realizar múltiples medidas de forma rápida y sencilla.

El primer paso fue la preparación de un pre-inóculo (4 mL) de la cepa de estudio en medio TY líquido (anexo I, tabla 9) a 28° C, con agitación orbital a 180 rpm durante 4 días o hasta alcanzar la fase exponencial. La absorbancia del cultivo que se debe alcanzar es de aproximadamente 2.0 medida a una longitud de onda de 600 nm.

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron diluciones (medio TY) del pre-inóculo hasta obtener una suspensión con una densidad óptica de 0.2 medida a una longitud de onda de 600 nm.

Las placas multipocillo de poliestireno (Falcon, 3911, Dickinson Becton, Franklin Lakes, Nueva York) se inocularon con 100 µL de la suspensión en cada pocillo individual. Es necesario rellenar varios pocillos con medio de cultivo sin inocular, que corresponde a los pocillos control. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24, 48 y 72 horas sin agitación en el caso de la cepa PEPV40 y, 16 y 24 horas en el caso de las cepas CDVBN10 Y CDVBN10Δcpa.

En cada análisis se eliminó el medio líquido girando rápidamente la placa hacia abajo, con un golpe seco, se agregaron a cada pocillo 100 µL de una solución a 0.3 % de Cristal Violeta (Sigma®) y se dejaron incubar 10 minutos. Pasado este tiempo el colorante se eliminó de la misma forma que en el paso anterior, con un golpe seco.

A continuación, se realizaron tres lavados con 200 µL de agua destilada, esperando cinco minutos entre ellos y posteriormente desechando el agua de nuevo con un golpe seco.

Se recomienda realizar una limpieza tras cada golpe seco en el cual se descarta el líquido sobrante, especialmente cuando se descarta el cristal violeta. De esta manera, se evita que los restos puedan quedar en las paredes de los pocillos y la superficie de la placa, evitando así posibles alteraciones en las mediciones posteriores.

Se dejó secar durante una hora en la campana de extracción a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se agregan 100 µL de una solución etanol:acetona en una proporción 4:1 a cada pocillo. Se esperaron 15-20 minutos.

Por último, se cuantificó la cantidad de biofilm formado en cada pocillo, ahora disuelto, mediante medición de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ASYS (Biochrom, Reino Unido).

3.4 Ensayo de adhesión y cohesión bacterianas en cepas del género *Pseudomonas*.

Para la realización de este ensayo se prepararon matraces estériles de 250 mL de capacidad con 30 mL de cultivo líquido (TSB) más 25 mg/L de Rojo Congo, los cuales se inocularon con 10 μ L de una suspensión, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo (TSA) durante 1 día a una temperatura de 28 °C.

Los matraces inoculados se incubaron 5 días a 28 °C y 180 rpm. Pasado el periodo de incubación, los matraces se fotografiaron y se dejaron en reposo durante 12 horas, periodo en el que todo el medio de cultivo de las paredes descendió a la base de matraz y se vieron exclusivamente los anillos bacterianos (adhesión) en los laterales de los matraces. Si existe cohesión bacteriana se aprecia un cúmulo rojizo en la base del matraz, indicativo además de una formación positiva de biofilms.

La adición del colorante Rojo Congo permite apreciar mejor la adhesión bacteriana a la pared del matraz y la cohesión bacteriana en el base del fondo.

4. Técnicas bioquímicas.

4.1 Determinación cualitativa de la producción de celulosa por parte de cepas del género *Rhizobium* a partir de celulasas comerciales.

Para la realización de este ensayo se prepararon matraces estériles de 250 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo TY líquido, los cuales se inocularon con 10 μ L de una suspensión, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C.

Para cada cepa de estudio se hicieron dos ensayos en paralelo. En primer lugar, los matraces solo contenían 30 mL del cultivo líquido y, en segundo lugar, los matraces contenían los 30 mL del cultivo líquido más 25 mg/L de Rojo Congo, el cual se une a los enlaces β -1,3 y β -1,4 de los exopolisacáridos producidos (Mateos et al., 1992; Wood et al., 1988).

Los matraces inoculados se incubaron 3 días a 28 °C y 180 rpm. Pasado el periodo de incubación, los matraces se fotografiaron y se dejaron en reposo durante 12 horas, periodo en el que todo el medio de cultivo de las paredes descendió a la base de matraz y se vieron exclusivamente los anillos bacterianos en los laterales de los matraces.

A continuación, se recogieron dos muestras de 5 mL de los flóculos del matraz que no contiene Rojo Congo y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos. Se

descartó el sobrenadante y se añadió sobre el pellet 5 mL de PCA 100 mM pH 5 con el fin de realizar un buen lavado. Se centrifugaron nuevamente a 3500 rpm y 5 minutos.

Sobre una de las dos muestras recogidas se añaden 10 U/mL de celulasa comercial de *Trichoderma viride* (Sigma®) resuspendida en PCA 100 mM pH 5, que corresponde a un volumen de 555 µL de enzima para un volumen de 5 mL de muestra.

Como control negativo se utilizó la segunda muestra recogida que se resuspende en el tampón, pero sin añadir la enzima. Ambas muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C en agitación a 200 rpm.

Tras el tiempo determinado se comprobó la ausencia de flóculos en suspensión. Si en la muestra tratada con la enzima desaparecen los flóculos es indicativo de que se trata de celulosa, la cual ha sido degradada con las celulasas comerciales.

4.2 Determinación de la producción de pectinasas.

La habilidad bacteriana para degradar pectina se evaluó a través de la preparación de placas Petri con dos capas, de forma análoga a la realizada para el análisis de la producción de celulasas.

La capa inferior estaba formada por el medio original del aislamiento y la capa superior contenía una mezcla de pectina (Sigma®) al 1% y agar al 1.5%. Debido a la dificultad de disolución, se esterilizaron en el autoclave el agar y la pectina por separado y fueron mezclados momentos antes de servirlo en las placas.

Sobre la superficie de las placas se depositaron 10 µL de una suspensión de cada cepa, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C.

Las placas se incubaron a 28° y fueron reveladas a los 3 días. Para la determinación de la actividad pectinasa se usó Lugol durante 30 minutos, posteriormente se hicieron lavados con agua estéril. La adición de Lugol permite determinar las cepas productoras de pectinasas, ya que su producción provoca un halo de hidrólisis alrededor de la colonia debido a la falta de unión del mordiente a la pectina (Merín et al., 2015).

4.3 Determinación de la producción de xilanasas.

La capacidad de los aislados para producir xilanasas se determinó a través de la incubación de los aislados sobre placas Petri las cuales, una vez más, contenían dos capas.

La capa inferior estaba formada por el medio original del aislamiento y la capa superior contenía una mezcla de Xilano (Sigma®) al 1% y agar al 1.5%. De nuevo,

debido a la dificultad de disolución, se esterilizaron en el autoclave el agar y el xilano por separado, los cuales fueron mezclados momentos antes de servirlo en las placas.

Sobre la superficie de las placas se depositaron 10 μL de una suspensión de cada cepa, aproximadamente $1 \cdot 10^6$ UFC/mL según la escala McFarland. Los aislados fueron crecidos previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 3 días a 28 °C.

Las placas se incubaron a 28 °C y fueron reveladas a los 3 días post-inoculación. Para la determinación de la producción de xilanasas se usó una solución de Rojo Congo (Sigma®) al 0.1% durante 30 minutos. Posteriormente se hicieron lavados con una solución de NaCl 1M estéril. Se utilizó Rojo Congo debido a su unión a los enlaces β -1,4 del xilano (Samanta et al., 2011). La producción de xilanasas se detectó debido a un halo de hidrólisis alrededor de las colonias.

4.4 Determinación y análisis de la producción de putrescina.

La producción de putrescina se realizó siguiendo los pasos descritos en Park et al., (2018). Las cepas de estudio fueron crecidas durante 3 días a 28 °C y 180 rpm/min en matraces de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio M9 (anexo I, tabla 10), el cual contenía N-acetilglutamato como fuente única de carbono. Se suplementó con un antibiótico selectivo (tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el caso de la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa.

Pasados los tres días, los cultivos bacterianos se centrifugaron (10.000 g – 20 minutos), posteriormente los pellets fueron homogeneizados en 1 mL de ácido perclórico al 5% (4 °C) y 1 mL de 1M NaOH 200 μL de HCl (30 %) fueron añadidos a cada 100 μL de suspensión. Las muestras se incubaron a 110 °C durante 15 horas. Una vez pasado este tiempo, se filtraron con un filtro de tamaño de poro de 0.45- μm (Millipore, USA), se congelaron a - 80 °C durante al menos 12 horas y se liofilizaron.

Las muestras liofilizadas se trataron con 400 μL de ácido perclórico y 400 μL de cloruro de dansilo (Sigma®) [30 mg/mL en acetona (Sigma®)]. Además, se añadieron 20 mg de Na_2CO_3 por muestra.

Las muestras se incubaron a 65 °C durante 60 minutos en oscuridad. Tras ese periodo se añadieron 100 μL de prolina (100 mg/mL). Las muestras se mantuvieron en frío hasta el análisis por HPLC, el cual fue realizado por el servicio de Análisis elemental, cromatografía y espectrofotometría de masas de la Universidad de Salamanca.

5. Técnicas de biología molecular.

5.1 Extracción de ADN.

5.1.1 Extracción de ADN total.

Las cepas fueron crecidas en placas Petri con el medio de cultivo correspondiente. Para la extracción del ADN total se utilizó el kit “REDEXtract-N-Amp Plant PCR Kit” de la casa comercial Sigma®.

Cuando hubo un buen crecimiento en las placas, las células fueron recogidas en un tubo tipo Eppendorf®, al que se añadieron 100 µl de “solución de extracción” y se agitaron mediante un vortex. A continuación, los tubos fueron incubados a 95°C durante 10 minutos. Después se añadieron 100 µl de “solución de dilución” a cada tubo y se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 minuto. Tras la centrifugación se recogieron 100 µl de la parte superior del contenido del tubo, donde se encuentra el ADN, y se depositaron en tubos nuevos, los cuales fueron guardados a -20°C para su conservación.

5.1.2 Extracción de ADN de muestras vegetales.

La extracción de ADN de muestras vegetales se realizó utilizando el kit DNeasy® Power plant® Prokit. Se siguieron las especificaciones facilitadas en el kit y tras su extracción se realizó una cuantificación con el Qubit™ Invitrogen de la casa comercial Thermo Fisher Scientific. Se guardó para su conservación a -20°C.

5.1.3 Extracción de ADN total para secuenciación de genomas.

Con el fin de obtener un ADN puro y de buena calidad para la secuenciación de genomas se utilizó el kit comercial “ZR Fungal/bacterial DNA MiniPrep™” de la casa Zymo Research™. Se siguieron las respectivas especificaciones y tras las respectivas extracciones se realizó una cuantificación de la concentración del ADN con Qubit™ Invitrogen, de la casa comercial Thermo Fisher Scientific™. Se guardó para su conservación a -20°C.

5.1.4 Extracción de ADN plasmídico.

Para la extracción de ADN plasmídico (Tabla 11) se partió de cultivos celulares crecidos en 5 mL de medios LB (anexo I, tabla 12) o TSA, suplementados con antibióticos selectivos en caso necesario, a 37 °C en el caso de cepas de *E. coli* y a 28°C en cepas de *Pseudomonas*. Los cultivos se mantuvieron 12 horas en agitación (220 rpm). La purificación de los plásmidos se realizó usando el kit AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit de la casa comercial Thermo Fisher Scientific™ siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez extraídos, los plásmidos se guardaron para su conservación a -20 °C.

Tabla 11: ADN plasmídico utilizado en la presente tesis doctoral.

Plásmido	Característica	Antibiótico de selección	Referencia
pHC60	Derivado de pHC41. Expresa constitutivamente la <i>GFP</i>	Tetraciclina 10 µg/mL	Cheng y Walker, 1998
synGFP	Expresa constitutivamente la <i>GFP</i> .	Kanamicina 50 µg/mL	Robledo et al., 2011
pCAS-R2KT	Contiene la secuencia que codifica la proteína Cas9	Tetraciclina 10 µg/mL	Sun et al., 2018
pSEVA-gRNAT	Contiene la secuencia que codifica el gRNA scaffold	Tetraciclina 10 µg/mL	
pSEVA-gRNAT-NCA	Contiene la secuencia sgRNA para el gen <i>cpa</i>	Gentamicina 50 µg/mL	Este trabajo
pSEVA-gRNAT-NCA-HR	Contiene las secuencias sgRNA para el gen <i>cpa</i> y HRA*	Gentamicina 50 µg/mL	
pPHUB231	Plásmido parental	Tetraciclina 10 µg/mL	Hubner et al., 1991
pPHUB231- <i>cpa</i>	Contiene la secuencia del gen <i>cpa</i>	Tetraciclina 10 µg/mL	Este trabajo

*HRA= homologous repairing arm.

5.2 Amplificación de ADN mediante PCR.

5.2.1 Obtención de perfiles 879F-RAPD.

La obtención de perfiles 879F-RAPD se realizó con el primer 879F (5' GCCTGGGGAGTACGGCCGCA 3') (Iguar et al., 2003). Los reactivos y condiciones de la reacción utilizadas en la realización de este análisis son los especificados en las tablas 13 y 14. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis, bajo las condiciones descritas en el apartado 5.3, para separar las diferentes bandas amplificadas y obtener los perfiles de RAPD.

Tabla 13: Concentraciones de los reactivos para la obtención de perfiles RAPD.

Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Green Taq (Thermo Fisher™)	12.5 µl	H ₂ O estéril milliQ	8.5 µl
Primer 879F 20 µM	2.5 µl	ADN	2 µl

Tabla 14: Condiciones para la obtención de perfiles RAPD.

Método	Obtención de perfiles RAPD	
Pre-desnaturalización	95 °C – 9'	
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C – 1'
	Anillamiento	45 °C – 1'
	Elongación	72 °C – 2'
Extensión final	72 °C – 7'	

5.2.1.1 Análisis de los perfiles RAPD.

El análisis de los perfiles se realizó con el programa Bionumerics (Applied Maths™, NV; EEUU). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson y el método de construcción de dendrogramas UPGMA.

5.2.2 Amplificación y secuenciación del gen ribosómico ARNr 16S.

La amplificación del gen ARNr 16S se realizó empleando el kit “REDEXtract-N-Amp Plant PCR Kit”, el cual incluye un mix (REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix) con todo lo necesario para la PCR, a excepción de los *primers*: sales, dNTPs y la enzima Taq polimerasa. Este mix contiene un frente de carga que permite la carga directa de los productos de la PCR sobre los geles de agarosa. Para la amplificación de este gen se utilizaron los primers 27F y 1522R, así como los primers Apseu y Hpseu descritos específicamente para *Pseudomonas* (tabla 15). Para completar la secuenciación del gen ARNr 16 se requirió el *primer* adicional 800R (tabla 15).

Tabla 15: *Primers* utilizados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

Primer	Secuencia	Referencia
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Rivas et al., 2006
800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC- 3'	Lane, 1991
1522R	5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3'	Lu et al., 2003
Apseu	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	Ivanova et al., 2009
Hpseu	5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	Ivanova et al., 2009

Los reactivos y volúmenes empleados en cada reacción de PCR se muestran en la tabla 16, las condiciones de amplificación en la tabla 17.

Tabla 16: Volúmenes de los reactivos para la amplificación del gen ARNr 16S.

Reactivos	Volumen
REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix	12.5 µl
<i>Primer F</i>	2.5 µl
<i>Primer R</i>	2.5 µl
H ₂ O estéril milliQ	6 µl
ADN	2 µl

Tabla 17: Condiciones para la amplificación del gen ARNr 16S.

Método	Amplificación del gen 16S rRNA	
Pre-desnaturalización	95 °C – 9'	
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C – 1'
	Anillamiento	55 °C – 1' 30"
	Elongación	72 °C – 2'
Extensión final	72 °C – 7'	

Una vez que los productos de la PCR fueron obtenidos y sometidos a electroforesis, las bandas de interés fueron cortadas y purificadas utilizando el kit "GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro KIT" de la casa comercial Thermo Fisher Scientific™. La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación de ADN de Nucleus (Universidad de Salamanca) utilizando el kit "Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit", y utilizando ABI PRISM (Applied Biosystem®, EEUU) como equipo de secuenciación. La secuenciación del gen ribosómico 16S durante la estancia predoctoral en la Academia China de las Ciencias fue llevada a cabo por la empresa china *Ruidibio*.

5.3 Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1% cuando el objetivo fue cortar bandas de ADN para secuenciar un fragmento amplificado y, al 1,5% cuando se analizaron los perfiles 879F-RAPD y cuando se realizó la metodología específica de CRISPR/Cas9.

Para todas las electroforesis se utilizó TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8, Millipore®). El bromuro de etidio de la casa comercial Promega se añade a una concentración final de aproximadamente 0.5 µg/mL, posteriormente se coloca el peine adecuado y se deja solidificar.

En los geles de agarosa se debe utilizar siempre un marcador, en este caso se empleó GeneRuler®100bp o 1kb, dependiendo del tamaño esperado de bandas.

Para un uso rutinario las condiciones de la electroforesis eran 70 V durante 90 minutos. Sin embargo, para todas aquellas correspondientes a la metodología CRISPR/Cas9 éstas se modificaban a 140 V y 30 minutos.

Por último, todos los geles se observaron con luz UV y se fotografiaron utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad®, EEUU).

5.4 Análisis de las secuencias de ADN.

Para editar los fragmentos de secuencia generados, se utilizaron los programas BioEdit y SnapGene DNA; para el ensamblaje de las secuencias se utilizó el programa Seqman (DNASTar Software). Las secuencias fueron comparadas con las secuencias contenidas en las bases de datos, utilizando el servidor EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>; Yoon et al., 2017) y la plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

5.5 Secuenciación de amplicones y análisis de los genomas.

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias fueron ensambladas mediante Velvet 1.2.10 en base Linux y la anotación

fue llevada a cabo utilizando el programa RAST 2.0, el cual nos permite la anotación automática de los genomas obtenidos.

La secuenciación de amplicones la realizó la empresa *AllGenetics & Biology*, y la secuenciación de los genomas la empresa *MicrobesNG*.

5.6 Conjugación bacteriana.

5.6.1 Marcaje de cepas del género *Rhizobium* con una proteína fluorescente *GFP* mediante conjugación biparental.

La conjugación de la cepa *Rhizobium laguerreae* PEPV40 en este estudio se realizó utilizando la cepa de *Escherichia coli* S17.1 (Simon et al., 1983), la cual contenía el plásmido pHC60 (figura 12) (Cheng y Walker, 1998) por medio de conjugación biparental. Este plásmido contiene un gen que expresa constitutivamente una proteína verde fluorescente (*GFP*) y como marcador tiene un gen de resistencia a tetraciclina (Tc).

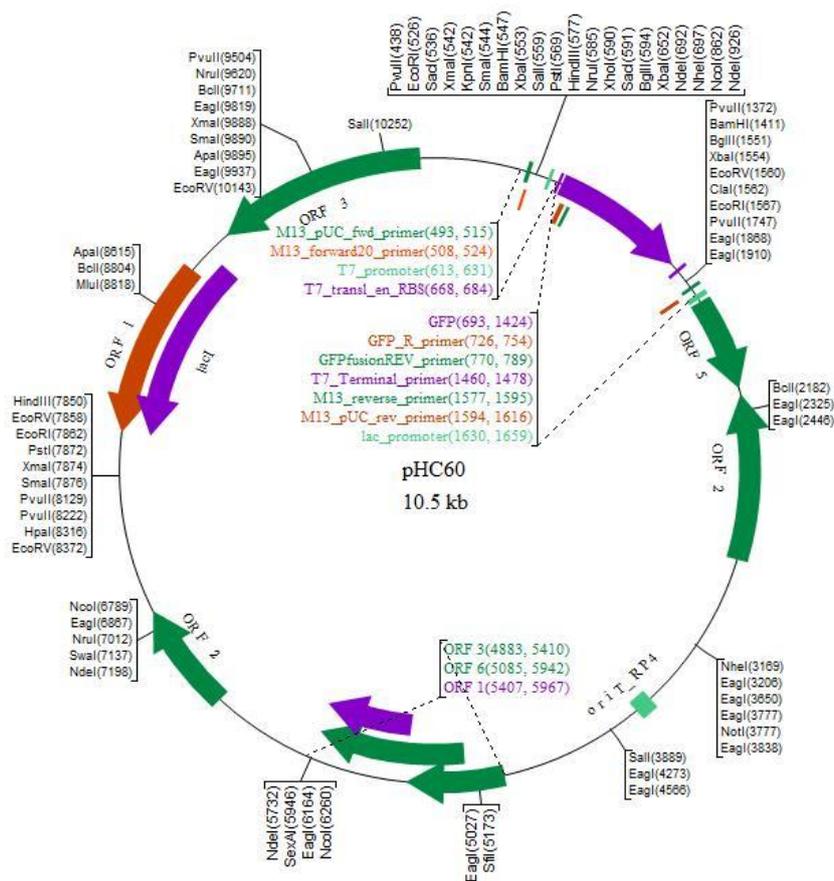


Figura 12: Mapa de representación del plásmido pHC60.

Para llevar a cabo la conjugación se tomaron cultivos de 12 horas a 37°C de la cepa *E. coli* S17.1 pHC60 en LB sólido (anexo I, tabla 12) suplementado con tetraciclina 10 µg/mL y de 48 horas a 28 °C de la cepa *R. laguerreae* PEPV40 en TY sólido (anexo I,

tabla 9). Con un asa de siembra se mezclaron pequeñas porciones de cada cultivo en el orden: cepa receptora (PEPV40) y cepa donadora (S17.1 pHC60) en proporción 2:1, realizando movimientos circulares que homogeneizaran la mezcla. Esta placa se incubó "overnight" a una temperatura de 28 °C. Al día siguiente se toma parte de la mezcla y se siembra por agotamiento en estría en placas de Medio Mínimo (anexo I, tabla 18) (O'Gara y Shanmugan, 1976) suplementado con tetraciclina 10 µg/mL con el fin de obtener colonias individuales. Se dejaron las placas incubando a una temperatura de 28°C entre 3 y 4 días.

Una vez seleccionadas las colonias con aspecto morfológico similar al de *Rhizobium*, cada una de ellas se sembraron simultáneamente en medio mínimo suplementado con tetraciclina 10 µg/mL (MmTc¹⁰), y en medio VRB (Violet Red Agar, Scharlab) realizando una estría de no más de 1 centímetro. Las placas de MmTc¹⁰ se incubaron a 28 °C y las de VRB a 37 °C. Este último paso se realiza para determinar la posible presencia de coliformes y facilitar a selección de colonias transformadas. Cuando se ha comprobado que las colonias seleccionadas están libres de coliformes estas se siembran en medio YMA suplementado con tetraciclina 10 µg/mL.

5.6.2 Marcaje de cepas del género *Pseudomonas* con una proteína fluorescente GFP mediante conjugación biparental.

En este caso la metodología y la cepa donadora son las mismas que para la conjugación biparental de *Rhizobium* en el caso del plásmido pHC60. Sin embargo, también se realizó un marcaje con el plásmido synGFP (Robledo et al., 2011), el cual también contiene la secuencia que codifica la proteína GFP. Los tiempos de incubación para la cepa de *Pseudomonas brassicacearum subsp. neurantiaca* CDVBN10 y CDVBN10Δcpa varían.

Para llevar a cabo la conjugación se tomaron cultivos de 12 horas a 37 °C de la cepa *E. coli* S17.1 pHC60 y *E. coli* S17.1 synGFP en LB suplementado con tetraciclina 10 µg/ml en el primer caso y en LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL en el segundo. Además de un cultivo de 24 horas a 28 °C de las cepas *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 y CDVBN10Δcpa en TY sólido (anexo I, tabla 9).

El protocolo es exactamente el mismo que en el apartado anterior, sin embargo, las colonias individuales empiezan a crecer a las 12-24 horas. Cuando se ha comprobado que las colonias seleccionadas están libres de coliformes estas se siembran en medio 869 suplementado con tetraciclina 10 µg/mL en el primer caso y en medio 869 suplementado con kanamicina 50 µg/mL en el segundo.

5.7 Transformación bacteriana.

5.7.1 Transformación por choque térmico de la cepa *E. coli* S17.1 con los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR.

Para llevar a cabo la transformación de *E. coli* S17.1 con los diferentes plásmidos se siguieron los siguientes pasos:

En primer lugar se mezclaron 100 μ l de células competentes de *E. coli* S17.1 con un volumen necesario para contener una cantidad de plásmido entre 100 y 200 ng/ μ l. Esta mezcla se pipeteó suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente el tubo eppendorf se introdujo a 42 °C durante un minuto y medio y se volvió a introducir en hielo durante otros dos minutos. Se añadieron 900 μ l de LB y se incubaron en agitación (220 rpm) a 37°C durante una hora.

Pasado el tiempo de incubación se inocularon en placas de Petri con medio de cultivo LB [suplementado con tetracilina (10 μ g/mL)] 100 μ l y 150 μ l del volumen final para el plásmido pCAS-R2KT y en medio de cultivo LB [suplementado con gentamicina (50 μ g/ml)] 100 μ l y 150 μ l del volumen final para los plásmidos pSEVA-gRNAT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR.

Estas placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Diferentes clones de las cepas transformadas fueron introducidos en tubos con glicerol al 20 % para su conservación a -80 °C.

5.7.2 Transformación por electroporación de la cepa CDVBN10 con los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR.

Para la transformación bacteriana por electroporación de la cepa CDVBN10 con los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR se utilizó la metodología descrita por Sun et al., (2018).

En primer lugar, la cepa fue crecida en matraces de 100 mL con 10 mL de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.6-0.8 ($\lambda_{600 \text{ nm}}$). Después el LB se repartió en tubos tipo Eppendorf® realizando 3 lavados con tampón HEPES estéril. Toda la biomasa fue concentrada finalmente en 500 μ l de HEPES.

En una cubeta de electroporación, enfriada previamente, y estéril de 2mm de espesor se introdujeron 100 μ l de la suspensión anterior y un volumen de los plásmidos correspondientes que aseguró la cantidad de al menos 150 ng. La electroporación fue realizada en un Bio-Rad GenePulser II (2.5KV; 200 Ω ; 25 μ F).

A continuación, se añadió 1 mL de medio LB estéril y se incubó la mezcla a 30 °C durante 2 horas (220 rpm). Cuando finalizó el tiempo de incubación 250 μ L fueron

esparcidos en placas Petri de LB suplementado con tetraciclina (10 µg/mL) para el plásmido pCAS-R2KT y, suplementado con gentamicina (50 µg/mL)] para los plásmidos pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR.

Estas placas se incubaron a 30 °C durante 12 horas. Diferentes clones de las cepas transformadas fueron introducidos en tubos con glicerol al 20 % para su conservación a -80 °C.

5.7.3 Transformación por electroporación de la cepa CDVBN10Δcpa con el plásmido pPHU231cpa.

Para la transformación por electroporación de la cepa CDVBN10Δcpa con el plásmido pPHU231cpa se siguió el mismo protocolo que en el apartado anterior, con tetraciclina (10 µg/mL) como marcador selectivo.

Las placas Petri de LB estaban suplementadas con tetraciclina (10 µg/mL) y fueron incubada a 28 °C durante 12 horas. Diferentes clones de las cepas transformadas fueron introducidos en tubos con glicerol al 20 % para su conservación a -80 °C.

La comprobación de las cepas electroporadas con los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR se realizó por secuenciación con el plásmido PS1 (Tabla 19).

En el caso de la comprobación de la cepa CDVBN10Δcpa electroporada con el plásmido pPHU231cpa se realizó una PCR con los *primers* M13F y M13R (Tabla 19) según las condiciones descritas en Paço et al., (2016).

Tabla 19: *Primers* utilizados para la comprobación de la electroporación bacteriana realizada.

Primer	Secuencia	Referencia
PS1	5'- AGGGCGGCGGATTTGTCC - 3'	Sun et al., 2018
M13F	5'- TGTAACGACGGCCAGT - 3'	Tamilselvi et al., 2016
M13R	5'- AACAGCTATGACCATG - 3'	

5.8 Edición de genomas mediante la técnica de edición genética CRISPR/Cas9.

La edición del genoma bacteriano de la cepa CDVBN10 mediante la tecnología CRISPR-Cas9 se realizó de la siguiente manera:

En primer lugar, se introdujo por electroporación el plásmido pCAS-R2KT en la cepa CDVBN10 a través de la metodología descrita en el apartado 5.7.2.

En segundo lugar, se diseñaron y construyeron los plásmidos pSEVA-gRNAT-NCA y pSEVA-gRNAT-NCA-HR, los cuales contenían los 20 pares de bases diana. Estas construcciones se realizaron a través de las amplificaciones de las regiones de interés.

Los *primers* utilizados fueron pSeva1R, PNCA1F, PNCA1FB, PNCA2F, PNCA2FB Y PNCA3F (tabla 20). Los volúmenes de la reacción se muestran en la tabla 21 y las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa se detallan en la tabla 22.

Tabla 20: *Primers* utilizados en la metodología CRISPR/Cas9 diseñados en la Tesis Doctoral.

Primer	Secuencia
pSeva1R	TATGCGGTAGAGCTGCC
PNCA1F	AGGTATAATGCTAGCCTGCTGTACCCGACCGCCATGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGT
PNCA1FB	ATAATGCTAGCCCATCTCGTCGCGTGACCACGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTAAA
PNCA2F	TTAATTGACACCATGAATTCTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCCTGC
PNCA2FB	TTGACACCATGAATTCTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCCCATCTCG
PNCA3F	CGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTTTAATTAATTGACACCATGAATTCTTGAC
PF-1	AACCTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAGGAGCTCCGCCGGACTACGTG
PR-1	AAACCGTCCGCGCGCGGAGTGCTGTACAAAGTTGTCATCAAGAATCATCTCCTGGCGA
PF-2	TAAAGACGCCTCTGTCCATCGCCAGGAGATGATTCTTGATGACAACCTTTGTACAGCAC
PR-2	AGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGACTAGTTCTGCAAAATCTCCTGGC

* Todos los *primers* están en dirección 5' – 3'.

Tabla 21: Concentraciones de los reactivos para la edición genética.

Reactivos	Volumen
KOD Fx Buffer Toyobo®	5 µL
Kod FX Toyobo®	0.1 µL
dNTPs (2mm each) Toyobo®	2 µL
NCAKO-F(10 µM)	0.3 µL
NCAKO-R(10 µM)	0.3 µL
H ₂ O estéril milliQ	2.1 µL

Tabla 22: Condiciones de PCR para la edición genética.

Condiciones PCR		
	95 °C	9 minutos
11 ciclos	95 °C	20 segundos
	51.5 °C	35 segundos
	68 °C	15 segundos
24 ciclos	95 °C	20 segundos
	54.5 °C	35 segundos
	68 °C	15 segundos
	68 °C	10 minutos
	16 °C	10 minutos

El plásmido molde pSEVA-gRNAT se cortó y abrió con las enzimas de restricción SacI y EcoRI (Thermo Scientific Fisher FastDigest), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Una vez que las amplificaciones son las correctas y el producto de PCR está purificado, se introdujo en células de *E.coli* S17.1 electrocompetentes a través de la

transformación descrita en el apartado 5.7.1. Obteniéndose así la cepas S17.1 pSEVA-gRNAT-NCA (tabla 23).

Tabla 23: Cepas de *E. coli* obtenidas mediante edición genética.

Cepa	Plásmido	Secuencia de interés	Nomenclatura de la cepa obtenida
<i>E. coli</i> S17.1	pCas-R2KT	Cas9	S17.1 pCas-R2KT
<i>E. coli</i> S17.1	pSEVA-gRNAT	gRNA scaffold	S17.1 pSEVA-gRNAT
<i>E. coli</i> S17.1	pSEVA-gRNAT-NCA	sgRNA para el gen <i>cpa</i>	S17.1 pSEVA-gRNAT-NCA
<i>E. coli</i> S17.1	pSEVA-gRNAT-NCA-HR	sgRNA para el gen <i>cpa</i> y HRA	S17.1 pSEVA-gRNAT-NCA-HR

El siguiente paso fue insertar en los plásmidos pSEVA-gRNAT-NCA los 1000 pares de bases *upstream* y *downstream* del gen de interés. Para ello se partió de los anteriores plásmidos y se realizaron las amplificaciones de estos fragmentos utilizando los *primers* PF-1, PR-1, PF-2 y PR-2 (tabla 20) para el gen *cpa*. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 24.

Tabla 24: Condiciones para la amplificación de los fragmentos *upstream* y *downstream*.

Condiciones PCR		
	95° C	9 minutos
11 ciclos	95° C	20 segundos
	51° C	35 segundos
	68° C	1 minuto
24 ciclos	95° C	20 segundos
	55.5° C	35 segundos
	68° C	1 minuto
	68° C	10 minutos
	16° C	10 minutos

En este caso, el plásmido molde pSEVA-gRNAT-NCA se cortó y abrió con las enzimas de restricción SacI y BclI (Thermo Scientific Fisher FastDigest), siguiendo una vez más las instrucciones de la casa comercial.

Una vez que las amplificaciones fueron las correctas y el producto de PCR estaba purificado, se introdujo en células de *E. coli* S17.1 electrocompetentes a través de la transformación descrita en el apartado 5.7.1. Obteniéndose así la cepa S17.1 pSEVA-gRNAT-NCA-HR (tabla 23).

Una vez que fue sido diseñado y construido el plásmido pSEVA-gRNAT-NCA-HR este fue insertado en la cepa CDVBN10 pCAS-R2KT mediante electroporación, proceso descrito en el apartado 5.7.2.

Los mutantes *Knock-out* CDVBN10 Δ *cpa* fueron chequeados a través de la amplificación de la región que contiene las secuencias *upstream*, la del gen de estudio y *downstream*, utilizando los *primers* NCAKO-F, NCAKO-R (tabla 25). Este proceso se

realizó a través de una *Colony PCR* con las colonias obtenidas tras la electroporación. Los volúmenes de la reacción y las condiciones de amplificación se muestran en las tablas 26 y 27.

La *colony PCR*, se trata de una PCR convencional modificada. En este caso en vez de usar el ADN previamente extraído se picaron directamente las colonias de la placa Petri con un palillo estéril.

La cepa resultante recibió el nombre de CDVBN10Δcpa. Diferentes clones de las cepas transformadas fueron introducidos en tubos con glicerol al 20 % para su conservación a -80 °C.

Tabla 25: *Primers* utilizados en la comprobación del mutante *knock-out* CDVBN10Δcpa.

Primer	Secuencia	Referencia
NCAKO-F	5'-AAACACTTATCGCGGTGAG-3'	Este trabajo
NCAKO-R	5'-TGACTTCATGCTGCGGAAA-3'	Este trabajo

Tabla 26: Concentraciones de los reactivos para la comprobación de la cepa CDVBN10Δcpa.

Reactivos	Volumen
REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix	12.5 μL
<i>Primer</i> NCAKO-F	2.5 μL
<i>Primer</i> NCAKO-R	2.5 μL
H ₂ O estéril milliQ	6 μL
ADN	2 μL

Tabla 27: Condiciones para la comprobación de la cepa CDVBN10Δcpa.

Método	Amplificación del gen <i>cpa</i> y HRA	
Predesnaturalización	95 °C – 9'	
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C – 1'
	Anillamiento	52.5 °C – 1' 10"
	Elongación	72 °C – 2' 30"
Extensión final	72 °C – 7'	

5.9 Diseño y construcción del plásmido pPHU231cpa.

El diseño y construcción del plásmido pPHU231cpa se realizó a partir del plásmido pPHU231 (Hubner et al., 1991) siguiendo la metodología descrita en Paço et al., (2016). El plásmido pPHU231 contiene un gen de resistencia a tetraciclina y un lugar de clonación múltiple (MCS) en el que cortan las enzimas de restricción.

El MCS está localizado dentro del operón *lacZ*, el cual permite la identificación de colonias portadoras del inserto. El plásmido pPHU231 es un plásmido "low-copy" de amplio rango de hospedador. Fue facilitado por la Dra. Ana Paço y la Dra. Esther

Menéndez ambas del Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM-Uévara, Portugal).

El plásmido pPHU231 fue digerido con las enzimas de restricción comerciales EcoRI y SacI (Thermo Scientific Fisher FastDigest) según las instrucciones descritas por la casa comercial.

La amplificación del gen *cpa* se realizó con los *primers* descritos en la tabla 28, las concentraciones descritas en la tabla 29 y las condiciones señaladas en la tabla 30.

Tabla 28: *Primers* utilizados para la amplificación y comprobación del gen *cpa*.

<i>Primer</i>	Secuencia	Referencia
Cpa-F	5'- GAATTCATGAGTCGTATCGTTACC - 3'	Este trabajo
Cpa-R	5'- GAGCTCTCAGGACTCCAAT - 3'	
Int-cpa-R	5'- TTGAAACCGGTATCGCCA - 3'	

Tabla 29: Concentraciones de los reactivos para la amplificación del gen *cpa*.

Reactivos	Volumen
REDEXtract-N-Amp PCR ReadyMix	12.5 µL
<i>Primer F</i>	2.5 µL
<i>Primer R</i>	2.5 µL
H ₂ O estéril milliQ	6 µL
ADN	2 µL

Tabla 30: Condiciones para la amplificación del gen *cpa*.

Método	Amplificación del gen <i>cpa</i>	
Predesnaturalización	95 °C – 9'	
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C – 1'
	Anillamiento	52.5 °C – 1' 10"
	Elongación	72 °C – 1'
Extensión final	72 °C – 7'	

6. Métodos de inmunohistoquímica.

Para la realización del protocolo de inmunohistoquímica en bacterias del género *Bacillus* se utilizaron anticuerpos policlonales comerciales anti-uricasa (Novus Biologicals Ltd™). Se realizaron cortes de no más de 2 centímetros de longitud de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07. Las raíces se colocaron en tubos tipo Eppendorf de 2 mL de capacidad, los cuales contenían PBS estéril (tabla 31).

Las raíces fueron sumergidas en una solución de leche al 3 % y Triton al 0.03 % en PBS 1X durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron

3 lavados con PBS durante 5 minutos. El siguiente pasó consistió en la adición del anticuerpo primario (Uricasa al 1/50) y su incubación “overnight” a 4 °C. La dilución del anticuerpo primario se realizó en un diluyente comercial de DAKO. Las raíces fueron lavadas de nuevo con PBS 3 veces durante 5 minutos.

Se añadió el anticuerpo secundario (Anti FITC GOAT a 1/200, de nuevo en un diluyente comercial de DAKO) y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente y se vuelven a lavar con PBS 3 veces durante 5 minutos. Por último, las raíces se incubaron sumergiéndolas en DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) durante 10 minutos y se lavan con PBS de nuevo. Las muestras se conservan en tampón PBS en oscuridad y 4 °C hasta que son analizadas.

La localización mediante técnicas inmunohistoquímicas fue llevada a cabo por el Servicio de Patología Molecular Comparada (CIC-IBMSS, USAL-CSIC).

Tabla 31: Composición del tampón PBS.

Tampón PBS	Cantidad g / L
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.15
KH ₂ PO ₄	0.2
Agua destilada	1 L

7. Ensayos en planta.

7.1 Desinfección y germinación de semillas en superficie.

La desinfección de las semillas utilizadas en la presente tesis doctoral varió según el tipo de planta.

Las semillas de espinacas fueron desinfectadas en superficie usando etanol al 70 % durante 30 segundos, seguido de una disolución de cloruro de mercurio HgCl₂ al 0.1 % durante 5 minutos. Las semillas fueron lavadas con agua estéril cinco veces.

Las semillas de escarola fueron desinfectadas en superficie usando una disolución de cloruro de mercurio HgCl₂ al 0.1 % durante 4 minutos. Posteriormente se lavaron con agua estéril 5 veces.

Para las semillas de cilantro se usó lejía comercial (NaClO) al 5 % durante 10 minutos. También se realizaron 5 lavados con agua estéril. En este caso se realizó un lavado previo a la desinfección.

Las semillas de colza se introdujeron inicialmente 2 minutos en etanol al 70 % y después en lejía comercial (NaClO) al 5 % durante 10 minutos. Una vez retirada la lejía se hicieron lavados con agua estéril hasta asegurarnos que no quedan restos.

Tras la desinfección en superficie de todas las semillas se seleccionaron aquellas de tamaño de raíz similar y se repartieron en placas cuadradas de 120 cm x 120 cm con medio agar-agua al 1.5 % y se incubaron en oscuridad a 28 °C.

El tiempo de incubación fue de 4-5 días para la espinaca, 2 días para la escarola y la colza y 4 para el cilantro.

7.2 Inoculación de semillas en placa.

En placas tipo Petri cuadradas de 120 cm x 120 cm con medio agar-agua al 1.5 % se colocaron 5 semillas pregerminadas, las cuales fueron inoculadas con 200 μL / raíz de una suspensión de la cepa a una densidad óptica de 0.6 (λ_{600}). En las placas de control negativo sin inocular se añaden 200 μL / raíz de agua destilada estéril. Las cepas usadas en la inoculación fueron crecidas previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 4 días a 28 °C para especies del género *Rhizobium*, 1 día para especies del género *Bacillus* y 2 días para especies del género *Pseudomonas*.

Todas las placas se sellaron con Parafilm™ y se les colocó un papel opaco formando un suelo artificial que cubre 2/3 partes de las placas, Estas se colocaron en posición vertical en la cámara iluminada con mezcla de luz incandescente y fluorescente (cantidad de luz 400 $\mu\text{Einsteins.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y longitud de onda de 400 nm a 700 nm), una temperatura de 22°C por el día y 17°C durante la noche, con un fotoperiodo de 16 horas de luz diarias, 8 horas de oscuridad y un 60 % de humedad relativa.

A determinados días post-inoculación (dependiendo de la planta), se procedió a tomar los datos específicos de cada tipo de ensayo, las plántulas obtenidas se fotografiaron empleando una cámara digital Canon PowerShotG12, 10MP, 5X.

7.3 Inoculación de semillas en maceta.

Además de los ensayos realizados en cámara iluminada con las semillas dispuestas en placas Petri, se realizaron ensayos en cámara iluminada con el fin de comprobar el efecto de las cepas de estudios en las primeras semanas del desarrollo vegetal.

En este caso, los experimentos se llevaron a cabo en plantas de cilantro y escarola. Previamente las semillas fueron desinfectadas en superficie como se menciona en el apartado 7.1 y una vez que estaban pregerminadas se dispusieron en macetas blancas pequeñas (altura 9,5 cm, $\varnothing_{\text{superior}}$ 7 cm, $\varnothing_{\text{inferior}}$ 4.5 cm) conteniendo como substrato vermiculita esterilizada tres veces en el autoclave con un periodo de

24 horas entre ciclos. Se colocaron dos semillas por maceta. Cada semilla fue inoculada con 2 mL de una suspensión de la cepa de estudio a una densidad óptica de 0.6 (λ_{600}). Las cepas usadas en la inoculación fueron crecidas previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 4 días a 28 °C para especies del género *Rhizobium*, 1 día para especies del género *Bacillus* y 2 días para especies del género *Pseudomonas*.

Para el mantenimiento de las plantas, se regaron a demanda con una solución nutritiva (Medio Fahræus) (Fahræus, 1957). Con el fin de analizar el efecto de las inoculaciones bajo condiciones de estrés salino, parte de las macetas fueron regadas a demanda con solución nutritiva salina (Medio Fahræus- 100 mM NaCl). Treinta días después de la inoculación se recogieron los datos y se fotografiaron las muestras tanto de cilantro como de escarola.

Por otro lado, los análisis de la promoción del crecimiento vegetal en los primeros estadios de cultivos de colza se realizaron también en macetas. Sin embargo, las macetas, debido al tamaño de esta especie, fueron más grandes (altura 15 cm, $\emptyset_{\text{superior}}$ 11.2 cm, $\emptyset_{\text{inferior}}$ 7 cm).

Como sustrato se utilizó el medio Hoagland (Hoagland y Snyder, 1933) con una concentración de agar del 0.9 %. Las cepas del género *Pseudomonas* usadas en la inoculación fueron crecidas previamente en su medio de cultivo correspondiente durante 2 días a 28 °C. Se colocaron 4 semillas pregerminadas por maceta, las cuales fueron inoculadas con 200 μL / raíz de una suspensión de la cepa a una densidad óptica de 0.6 (λ_{600}).

Todas las macetas se sellaron con Parafilm™, ajustando otra maceta vacía encima. A las macetas inferiores que contenían el medio se les colocó un papel negro en la base formando un suelo artificial. Veintiún días después de la inoculación se recogieron los datos y se fotografiaron las plantas

7.4 Inoculación de plantas en condiciones de invernadero.

Los ensayos de invernadero se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) adecuando el diseño experimental a las necesidades de los cultivos y del ensayo.

En primer lugar, se procedió a la esterilización de las semillas según los protocolos descritos anteriormente. Transcurrido el periodo de germinación, las semillas, con tamaño de raíz similar, se pasaron a recipientes de plástico (altura 19 cm, $\emptyset_{\text{superior}}$ 21 cm, $\emptyset_{\text{inferior}}$ 15.5 cm) los cuales contenían una mezcla de turba: vermiculita en proporción 3:1 (Projar S.A) para los cultivos de espinaca, escarola y cilantro y vermiculita estéril para los cultivos de colza, como sustrato de crecimiento.

Se colocaron 2 semillas por cada planta, las cuales fueron inoculadas con 5 mL cada una de una suspensión de células de cada cepa en el tratamiento correspondiente. Esta suspensión contenía una densidad de 1×10^6 células/mL, según la escala McFarland. Las suspensiones bacterianas fueron obtenidas previo crecimiento e incubación a 28 °C, 4 días para especies del género *Rhizobium*, 1 día para especies del género *Bacillus* y 2 días para especies del género *Pseudomonas*.

Los recipientes se mantuvieron durante un periodo de 15 y 30 días para la espinaca, 45 días para la colza, 55 días para el cilantro y 60 días para la escarola.

El invernadero presenta una humedad relativa que oscila entre el 45 % y 50 %, un fotoperiodo de 16/8 (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con temperaturas de 25 °C y 20 °C, respectivamente.

7.5 Inoculación de plantas en ensayo de campo.

Puesto que las condiciones de invernadero no permiten llegar a la producción de cultivos de colza, se realizó un ensayo en campo para medir el posible incremento en el número de vainas. Este ensayo se realizó en el municipio de Cañizal (Provincia de Zamora) en un suelo cuyo pH es de 7,87 y su conductividad $96 \mu\text{S cm}^{-1}$.

En total se utilizó una parcela de 29.25 m² dividida en 4 subparcelas de 6 m², con un espacio de 0.5 m entre cada una de las subparcelas. Se realizaron 2 repeticiones por cada tratamiento.

Las semillas se dispusieron en filas con una separación de 10 cm entre semillas. Las semillas, en este caso sin pregerminarse previamente, se inocularon 27 días después de su siembra. Los inóculos, al igual que en las condiciones de invernadero tenían una densidad de 1×10^6 células/mL, según la escala McFarland. El riego con agua se hacía manual a demanda del cultivo.

Pasados 6 meses tras la siembra se recogieron las muestras. Se tomaron medidas del peso seco de la parte aérea, número de vainas y peso seco de las semillas por planta.

7.6 Análisis del material vegetal.

Una vez que los ensayos en invernadero finalizaron, las partes aéreas fueron sometidas a dos tratamientos, por una parte, se realizó un análisis de los macro y microelementos y por otra parte se realizó un análisis de compuestos fenólicos.

7.6.1 Análisis de macro/microelementos.

Muestras representativas de las partes aéreas de los cultivos de interés agroalimentario se secaron en una estufa a 70 °C durante 3 días. Posteriormente se sometieron a un triturado con el objetivo de homogeneizar el contenido de las

muestras, las cuales se enviaron al Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS) para su análisis.

El contenido de nitrógeno total de las muestras vegetales fue medido utilizando un analizador elemental Leco Truspec (Truspec™, Mi, EEUU). El contenido en Ca, Mg, K, P y Fe fue analizado por un espectrofotómetro ICP-OES ICAP 6500 DUO THERMO (Thermo Electron Corporation™, UK).

7.6.2 Análisis de compuestos fenólicos.

El segundo tratamiento realizado con las partes aéreas de los cultivos fue el análisis de los compuestos fenólicos. Para ello, desde las macetas del invernadero se tomaron muestras representativas, las cuales fueron congeladas a - 80 °C previo análisis, con el fin de evitar la posible degradación de los compuestos de interés a analizar.

Los flavonoles y ácidos fenólicos fueron analizados a partir de las muestras conservadas a -80 °C. Se utilizó un HPLC Agilent 1200 con doble detección mediante diodos UV-visible y espectrometría de masas. La columna C-18 Sphersisorb S3 ODS-2 (3 µm, 150 x 4.6 mm, Waters Corporation) está termostatazada a 35°C.

El análisis de los compuestos fenólicos fue llevado a cabo por el Grupo de Investigación en Polifenoles del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

8. Técnicas microscópicas.

8.1 Observación de raíces al microscopio óptico.

Para la visualización de las raíces en el microscopio estas se colocaron, previamente cortadas con un bisturí estéril, sobre un portaobjetos seco y limpio. Se añadió agua destilada hasta cubrir totalmente la raíz y se colocó un cubreobjetos, intentando en la medida de lo posible que no quedasen burbujas, las cuales dificultan la visualización de la raíz.

En los casos que se requirió un colorante de contraste para visualizar las posibles estructuras vegetales se añadió Ioduro de Propidio a 10 µM (Sigma®) en lugar de agua destilada.

La realización de los ensayos de microscopía óptica y de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i, el cual tiene asociada una lámpara halógena de xenón-mercurio que emite luz ultravioleta.

8.2 Observación de raíces al microscopio electrónico.

La observación de raíces al microscopio electrónico fue realizada en colaboración con el *Laboratory of Molecular Structure Characterization* de la Academia Checa de las Ciencias.

El microscopio utilizado pertenecía al modelo FEI Nova NanoSem scanning electron microscope (FEI, USA).

8.3 Observación de raíces al microscopio confocal.

Con un bisturí estéril, se cortaron aproximadamente 2-3 cm de la raíz a observar y se dispusieron sobre una médula de saúco (Ventus®) abierta por la mitad, perpendicular a la base, de tal forma que la raíz quedó estirada entre las dos partes de la médula. Con ayuda de una hoja de cuchilla nueva y muy afilada se realizaron secciones finas de las muestras colocadas en la médula y paralelas a la base.

Con mucho cuidado se recogieron los trozos que quedaron entre las dos partes de la médula y se colocaron en un portaobjetos, al que se añadió Yoduro de propidio y posteriormente un cubreobjetos.

El microscopio utilizado es un modelo Leica TCS SP5 del Centro de Investigación del Cáncer (CIC). Las bacterias marcadas con la proteína GFP se excitan a 488 nm y el Yoduro de Propidio utilizado se excita aproximadamente a 617 nm mediante un láser de argón conectado al equipo. Las proyecciones se llevaron a cabo tomando imágenes individuales aproximadamente cada 1-2 μm .

Resultados y Discusión



Capítulo I: Estudio de la biodiversidad bacteriana de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. y raíces de *Brassica napus* L.: Estudio metagenómico y análisis del culturoma.

En este capítulo se abordan el análisis metagenómico y el aislamiento e identificación de 85 cepas bacterianas aisladas a partir de nódulos de plantas de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en dos suelos de pH neutro y textura arcillo-arenosa de San Cristóbal de la Cuesta y Machacón, ambos municipios de la provincia de Salamanca, y 112 cepas bacterianas aisladas a partir de raíces de plantas de colza (*Brassica napus* L.) cultivadas en un suelo de pH ligeramente ácido y textura franco-arenosa en Peleas de Arriba (Zamora) y en un suelo de pH neutro y textura arenolimoso en Castellanos de Villiquera (Salamanca).

En ambos casos se realizaron grupos mediante perfiles 879F-RAPD y se seleccionó un representante de cada uno, los cuales fueron identificados mediante secuenciación del gen ribosómico 16S. Así pues, estos aislados se compararon con los resultados de la secuenciación masiva de amplicones realizada previamente, tanto de nódulos de alubias como de raíces de colza.

Se eligió la especie vegetal *P. vulgaris* L. por tratarse de una leguminosa en la cual, desde hace décadas, se ha descrito ampliamente su interacción y simbiosis con cepas del género *Rhizobium* (Amarger et al., 1997; Martínez-Romero, 2003; Van Berkum et al., 1996). El género *Rhizobium*, es uno de los géneros más estudiados dentro de las interacciones planta-microorganismo, y es debido, entre otras características, a la fijación biológica de nitrógeno (Mehmood et al., 2018), además de ser un género seguro tanto para la salud humana como para el medio ambiente (García-Fraile et al., 2012). Por otra parte, la colza (*B. napus* L.) fue seleccionada por tratarse de la segunda especie vegetal oleaginosa más cultivada y más importante económicamente en Europa tras la soja (Xiao et al., 2019), además de por su interés en alimentación humana y animal (Valetti et al., 2018).

Así pues, en base a los resultados obtenidos en el análisis metagenómico, para el aislamiento bacteriano de nódulos de alubia se utilizaron los medios de cultivo YMA y TSA, ambos adecuados para el aislamiento de cepas pertenecientes a la familia Rhizobiaceae (Kaci et al., 2005; Vincent, 1970). Sin embargo, con el fin de omitir y evitar ese sesgo, en el aislamiento de raíces de colza se utilizó una mayor variedad de medios de cultivo y se incluyeron además los medios 869 y 869 1/10, descritos en la bibliografía como medios de cultivo adecuados para el aislamiento bacteriano de plantas de la especie *Brassica napus* L. y otras plantas de la familia Brassicaceae (Montalbán et al., 2016; Truyens et al., 2013).

1. Análisis metagenómico de amplicones de nódulos de *P. vulgaris* L. y raíces de *B. napus* L.

La diversidad bacteriana de nódulos de alubia analizada gracias a la secuenciación de amplicones, realizada a través de la plataforma Illumina MiSeq, mostró que en ambas localidades más de la mitad de las secuencias pertenecen al filo

Proteobacteria (89.9 % en las muestras de San Cristóbal de la Cuesta y 76.5 % en las procedentes de Machacón). Los siguientes filos con mayor abundancia fueron Bacteroidetes y Actinobacteria, con representaciones del 5.5 % y 4.0 % para los aislados procedentes de San Cristóbal de la Cuesta y, Bacteroidetes y Cianobacteria para los aislados procedentes de Machacón con representaciones del 18.2 % y 3.3 % (tabla 32).

Tabla 32: Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los filos mayoritarios correspondientes a las muestras de nódulos de alubia procedentes de ambos municipios.

San Cristóbal de la cuesta		Machacón	
%	Filo	%	Filo
89.9	Proteobacteria	76.5	Proteobacteria
5.5	Bacteroidetes	18.2	Bacteroidetes
4.0	Actinobacteria	3.3	Cianobacteria

Analizando la diversidad en ambas localizaciones a nivel de género encontramos una representación del 74.3 % para San Cristóbal de la Cuesta y 32.6 % para Machacón de especies pertenecientes al grupo *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*. En el caso de San Cristóbal de la Cuesta le siguen en abundancia los géneros *Methylothera* (4.6 %), *Streptomyces* (2.8 %) y *Sphingomonas* (2.5 %). Sin embargo, en el caso de Machacón le siguen en abundancia los géneros *Mucilaginibacter* (10.7 %), *Methilophilus* (7.1 %) y *Methylothera* (4.6 %) (tabla 33).

Tabla 33: Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los géneros mayoritarios correspondientes a las muestras de nódulos de alubia procedentes de ambos municipios.

San Cristóbal de la cuesta		Machacón	
%	Género	%	Género
74.3	<i>Allorhizobium, Neorhizobium, Pararhizobium, Rhizobium</i>	32.6	<i>Allorhizobium, Neorhizobium, Pararhizobium, Rhizobium</i>
4.6	<i>Methylothera</i>	10.7	<i>Mucilaginibacter</i>
2.8	<i>Streptomyces</i>	7.1	<i>Methilophilus</i>
2.5	<i>Shingomonas</i>	2.6	<i>Methylothera</i>

Estos resultados demuestran que, en ambas localizaciones, el género mayoritario y predominante es *Rhizobium*. Por tanto, al establecerse como objetivo el aislamiento de cepas pertenecientes a este género, seguro para el medio ambiente y salud humana, para la obtención del culturoma deben usarse los medios de cultivo indicados y apropiados en la literatura científica.

Por otra parte, la diversidad bacteriana analizada a través de los resultados de la secuenciación de amplicones de raíces de colza mostró que en ambas localidades más de dos terceras partes de las secuencias pertenecen al filo Proteobacteria (81.4 %

en las muestras de Castellanos de Villiquera y 71,5 % en las de Peleas de Arriba). El siguiente filo con mayor abundancia fue Bacteroidetes, con una representación del 10.5 % y 14.1 %, respectivamente y en tercer lugar el filo Actinobacteria con 7.0 % y 6.3 % (tabla 34).

Tabla 34: Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los filos mayoritarios correspondientes a las muestras de raíces de colza procedentes de ambos municipios.

Peleas de Arriba		Castellanos de Villiquera	
%	Filo	%	Filo
71.5	Proteobacteria	81.4	Proteobacteria
14.1	Bacteroidetes	10.5	Bacteroidetes
6.3	Actinobacteria	7.0	Actinobacteria

Analizando la diversidad en ambas localizaciones a nivel de género encontramos que el género más abundante fue *Pseudomonas* (35.4 % y 10.5 %, respectivamente). Junto a estos dos géneros, encontramos una representación significativa de los géneros *Rhizobium*, *Sphingomonas* y *Flavobacterium*, ambos compartidos en las dos localizaciones (tabla 35).

Tabla 35: Resultados del análisis metagenómico de amplicones. Se detalla el porcentaje de los géneros mayoritarios correspondientes a las muestras de raíces de colza procedentes de ambos municipios.

Peleas de Arriba		Castellanos de Villiquera	
%	Género	%	Género
10.5	<i>Pseudomonas</i>	35.4	<i>Pseudomonas</i>
9.6	<i>Rhizobium</i>	4.7	<i>Rhizobium</i>
3.7	<i>Flavobacterium</i>	1.2	<i>Flavobacterium</i>
2.6	<i>Sphingomonas</i>	2.3	<i>Sphingomonas</i>

En este caso se aprecia como el género *Pseudomonas* es el género mayoritario en ambas localizaciones, llegando casi al 50 % de las secuencias analizadas. Sin embargo, también se aprecia una mayor diversidad tanto en filo como en género respecto a los resultados de los nódulos de alubia, lo que indica que, para el aislamiento y análisis del culturoma ha de aumentarse el número y variedad de medios de cultivo utilizados con el fin de evitar cualquier tipo de sesgo en el proceso.

2. Recolección de muestras y aislamiento bacteriano.

El aislamiento bacteriano se realizó siguiendo los pasos establecidos en el apartado 1.2 de materiales y métodos. En la tabla 36 se recogen las 85 cepas bacterianas aisladas de los nódulos de *P. vulgaris* L. tanto de las plantas crecidas en el suelo proveniente de San Cristóbal de la Cuesta como de las plantas crecidas en el suelo de Machacón y los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento.

Tabla 36: Resumen de las cepas bacterianas aisladas de nódulos de *P. vulgaris* L.

Municipio	Medio de cultivo	Cepa
San Cristóbal de la cuesta	YMA	SCCPV01, SCCPV02, SCCPV03, SCCPV04, SCCPV05, SCCPV06, SCCPV07, SCCPV09, SCCPV10, SCCPV11, SCCPV12, SCCPV14, SCCPV15, SCCPV16, SCCPV17, SCCPV18, SCCPV19, SCCPV20, SCCPV21, SCCPV23, SCCPV24, SCCPV26, SCCPV28, SCCPV29, SCCPV30, SCCPV31, SCCPV32, SCCPV33, SCCPV34.
	TSA	SCCPVE01, SCCPVE04, SCCPVE05, SCCPVE07, SCCPVE08, SCCPVE09, SCCPVE10, SCCPVE11, SCCPVE12, SCCPVE13.
Machacón	YMA	MACPV01, MACPV02, MACPV03, MACPV04, MACPV05, MACPV06, MACPV08, MACPV09, MACPV10, MACPV11, MACPV12, MACPV13, MACPV15, MACPV16, MACPV17, MACPV18, MACPV19, MACPV20, MACPV21, MACPV22, MACPV23, MACPV24, MACPV25, MACPV26, MACPV27, MACPV28, MACPV29, MACPV30, MACPV31, MACPV32, MACPV34, MACPV35, MACPV36, MACPV37, MACPV38, MACPV39, MACPV40, MACPV41.
	TSA	MACPVE01, MACPVE02, MACPVE04, MACPVE06, MACPVE09, MACPVE10, MACPVE11, MACPVE12.

En la tabla 37 se recogen las 112 cepas bacterianas aisladas de raíces de plantas de colza (*B. napus* L.) cultivadas en los municipios de Peleas de Arriba y Castellanos de Villiquera. Al igual que en la tabla anterior, los aislados se separan según el medio de cultivo utilizado para su aislamiento.

Tabla 37: Resumen de las cepas bacterianas aisladas del interior de raíces de *B. napus* L.

Municipio	Medio de cultivo	Cepa
Peleas de Arriba	TSA	PDABN1, PDABN11, PDABN19B, PDABN23A, PDABN32
	YMA	PDABN2, PDABN6, PDABN7, PDABN8, PDABN9, PDABN12, PDABN13, PDABN14, PDABN15, PDABN20, PDABN21, PDABN24A, PDABN24B, PDABN25, PDABN26.
	869	PDABN4, PDABN5, PDABN19A, PDABN27.
	869 1/10	PDABN3, PDABN18, PDABN21B, PDABN22B, PDABN23, PDABN28, PDABN29.
Castellanos de Villiquera	TSA	CDVBN11, CDVBN13, CDVBN14, CDVBN15, CDVBN21, CDVBN31, CDVBN32, CDVBN33, CDVBN34, CDVBN81, CDVBN84, CDVBN108.
	YMA	CDVBN1, CDVBN2, CDVBN3, CDVBN4, CDVBN22, CDVBN23, CDVBN24, CDVBN25, CDVBN26, CDVBN27, CDVBN28, CDVBN29, CDVBN62, CDVBN63, CDVBN64, CDVBN65, CDVBN66, CDVBN67, CDVBN68, CDVBN69, CDVBN70, CDVBN71, CDVBN83.
	869	CDVBN6, CDVBN8, CDVBN10, CDVBN17, CDVBN18, CDVBN19, CDVBN20.
	869 1/10	CDVBN9, CDVBN16, CDVBN37, CDVBN38, CDVBN39, CDVBN40, CDVBN41, CDVBN42, CDVBN43, CDVBN44, CDVBN45, CDVBN46A, CDVBN46B, CDVBN47, CDVBN49, CDVBN50, CDVBN51, CDVBN52, CDVBN53, CDVBN54, CDVBN55, CDVBN57, CDVBN58, CDVBN59, CDVBN60, CDVBN61, CDVBN72, CDVBN73, CDVBN77, CDVBN78, CDVBN89, CDVBN90, CDVBN91, CDVBN92A, CDVBN92B, CDVBN98, CDVBN100, CDVBN101, CDVBN102.

3. Análisis de la diversidad bacteriana mediante la realización de perfiles 879F-RAPD.

El análisis de perfiles RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de la diversidad genética bacteriana, ya que nos permite estudiar genomas bacterianos sin un conocimiento previo de los mismos. En este caso el primer utilizado ha sido el 879F, que previamente ha sido descrito por su uso en el estudio de la variabilidad genética entre aislados bacterianos (Igual et al., 2003; Liu et al., 2017; Rivas et al., 2006).

Este primer 879F, de alto contenido en G+C, con una longitud de 20 pares de bases y una temperatura de anillamiento entre 50°C y 55°C produce amplificaciones inespecíficas que generan un perfil de bandas característico en cada cepa.

Los perfiles RAPD se usaron por primera vez en el tratamiento y análisis de muestras de ADN humano (Williams et al., 1990). Sin embargo, a día de hoy se utilizan ampliamente en estudios de biodiversidad bacteriana (Martín y Miera, 2014; Pereira et al., 2016). Además, esta técnica resulta de gran utilidad ya que se destaca por la facilidad para procesar un gran número de muestras y, permitir determinar la diversidad intraespecífica entre ellas, reduciendo, por tanto, el número de cepas con las que continuar.

El análisis de perfiles RAPD ha sido utilizado en numerosos trabajos para el estudio de la diversidad de *rhizobia* (Díaz-Alcántara et al., 2014; Kimes et al., 2015), el estudio de bacterias degradadoras de celulosa (Dubey et al., 2014) o para la realización de un *screening* de bacterias aisladas del suelo (Saxena et al., 2014).

Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones ya que no proporciona información filogenética. Además, su análisis es complicado puesto que las intensidades de las diferentes bandas afectan en el análisis de los datos. Ranjard et al., (2000) determinaron que la utilidad de esta técnica debe de depender del tipo de comunidad analizada.

El análisis de los perfiles 879F-RAPD obtenidos para los 197 aislados se realizó con el programa BioNumerics™, con el cual, aplicando el coeficiente de correlación de Pearson (Pearson y Lipmant, 1988) y el método de agrupamiento de UPGMA (Nam et al., 2008) se obtuvieron los 4 dendrogramas que se observan en las figuras 13, 14, 15 y 16.

Los resultados obtenidos del análisis de los perfiles de 879F-RAPD muestran la existencia de 125 grupos (tablas 38, 39, 40 y 41) y, por tanto, se pone de manifiesto la alta diversidad de las cepas aisladas, tanto de los nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. como de las raíces de *Brassica napus* L. Se eligió el porcentaje de 75 % para la estimación de los diferentes grupos en base a estudios de biodiversidad descritos en la bibliografía (Villadas et al., 2017).

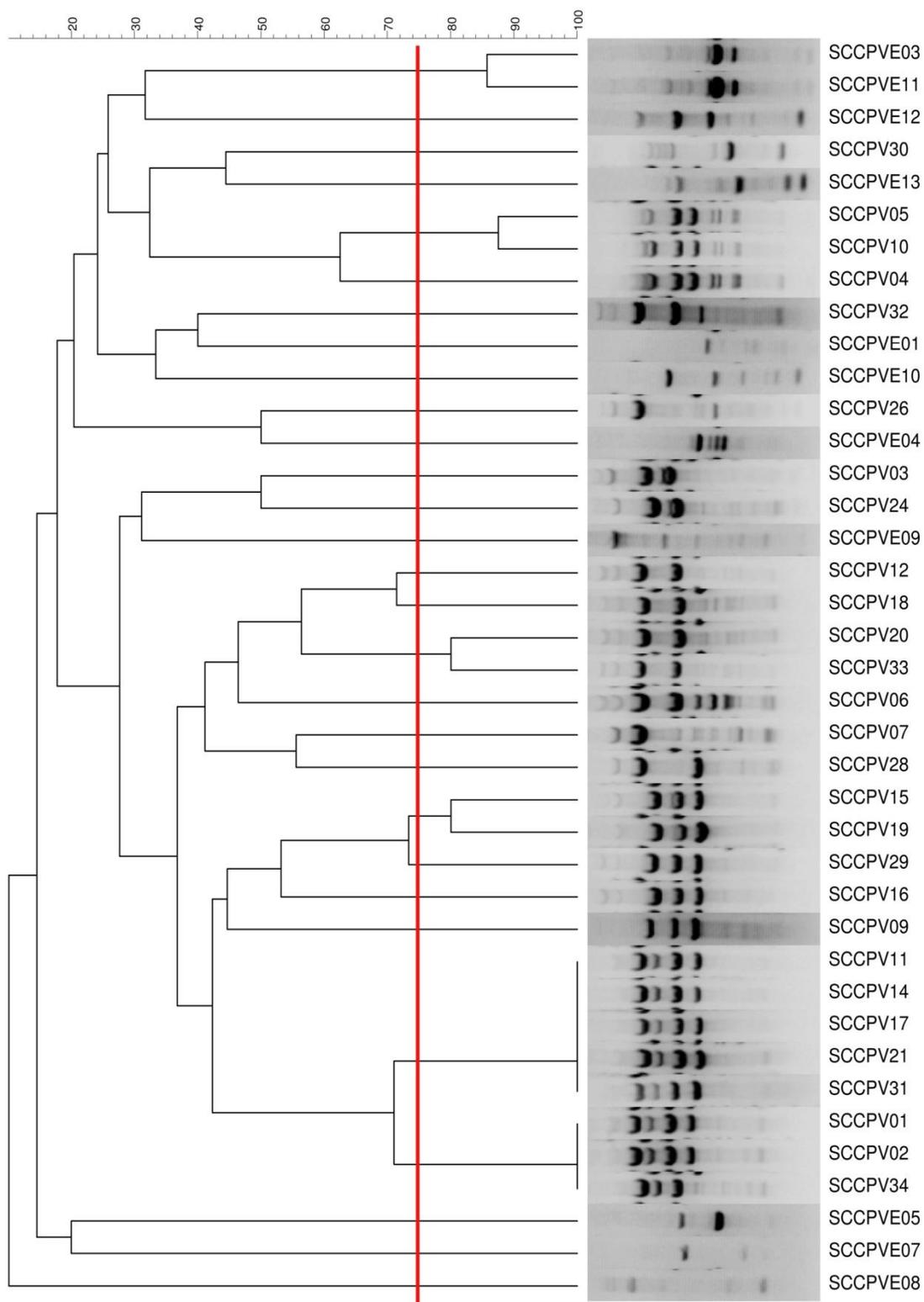


Figura 13: Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de nódulos de alubias crecidas en suelo del municipio San Cristóbal de la Cuesta utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos.

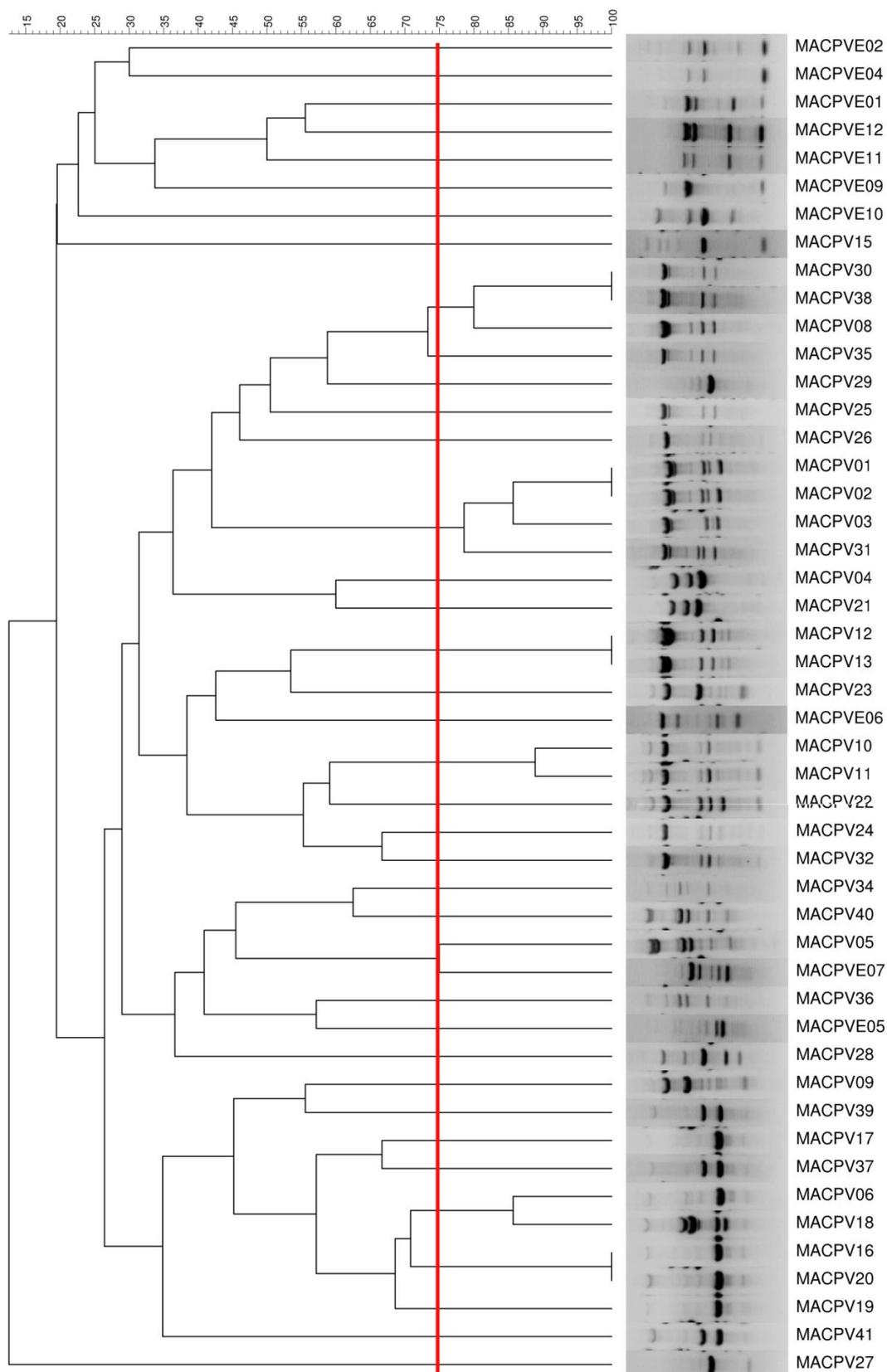


Figura 14: Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de nódulos de alubias crecidas en suelo del municipio de Machacón utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos.

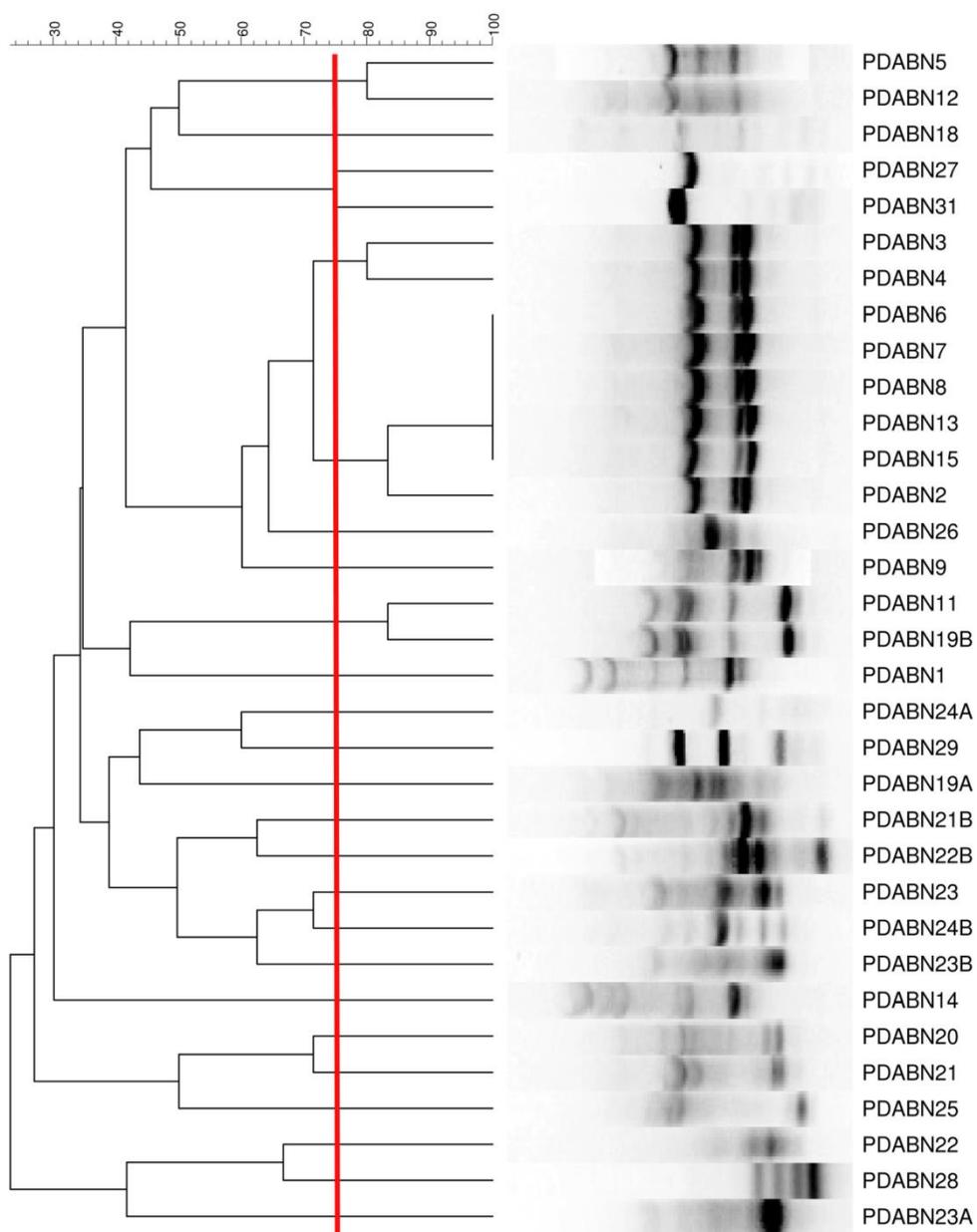


Figura 15: Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de raíces de colza crecidas en el municipio de Peleas de Arriba utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos.

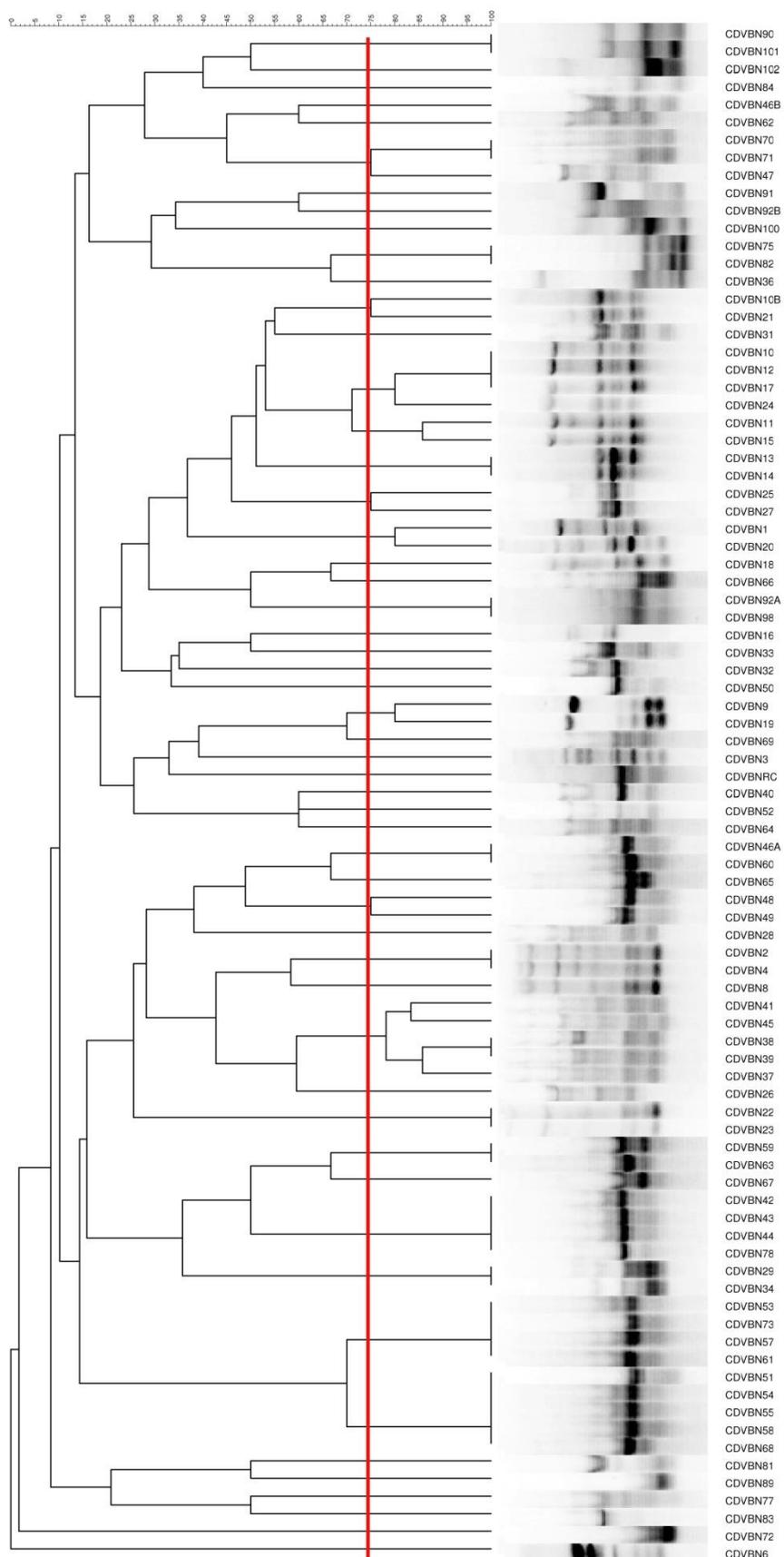


Figura 16: Dendrograma obtenido tras el análisis matemático de los perfiles de RAPD de las cepas aisladas de raíces de colza crecidas en el municipio de Castellanos de Villiquera

utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA. La línea roja indica el porcentaje estimado para la determinación de los grupos.

En este sentido, el análisis de la biodiversidad de los aislados del presente estudio mediante perfiles 879F-RAPD supuso una herramienta óptima para agrupar los aislados, además, se llevó a cabo la secuenciación y análisis del gen ribosómico ARNr 16S de un representante de cada grupo. En las tablas 38, 39, 40 y 41 se indica con un (*) los representantes elegidos en cada grupo.

Tabla 38: Aislados de nódulos de alubias crecidas en el suelo proveniente del municipio San Cristóbal de la Cuesta. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos.

Grupo de RAPD	Cepas
Grupo I	SCCPVE03, SCCPVE11*
Grupo II	SCCPVE12*
Grupo III	SCCPV30*
Grupo IV	SCCPVE13*
Grupo V	SCCPV05, SCCPV10, SCCPV04*
Grupo VI	SCCPV32*
Grupo VII	SCCPVE01*
Grupo VIII	SCCPVE10*
Grupo IX	SCCPV26*
Grupo X	SCCPVE04*
Grupo XI	SCCPV03*, SCCPV24
Grupo XII	SCCPVE09*
Grupo XIII	SCCPV12, SCCPV18, SCCPV20*, SCCPV33
Grupo XIV	SCCPV06*
Grupo XV	SCCPV07*
Grupo XVI	SCCPV28*
Grupo XVII	SCCPV15, SCCPV19, SCCPV29*, SCCPV16, SCCPV09
Grupo XVIII	SCCPV11, SCCPV14, SCCPV17, SCCPV21, SCCPV31, SCCPV01*, SCCPV02, SCCPV34
Grupo XIX	SCCPVE05*
Grupo XX	SCCPVE07*
Grupo XXI	SCCPVE08*

Tabla 39: Aislados de nódulos de alubias crecidas en el suelo proveniente del municipio de Machacón. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos.

Grupo de RAPD	Cepas
Grupo I	MACPVE02*
Grupo II	MACPVE04*
Grupo III	MACPVE01*, MACPVE12, MACPVE11
Grupo IV	MACPVE09*
Grupo V	MACPVE10*
Grupo VI	MACPV15*
Grupo VII	MACPV30, MACPV38, MACPV08, MACPV35*

Grupo VIII	MACPV29*
Grupo IX	MACPV25*
Grupo X	MACPV26*
Grupo XI	MACPV01, MACPV02, MACPV03, MACPV31*
Grupo XII	MACPV04*, MACPV21
Grupo XIII	MACPV12*, MACPV13
Grupo XIV	MACPV23*
Grupo XV	MACPVE06*
Grupo XVI	MACPV10*, MACPV11, MACPV22, MACPV24, MACPV32,
Grupo XVII	MACPV34, MACPV40*, MACPV05
Grupo XVIII	MACPV36*
Grupo XIX	MACPV28*
Grupo XX	MACPV09*
Grupo XXI	MACPV39*
Grupo XXII	MACPV17*
Grupo XXIII	MACPV37*
Grupo XXIV	MACPV06*
Grupo XXV	MACPV18*
Grupo XXVI	MACPV16, MACPV20*, MACPV19
Grupo XXVII	MACPV41*
Grupo XXVIII	MACPV27*

Tabla 40: Aislados de raíces de colza crecidas en el suelo proveniente del municipio de Peleas de Arriba. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos.

Grupo de RAPD	Cepas
Grupo I	PDABN5*, PDABN12
Grupo II	PDABN18*
Grupo III	PDABN27*
Grupo IV	PDABN3*, PDABN4, PDABN6, PDABN7, PDABN8, PDABN13, PDABN15, PDABN2
Grupo V	PDABN26*
Grupo VI	PDABN9*
Grupo VII	PDABN11, PDABN19B*
Grupo VIII	PDABN1*
Grupo IX	PDABN24A*
Grupo X	PDABN29*
Grupo XI	PDABN19A*
Grupo XII	PDABN21B*
Grupo XIII	PDABN22B*
Grupo XIV	PDABN23*, PDABN24B
Grupo XV	PDABN32*
Grupo XVI	PDABN14*
Grupo XVII	PDABN20*, PDABN21
Grupo XVIII	PDABN25*
Grupo XIX	PDABN28*
Grupo XX	PDABN23A*

Tabla 41: Aislados de raíces de colza crecidas en suelos del municipio de Castellanos de Villiquera. Grupos de 879F-RAPD obtenidos y distribución de las cepas en cada uno de ellos.

Grupo de RAPD	Cepas
Grupo I	CDVBN90*, CDVBN101
Grupo II	CDVBN102*
Grupo III	CDVBN84*
Grupo IV	CDVBN46B*
Grupo V	CDVBN62*
Grupo VI	CDVBN70, CDVBN71*
Grupo VII	CDVBN47*
Grupo VIII	CDVBN91*
Grupo IX	CDVBN92B*
Grupo X	CDVBN100*
Grupo XI	CDVBN108, CDVBN21*
Grupo XII	CDVBN31*
Grupo XIII	CDVBN10*, CDVBN12, CDVBN17, CDVBN24, CDVBN11, CDVBN15
Grupo XIV	CDVBN13*, CDVBN14
Grupo XV	CDVBN25*, CDVBN27
Grupo XVI	CDVBN1*
Grupo XVII	CDVBN20*
Grupo XVIII	CDVBN18*
Grupo XIX	CDVBN66*
Grupo XX	CDVBN92A, CDVBN98*
Grupo XXI	CDVBN16*
Grupo XXII	CDVBN32*
Grupo XXIII	CDVBN33*
Grupo XXIV	CDVBN50*
Grupo XXV	CDVBN9*
Grupo XXVI	CDVBN19*
Grupo XXVII	CDVBN69*
Grupo XXVIII	CDVBN3*
Grupo XXIX	CDVBN40*
Grupo XXX	CDVBN52*
Grupo XXXI	CDVBN64*
Grupo XXXII	CDVBN46A, CDVBN60*
Grupo XXXIII	CDVBN65*
Grupo XXXIV	CDVBN49*
Grupo XXXV	CDVBN28*
Grupo XXXVI	CDVBN2, CDVBN4*
Grupo XXXVII	CDVBN8*
Grupo XXXVIII	CDVBN41*, CDVBN45
Grupo XXXIX	CDVBN38*, CDVBN39, CDVBN37
Grupo XL	CDVBN26*
Grupo XLI	CDVBN22*
Grupo XLII	CDVBN23*
Grupo XLIII	CDVBN59*, CDVBN63, CDVBN67

Grupo XLIV	CDVBN42*, CDVBN43, CDVBN44
Grupo XLV	CDVBN78*
Grupo XLVI	CDVBN29*, CDVBN34
Grupo XLVII	CDVBN53*, CDVBN73
Grupo XLVIII	CDVBN57*, CDVBN61
Grupo XLIX	CDVBN51*
Grupo L	CDVBN54, CDVBN55, CDVBN58, CDVBN68*
Grupo LI	CDVBN81*
Grupo LII	CDVBN89*
Grupo LIII	CDVBN77*
Grupo LIV	CDVBN83*
Grupo LV	CDVBN72*
Grupo LVI	CDVBN6*

4. Análisis del gen ribosómico ARNr 16S.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su uso comenzó en 1977 con la propuesta y estudios de Carl Woese y George Fox (Woese y Fox, 1977).

El gen ARNr 16S se utiliza para estudios filogenéticos ya que su secuencia está altamente conservada y lo suficientemente diferenciada para distinguir diferentes especies. Así pues, la comparación de las secuencias de los ARNr 16S nos permite establecer relaciones filogenéticas existentes entre bacterias. Según Rodicio y Mendoza, (2013) el gen ARNr 16S tiene enormes repercusiones en la taxonomía bacteriana, ya que da lugar a un sistema de clasificación vigente que permite la identificación rápida y precisa de los aislados bacterianos.

Por tanto, debido a la gran diversidad encontrada en la caracterización de nuestros aislados se decidió secuenciar el gen ribosómico ARNr 16S de al menos un representante de cada grupo. Se secuenció este gen en cada uno de los aislados seleccionados. En total se analizó la secuencia del ARNr 16S de los 125 seleccionados, las cuales fueron comparadas con las secuencias de las cepas tipo depositadas en las bases de datos públicas como la del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* y *EzBioCloud* (Yoon et al., 2017), así pues, se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 42, 43, 44 y 45. Como se puede apreciar todos los valores de similitud se encontraban en un rango de 97 – 100%.

Tabla 42: Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en un suelo procedente de San Cristóbal de la Cuesta con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas.

Cepa	Grupo de RAPD	Cepa tipo más próxima	Similitud (%)
SCCPVE11	I	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T	99,9
SCCPVE12	II	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8
SCCPV30	III	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358 ^T	100

SCCPVE13	IV	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358 ^T	100
SCCPV04	V	<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	100
SCCPV32	VI	<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	99,9
SCCPVE01	VII	<i>Domibacillus robiginosus</i> WS 4628 ^T	98,8
SCCPVE10	VIII	<i>Bacillus niacini</i> IFO 15566 ^T	99,3
SCCPV26	IX	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,9
SCCPVE04	X	<i>Bacillus simplex</i> JCM 12307 ^T	99,9
SCCPV03	XI	<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	99,9
SCCPVE09	XII	<i>Bacillus firmus</i> ATCC 14575 ^T	100
SCCPV20	XIII	<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	99,9
SCCPV06	XIV	<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSO 671 ^T	99,9
SCCPV07	XV	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,9
SCCPV28	XVI	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,9
SCCPV29	XVII	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,9
SCCPV01	XVIII	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8
SCCPVE05	XIX	<i>Bacillus simplex</i> JCM 12307 ^T	100
SCCPVE07	XX	<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC 25096 ^T	100
SCCPVE08	XXI	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 ^T	99,6

Tabla 43: Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en un suelo procedente de Machacón con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas.

Cepa	Grupo de RAPD	Especie tipo más próxima	Similitud (%)
MACPVE02	I	<i>Bacillus aryabhattai</i> JCM 13839 ^T	99,9
MACPVE04	II	<i>Bacillus aryabhattai</i> JCM 13839 ^T	100
MACPVE01	III	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8
MACPVE09	IV	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,9
MACPVE10	V	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> NRRL B-51090 ^T	99,5
MACPV15	VI	<i>Bacillus aryabhattai</i> JCM 13839 ^T	99,9
MACPV35	VII	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8
MACPV29	VIII	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	99,9
MACPV25	IX	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100
MACPV26	X	<i>Rhizobium lentis</i> BRL27 ^T	100
MACPV31	XI	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8
MACPV04	XII	<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T	99,9
MACPV12	XIII	<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	100
MACPV23	XIV	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,9
MACPVE06	XV	<i>Bacillus firmus</i> ATCC 14575 ^T	100
MACPV10	XVI	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,9
MACPV40	XVII	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	99,9
MACPV36	XVIII	<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T	99,9
MACPV28	XIX	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T	99,9
MACPV09	XX	<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSO 671 ^T	100
MACPV39	XXI	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8
MACPV17	XXII	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	100
MACPV37	XXIII	<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	100
MACPV06	XXIV	<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 003386 ^T	100
MACPV18	XXV	<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	100

MACPV20	XXVI	<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T	100
MACPV41	XXVII	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	100
MACPV27	XXVIII	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ^T	99,8

Tabla 44: Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en un suelo procedente de Peleas de Arriba con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas.

Cepa	Grupo de RAPD	Especie tipo más próxima	Similitud (%)
PDABN5	I	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194 ^T	99,9
PDABN18	II	<i>Flavobacterium pectinovorum</i> DSM6368 ^T	99,1
PDABN27	III	<i>Staphylococcus cohnii subsp. cohnii</i> ATCC 29974 ^T	100
PDABN3	IV	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194 ^T	99,9
PDABN26	V	<i>Bosea lathyri</i> DSM 26656 ^T	99,2
PDABN9	VI	<i>Acidovorax radialis</i> N35 ^T	99,7
PDABN19B	VII	<i>Bacillus siamensis</i> PD-A10 ^T	99,9
PDABN1	VIII	<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936 ^T	100
PDABN24A	IX	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 ^T	99,4
PDABN29	X	<i>Bacillus safensis</i> FO-36B ^T	99,9
PDABN19A	XI	<i>Shinella kummerowiae</i> CCBAU 25048 ^T	98,5
PDABN21B	XII	<i>Agrobacterium nepotum</i> 39/7 ^T	100
PDABN22B	XIII	<i>Agrobacterium nepotum</i> 39/7 ^T	100
PDABN23	XIV	<i>Shinella kummerowiae</i> CCBAU 25048 ^T	98,8
PDABN32	XV	<i>Shinella kummerowiae</i> CCBAU 25048 ^T	98,8
PDABN14	XVI	<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936 ^T	100
PDABN20	XVII	<i>Neorhizobium alkalisoli</i> CCBAU 01393 ^T	99,8
PDABN25	XVIII	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 ^T	99,8
PDABN28	XIX	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T	99,6
PDABN23A	XX	<i>Shinella kummerowiae</i> CCBAU 25048 ^T	98,8

Tabla 45: Porcentaje de similitud entre las secuencias de los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en un suelo procedente de Castellanos de Villiquera con las secuencias del ARNr 16S de las cepas tipo más próximas depositadas en las bases de datos públicas.

Cepa	Grupo de RAPD	Especie tipo más próxima	Similitud (%)
CDVBN90	I	<i>Nocardioides cavernae</i> YIM A1136 ^T	99,8
CDVBN102	II	<i>Micromonospora coxensis</i> DSM 45161 ^T	99,9
CDVBN84	III	<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545 ^T	98,7
CDVBN46B	IV	<i>Massilia suwonensis</i> 5414S-25 ^T	99,0
CDVBN62	V	<i>Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum</i> DBK11 ^T	99,8
CDVBN71	VI	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,9
CDVBN47	VII	<i>Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum</i> DBK11 ^T	99,8
CDVBN91	VIII	<i>Bacillus niacini</i> IFO 15566 ^T	99,4
CDVBN92B	IX	<i>Agromyces ramosus</i> DSM 43045 ^T	99,5
CDVBN100	X	<i>Isoptericola nanjingensis</i> H17 ^T	97,4
CDVBN21	XI	<i>Pseudomonas brassicacearum subsp.</i>	99,9

		<i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	
CDVBN31	XII	<i>Variovorax paradoxus</i> NBRC 15149 ^T	99,5
CDVBN10	XIII	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	99,9
CDVBN13	XIV	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> DBK11 ^T	99,7
CDVBN25	XV	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> DBK11 ^T	99,8
CDVBN1	XVI	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	99,8
CDVBN20	XVII	<i>Pseudomonas orientalis</i> CFML96-170 ^T	99,8
CDVBN18	XVIII	<i>Pseudomonas baetica</i> A39 ^T	99,8
CDVBN66	XIX	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN98	XX	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	99,6
CDVBN16	XXI	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194 ^T	99,9
CDVBN33	XXII	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> LMG 27359 ^T	99,4
CDVBN32	XXIII	<i>Herbaspirillum lusitanum</i> LMG 21710 ^T	99,5
CDVBN50	XXIV	<i>Microbacterium yannicii</i> G72 ^T	100
CDVBN9	XXV	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 ^T	100
CDVBN19	XXVI	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 ^T	99,9
CDVBN69	XXVII	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	99,9
CDVBN3	XXVIII	<i>Pseudomonas orientalis</i> CFML96-170 ^T	99,7
CDVBN40	XXIX	<i>Massilia neuiana</i> PTW21 ^T	99,2
CDVBN52	XXX	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	99,8
CDVBN64	XXXI	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	99,8
CDVBN60	XXXII	<i>Arthrobacter humicola</i> KV-653 ^T	99,7
CDVBN65	XXXIII	<i>Pseudomonas orientalis</i> CFML96-170 ^T	99,9
CDVBN49	XXXIV	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	99,6
CDVBN28	XXXV	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN4	XXXVI	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,9
CDVBN8	XXXVII	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN41	XXXVIII	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN38	XXXIX	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN26	XL	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> ATCC 49054 ^T	99,8
CDVBN22	XLI	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN23	XLII	<i>Pseudomonas baetica</i> A390 ^T	99,8
CDVBN59	XLIII	<i>Herbaspirillum lusitanum</i> LMG 21710 ^T	100
CDVBN42	XLIV	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	99,6
CDVBN78	XLV	<i>Devosia psychrophila</i> Cr7-05 ^T	99,1
CDVBN29	XLVI	<i>Clavibacter capsici</i> LMG 29047 ^T	99,9
CDVBN53	XLVII	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	99,6
CDVBN57	XLVIII	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	99,6
CDVBN51	XLIX	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	99,6

CDVBN68	L	<i>Bacillus aryabhattai</i> JCM 13839 ^T	99,9
CDVBN81	LI	<i>Acinetobacter johnsonii</i> ATCC 17909 ^T	99,5
CDVBN89	LII	<i>Microbacterium yannicii</i> DSM 23203 ^T	99,0
CDVBN77	LIII	<i>Microvirga aerophila</i> KACC 12743 ^T	97,6
CDVBN83	LIV	<i>Sphingomonas faeni</i> DSM 14747 ^T	99,8
CDVBN72	LV	<i>Nocardioides cavernae</i> YIM A1136 ^T	99,4
CDVBN6	LVI	<i>Brevibacterium frigiditolerans</i> ATCC 25097 ^T	99,9

5. Análisis del culturoma de nódulos de *P. vulgaris* L. y raíces de *B. napus* L.

Tras el análisis de los amplicones obtenido para los nódulos de alubia, el patrón elegido para la selección de las cepas bacterianas aisladas fue la elección de colonias de aspecto mucoso y color blanquecino, morfología descrita en las especies de la familia Rhizobiaceae. Sin embargo, tras el análisis de la biodiversidad obtenida del culturoma se observó que no todos los aislados pertenecían al género *Rhizobium*, encontrándose también especies, con morfología similar, las cuales pertenecían a los géneros *Bacillus*, *Domibacillus* y *Paenibacillus* (tabla 46).

Tabla 46: Biodiversidad bacteriana obtenida de los aislados de nódulos de alubia de ambos municipios. Se detalla el filo, el género y las especies a las cuales pertenecen las 85 cepas.

Nº cepas	Filo	Género	Especies
47	Proteobacteria	<i>Rhizobium</i>	<i>R. radiobacter</i> , <i>R. sophorae</i> , <i>R. pisi</i> , <i>R. fabae</i> , <i>R. ecuadorensis</i> , <i>R. leguminosarum</i> , <i>R. laguerreae</i> , <i>R. lentis</i> y <i>R. anhuiense</i>
36	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. paralicheniformis</i> , <i>B. niacini</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. halotolerans</i> , <i>B. aryabhattai</i> , <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. oceani</i>
1	Firmicutes	<i>Domibacillus</i>	<i>D. robiginosus</i>
1	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. xylanexedens</i>

El 55 % de los aislados pertenecen al filo Proteobacteria y en concreto a especies del género *Rhizobium*: *R. radiobacter*, *R. sophorae*, *R. pisi*, *R. fabae*, *R. ecuadorensis*, *R. leguminosarum*, *R. laguerreae*, *R. lentis* y *R. anhuiense*. El 45 % restante pertenece al filo Firmicutes y en concreto a las especies *Bacillus subtilis*, *B. paralicheniformis*, *B. niacini*, *B. simplex*, *B. firmus*, *B. halotolerans*, *B. aryabhattai*, *B. thuringiensis*, *B. oceani*, *Domibacillus robiginosus* y *Paenibacillus xylanexedens*.

En base a los análisis realizados encontramos que en los nódulos cohabitan al menos 20 especies distintas, aunque el género mayoritario es *Rhizobium*, en base al patrón utilizado para el proceso de aislamiento. Estos resultados concuerdan con los estudios publicados que analizan la diversidad bacteriana del interior de nódulos de *P. vulgaris* L.

En el trabajo realizado por Díaz-Alcántara et al., (2014) el 100 % de los aislados, también en medio YMA, pertenecían al género *Rhizobium*. Mwenda et al., (2018) también obtuvieron aislados pertenecientes a las especies *Rhizobium anhuiense*, *R. sophorae*, *R. fabae*, *R. ecuadorensis*, *R. leguminosarum*, *R. laguerreae* y *R. lentis*. El 44% de los aislados por Kawaka et al., (2018) pertenecían al género *Rhizobium*, siendo este el mayoritario, seguido por los géneros *Klebsiella*, *Bacillus* y *Pantoea*.

Los estudios de biodiversidad muestran la capacidad de bacterias tipo endófitas para convivir en el interior de nódulos de diferentes leguminosas. En la bibliografía encontramos ejemplos muy diversos, como el realizado por Deng et al., (2011) que aislaron 115 cepas de nódulos de *Sphaerophysa salsula* Pall., las cuales pertenecen a 25 especies diferentes. El 44 % eran bacterias fijadoras de nitrógeno identificadas en los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Ensifer*, pero el 56 % pertenecían a cepas de géneros tan dispares como *Paracoccus*, *Inquilinus*, *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Serratia* y *Staphylococcus*.

Estos resultados concuerdan con los descritos para especies pertenecientes al género *Paenibacillus*. Valverde et al., (2010) aislaron la especie *P. prosopidis* en nódulos de la leguminosa *Prosopis farcta* J.F. También en medio de cultivo TSA, Costa et al., (2012) aislaron de alubia las especies *P. cineris* y *P. lautus*, pero en vez de los nódulos, fueron aisladas de muestras de hojas. Por tanto, esta la primera vez que se describe el aislamiento de la especie *P. xylanexedens* en nódulos de leguminosas.

Finalmente, comparando los resultados obtenidos en la secuenciación de amplicones y los aislados, se observa que en ambas técnicas el género más abundante es *Rhizobium*, cumpliendo así con el objetivo inicial y prioritario del aislamiento. Sin embargo, y como es normal, con el primer método se han obtenido secuencias pertenecientes a otros géneros como *Methylothermobacter*, *Sphingomonas* o *Novosphingobium* en ambas localizaciones de muestreo y, no se han obtenido cepas aisladas de esos géneros en ninguna de las dos localizaciones, debido al sesgo mencionado anteriormente.

Respecto a los géneros *Bacillus*, *Domibacillus* y *Paenibacillus*, con representaciones destacables en el culturoma, se observa que no aparecen en la secuenciación de amplicones de las dos localizaciones. Sin embargo, se debe mencionar la existencia de un porcentaje de secuencias “*unidentified*”. Estos resultados resaltan la importancia de combinar técnicas culturómicas y metagenómicas en estudios de biodiversidad, ya que mientras las cepas aisladas se pueden identificar mejor, las secuencias de amplicones nos permiten averiguar aquellas especies que no pueden crecer en condiciones de laboratorio, bien porque otras especies son capaces de inhibir o bien por el sesgo cometido en el proceso de aislamiento (Jiménez-Gómez et al., en revisión).

Cabe destacar que los recientes estudios metagenómicos de nódulos de leguminosas demuestran que existe una gran variedad de especies bacterianas y que son complementarios a los estudios del culturoma, ya que mientras que la secuenciación exclusiva del culturoma representa de una manera desproporcionada los taxones más susceptibles de cultivo *in vitro* (Johnson, 2019), multitud de autores han demostrado que indudablemente es necesaria la secuenciación y análisis metagenómico de los nódulos, con el fin de evitar los posibles sesgos inherentes, mencionados anteriormente (Hakim et al., 2018; Hartman et al., 2017) y poder completar así el estudio de la biodiversidad en las muestras.

En cuanto al análisis del culturoma de raíces de colza se observa la existencia de 39 especies diferentes pertenecientes a 27 géneros distintos. A nivel de filo, 72 cepas de las 112 aisladas pertenecen al filo Proteobacteria. El siguiente filo en abundancia es Actinobacteria, con 27 cepas, seguido del filo Firmicutes con 12 cepas y el filo Bacteroidetes con un único aislado del género *Flavobacterium*. Los géneros dominantes fueron *Pseudomonas*, *Pseudoarthrobacter* y *Bacillus*, con 49, 12 y 10 cepas aisladas, respectivamente (tabla 47).

Tabla 47: Biodiversidad bacteriana obtenida de los aislados de raíces de colza de ambos municipios. Se detalla el filo, el género y las especies a las cuales pertenecen las 112 cepas.

Nº cepas	Filo	Género	Especies
49	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. baetica</i> , <i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> , <i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>neurantiaca</i> , <i>P. orientalis</i> y <i>P. thivervalensis</i> ,
5	Proteobacteria	<i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>
4	Proteobacteria	<i>Herbaspirillum</i>	<i>H. lusitanum</i>
2	Proteobacteria	<i>Neorhizobium</i>	<i>N. alkalisoli</i>
2	Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	<i>A. nepotum</i>
2	Proteobacteria	<i>Massilia</i>	<i>M. suwonensis</i> y <i>M. yuzhufengensis</i>
1	Proteobacteria	<i>Bosea</i>	<i>B. lathyri</i>
1	Proteobacteria	<i>Devosia</i>	<i>D. psychrophila</i>
1	Proteobacteria	<i>Microvirga</i>	<i>M. brassicacearum</i>
1	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. faeni</i>
1	Proteobacteria	<i>Acidovorax</i>	<i>A. radialis</i>
1	Proteobacteria	<i>Variovorax</i>	<i>V. paradoxus</i>
1	Proteobacteria	<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri</i>
1	Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	<i>A.r johnsonii</i>
12	Actinobacteria	<i>Pseudoarthrobacter</i>	<i>P. oxydans</i> y <i>P. siccitolerans</i>
3	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>A. humicola</i> y <i>A. pascens</i>
3	Actinobacteria	<i>Nocardioides</i>	<i>N. cavernae</i>

2	Actinobacteria	<i>Clavibacter</i>	<i>C. capsici</i>
2	Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>	<i>M. yannicii</i>
1	Actinobacteria	<i>Isoptericola</i>	<i>I. nanjingensis</i>
1	Actinobacteria	<i>Dermacoccus</i>	<i>D. nishinomiyaensis</i>
1	Actinobacteria	<i>Agromyces</i>	<i>A. ramosus</i>
1	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	<i>M. yunnanensis</i>
1	Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>	<i>M. coxensis</i>
10	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>B. aryabhatai</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. niacini</i> , <i>B. safensis</i> , <i>B. siamensis</i> y <i>B. simplex</i> .
2	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. cohnii subsp. cohnii</i>
1	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i>	<i>F. pectinovorum</i>

Los resultados obtenidos muestran una amplia diversidad de las bacterias endofíticas de *B. napus* L. Aislados de géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Acidovorax*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Devosia* y *Flavobacterium* ya han sido identificados como endófitos de colza previamente (Dunfield, 2002; Germida et al., 1998; Granér et al., 2003; Rape et al., 2017; Sheng et al., 2008; Zhang et al., 2011), mientras que géneros como *Micromonospora*, *Massilia*, *Bosea*, *Shinella* y *Agromyces* han sido descritos por encontrarse solamente en la rizosfera de plantas de este cultivo (Croes et al., 2013; Larcher et al., 2008; Lay et al., 2018; Montalbán et al., 2016).

Sin embargo, hasta la fecha, y resultado de la presente Tesis Doctoral, es la primera vez que se describen especies pertenecientes a los géneros *Neorhizobium*, *Microvirga*, *Herbaspirillum*, *Dermacoccus*, *Nocardioides*, *Isoptericola*, *Pseudoarthrobacter*, *Clavibacter* y *Shigella* como endófitos de *B. napus* L. (Jiménez-Gómez et al., en revisión), aunque especies de géneros como *Neorhizobium*, *Microvirga* y *Herbaspirillum* ya han sido descritas por sus mecanismos PGPR y sus interacciones simbióticas con diferentes especies vegetales (Chen et al., 2016; Dall'Asta et al., 2019; Msaddak et al., 2017).

Comparando los resultados obtenidos de la secuenciación de amplicones y los aislados cultivables, se observa que en ambas técnicas el género más abundante es *Pseudomonas*. Sin embargo, con el primer método se han obtenido secuencias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae en ambas localizaciones de muestreo y, realmente solo se han obtenido cepas aisladas de esa familia en la localización de Peleas de Arriba. Esto se debe a que, al igual que en el aislamiento de los nódulos, pueda existir alguna inhibición por parte de otros aislados (Puspita et al., 2012).

El mismo caso ocurre para especies del género *Methylothera*, las cuales se han detectado en el análisis de amplicones de las muestras de Peleas de Arriba pero no en el culturoma de ese municipio. Al igual que los géneros *Devosia* y *Sphingomonas*, cuyas

secuencias aparecen en el análisis de amplicones de ambos municipios y, sin embargo, sólo aparecen entre los aislados de Castellanos de Villiquera (CDVBN78 y CDVBN83, respectivamente).

Los resultados de la metagenómica muestran un porcentaje significativo de especies del género *Rhizobium*, sin embargo, son sólo dos cepas del género *Neorhizobium* las que aparecen en el culturoma. Esta diferencia puede deberse a que con la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S completo de los aislados se obtiene información más precisa que con las regiones parciales analizadas del mismo gen en el ensayo metagenómico (Earl et al., 2018).

Respecto a los géneros *Bacillus* y *Pseudoarthrobacter* con mayores representaciones en el culturoma, se destaca que no aparecen en la secuenciación de amplicones. Sin embargo, al igual que en el análisis de los aislados de alubia, hay que resaltar la existencia de secuencias “*unidentified*” y la alta diferencia descrita entre la biodiversidad con métodos de secuenciación de amplicones de ADN obtenidos a partir de ADN total de la muestra y la biodiversidad descrita con las cepas cultivadas, ya que los procesos de aislamiento bacteriano inevitablemente, ya sea por las condiciones de cultivo o los medios seleccionados, sesgan la diversidad obtenida (Puspita et al., 2012).

La ubicuidad de las cepas aisladas pertenecientes al género *Pseudomonas*, tanto en ambos municipios de muestreo como en ambos análisis realizados, informa sobre la amplia interacción entre la especie vegetal *B. napus* y este género bacteriano. Por tanto, con el fin de continuar analizando y ahondando en la interacción entre este cultivo y la comunidad bacteriana asociada, se tenderá a aportar un especial interés en alguna de las cepas aisladas pertenecientes a este género. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos PGPR *in vitro* e *in sílico*, los cuales se presentan y analizan en capítulos posteriores de la presente Tesis Doctoral.

Cabe destacar, que tanto en los nódulos de *P. vulgaris* como en las raíces de *B. napus*, se han aislado cepas cuyas secuencias del gen ribosómico ARNr 16S en comparación con las depositadas en las bases de datos públicas, presentan amplias diferencias significativas y por tanto, valores correspondientes a nuevas especies aun sin describir.

Así pues, a continuación se adjunta la descripción de la cepa *Microvirga brassicacearum* CDVBN77^T como nueva especie (Jiménez-Gómez et al., 2019), ya que presentó, junto a otras de las cepas aisladas, uno de los menores valores de similitud.

6. *Microvirga brassicacearum* sp. nov. especie aislada del interior de las raíces de *Brassica napus* L.

Hasta la fecha el género *Microvirga*, un género bacteriano cosmopolita, comprende 17 especies diferentes, las cuales han sido aisladas de una amplia variedad

de fuentes como heces humanas, muestras de aire, aguas termales, suelos contaminados o nódulos de leguminosas (Caputo et al., 2016; Kanso y Patel, 2003; Safronova et al., 2006; Wang et al., 2019; Weon et al., 2010).

Además, algunos estudios demuestran el potencial genético de las bacterias pertenecientes a este género en actividades como la oxidación de elementos, como el arsenito, o el interés en la producción de pigmentos o amilasas (Tapase et al., 2017).

A continuación, se presenta la descripción y caracterización, tanto genotípica como fenotípica, de la cepa CDVBN77.

6.1 Caracterización genotípica.

En primer lugar, se realizó un análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S, tanto de la cepa CDVBN77, como del resto de las especies del género *Microvirga* (figura 17).

En el árbol filogenético obtenido, se pueden observar las diferencias con las cepas más próximas. Se establecen como cepas más próximas las cepas tipo *Microvirga flavescens* c27j1^T, *Microvirga aerophila* DSM 21344^T y *Microvirga subterranea* DSM 14364^T.

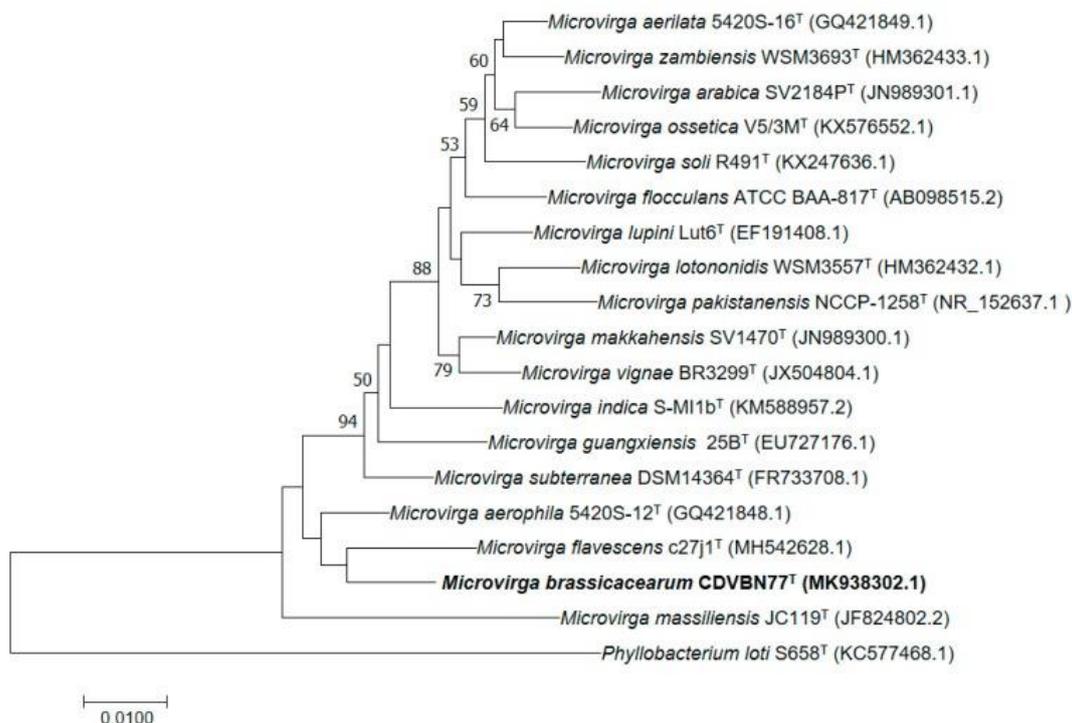


Figura 17: Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining a partir de las secuencias del gen ARN ribosómico 16S que muestra la relación entre la cepa CDVBN77^T y el resto de las especies del género *Microvirga*. La significancia de cada rama se indica mediante un porcentaje calculado con 1000 repeticiones, mostrando solo aquellos valores que fueron

superiores al 50%. La escala indica una sustitución de nucleótidos por cada 100. Adaptado de Jiménez-Gómez et al., (2019).

6.1.1 Análisis del genoma y búsqueda de genes con potencial interés.

El genoma de *M. brassicacearum* CDVBN77^T tiene 5.221.427 pares de bases, distribuidas en 88 contigs, con un 62.2% de contenido en G+C (figura 18).

El programa RAST consiguió anotar 5244 regiones codificantes (CDS). El análisis de la cepa CDVBN77^T revela el contenido de genes involucrados en múltiples mecanismos PGP, muchos de ellos relacionados con la aportación de nutrientes a la planta. Esta cepa contiene genes que codifican enzimas involucradas en la solubilización de potasio o fosfatos, como fosfatasa. Además, se muestran genes que codifican proteínas de transporte celular para estos elementos. También se detectan genes *fix* y *nif*, relacionados con la síntesis de nitrógeno asimilable.

Se identifican genes pertenecientes a enzimas relacionadas en la degradación y modificación de enlaces glicosídicos de diferentes tipos: a) Glicosidasas (GHs), 30 genes en 15 familias diferentes cuya función es hidrolizar el enlace glicosídico entre dos azúcares; b) Glicosiltransferasas (GTs), relacionadas con la formación de enlaces glicosídicos, 46 genes en 11 familias; c) Polisacárido liasas (PLs), dos genes en dos familias y Carbohidrato esterasas (CEs) 22 genes en 6 familias encargadas de hidrolizar los esteres carbohidratos.

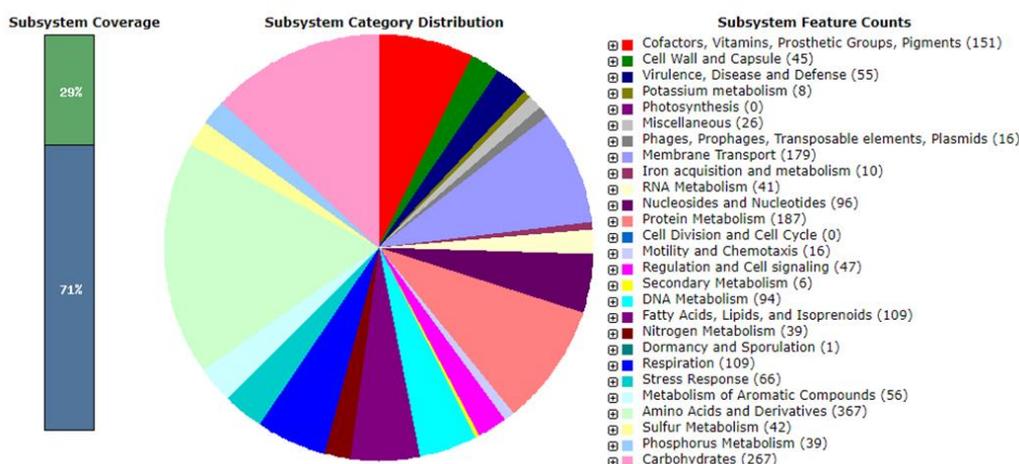


Figura 18: Representación gráfica de la anotación automática y el análisis funcional mediante RAST del genoma de *Microvirga brassicacearum* CDVBN77^T.

Las principales enzimas que actúan en la ruptura lignocelulósica son las GH, en el genoma encontramos las que pertenecen a las familias 1, 2, 3, 15, 16, 23, 25, 31, 63, 102, 103, 105, 108, 109 y 113. Involucrada con una hidrólisis vegetal específica, dentro de la familia GH-1 encontramos las enzimas β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), exoglucanasas (EC 3.2.1.74) y 1,4- β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), dos genes pertenecientes

a la familia GH-2, α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y 1,4- β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), dos genes pertenecientes a la familia GH-3, β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), exoglucanasas (EC 3.2.1.74), 1,4- β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) y α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55). Las enzimas β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) y exoglucanasas (EC 3.2.1.74) pertenecen al complejo celulasa y las enzimas 1,4- β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) y α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) están implicadas en la hidrólisis de la hemicelulosa.

La presencia de los genes descritos anteriormente sugiere que la cepa CDVBN77^T, además de establecer una interacción beneficiosa con su hospedador puede tener potencial biotecnológico para la producción de enzimas encargadas de la descomposición de la biomasa lignocelulósica.

6.2 Caracterización fenotípica.

La cepa CDVBN77^T es capaz de hidrolizar β -D-galactosa (esculina) y producir β -galactosidasa, sin embargo, no fue capaz de fermentar D-glucosa ni de hidrolizar arginina, urea ni gelatina. La reducción de nitrato a nitrito fue positiva. La asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, D-maltosa, gluconato potásico, ácido málico y citrato trisódico fue positiva. La asimilación de D-manosa, ácido cáprico, ácido adípico y ácido fenilacético fue negativa. La cepa CDVBN77^T mostró actividad positiva en las enzimas alcalina fosfatasa, esterasa, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, tripsina, fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, pero no se observó actividad en las enzimas lipasa, valina arilamidasa, cisteína arylamidasa, α -quimiotripsina, α -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, α -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidase, α -manosidasa y α -fucosidasa.

6.3 Caracterización quimiotaxonómica.

Desde que en 1963 Abel et al., (1963) utilizaran por primera vez la composición química bacteriana para la clasificación de microorganismos, las investigaciones en el uso de los ácidos grasos han aumentado enormemente, entre estos avances se encuentra la creación de librerías para la identificación y comparación quimiotaxonómica de las especies (De Carvalho y Caramujo, 2018).

La gran diversidad y especificidad taxonómica de los ácidos grasos en procariontes es lo que confiere que estos se puedan usar como un sistema complementario en la identificación bacteriana (De Carvalho y Caramujo, 2014).

Los ácidos grasos celulares se analizaron mediante el Sistema de Identificación Microbiana (ID Microbial) Sherlock 6.1 y la biblioteca RTSBA6, en base a las técnicas proporcionadas por este sistema (Sasser, 1987). Los resultados obtenidos del análisis de ácidos grasos de la cepa CDVBN77^T fueron comparados con los estudiados para las especies tipo cercanas (tabla 48).

Tabla 48: Composición de ácidos grasos de la cepa CDVBN77 y de las especies tipo más cercanas del género *Microvirga*. 1, CDVBN77^T; 2, *Microvirga flavescens* c27j1^T; 3, *Microvirga aerophila* DSM 21344^T; *Microvirga subterranea* DSM 14364^T. Adaptado de Jiménez-Gómez et al., (2019).

Fatty Acid	1	2	3	4
C _{16:0}	9.2	4.8	6.6	7.6
C _{17:0}	-	-	0.8	7.5
C _{18:0}	6.1	2.0	3.1	5.5
C _{17:0} cyclo	3.8	3.5	2.1	0.8
C _{19:0} cyclo ω8c	24.3	57.7	11.8	27.9
C _{20:2} ω6,9c	-	1.1	0.4	1.1
11-Methyl C _{18:1} ω7c	4.2	1.5	0.4	1.5
C _{18:0} 3-OH	1.7	2.1	1.1	1.7
Summed feature 2	4.5	5.0	1.4	3.2
Summed feature 3	4.5	1.1	5.2	1.1
Summed feature 8	39.3	18.5	64.8	38.5

Como se puede observar los mayoritarios son C_{19:0} ciclo ω 8c y el conjunto denominado *summed feature 8* (C_{18:1} ω 6c /C_{18:1} ω 7c).

Los resultados obtenidos en la caracterización genotípica, fenotípica y quimiotaxonómica de la cepa CDVBN77, nos permiten concluir que pertenece a una especie nueva del género *Microvirga*, cuya descripción se expone en el siguiente apartado.

6.4 Descripción de *Microvirga brassicacearum* sp. nov.

Microvirga brassicacearum (bras.si.ca.ce.a«rum. M.L. fem. pl. gen. n. *brassicacearum*, relacionado con su aislamiento en el rizoplano de plantas del género *Brassica*) (Jiménez-Gómez et al., 2019).

Las células son bacilos gram-negativos aerobios cuyo tamaño varía entre 1,2 – 1,5 μm de largo y 0,7 – 0,9 μm de ancho. Las colonias crecidas en el medio de cultivo 869 (1/10) son circulares, transparentes y planas, con un tamaño aproximado de 0.1-0.4 mm de diámetro, tras siete posteriores a su incubación a 28 °C. Su temperatura óptima de crecimiento es de 28 °C, en un rango de 12 a 37 °C y su pH óptimo es de 7, en un rango de 6 a 10. Se observó crecimiento en presencia de hasta el 1,5 % (w/v) de NaCl en medio 869 (1/10) líquido.

Los principales lípidos polares son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. El análisis de quinonas mostró que la cepa CDVBN77 contiene ubiquinona-10 (Q-10)

como quinona mayoritaria. Los resultados obtenidos del análisis de ácidos grasos de la cepa CDVBN77 mostraron que los mayoritarios son C_{19:0} ciclo ω 8c y el conjunto formado por C_{18:1} ω 6c y C_{18:1} ω 7c.

La cepa CDVBN77^T es capaz de hidrolizar β -D-galactosa y producir β -galactosidasa, además de asimilar D-glucosa, L-arabinosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, D-maltosa, gluconato potásico, ácido málico y citrato trisódico. La actividad enzimática es positiva para las enzimas alcalina fosfatasa, esterasa, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, tripsina, fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.

Por tanto, en base a las pruebas fenotípicas, genotípicas y a la quimiotaxonomía se establece la cepa *Microvirga brassicacearum* CDVBN77^T (Jiménez-Gómez et al., 2019) como una nueva especie del género *Microvirga*, cuyas especies tipo más próximas son *Microvirga flavescens* c27j1^T aislada de suelo forestal (Zhang et al., 2019); *Microvirga aerophila* DSM 21344^T aislada de muestras de aire (Weon et al., 2010), y por último *Microvirga subterranea* DSM 14364^T aislada de un acuífero termal (Kanso y Patel, 2003).

Por tanto, en este primer capítulo de la presente Tesis Doctoral los resultados nos muestran la abundante y diversa población de bacterias endófitas encontrada en nódulos y raíces de las especies vegetales *Phaseolus vulgaris* L. y *Brassica napus* L., respectivamente. Además, el tejido interno de la colza puede ser una fuente de nuevas especies por describir, que, junto a su caracterización fenotípica, genotípica y quimiotaxonomía ofrece a la comunidad científica la posibilidad de conocer su uso y utilidad en la agricultura, ya sea como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, protección frente a posibles patógenos o protección frente a una amplia variedad de estreses, tanto abióticos como bióticos.

Multitud de artículos y estudios científicos describen los mecanismos directos e indirectos por los cuales las bacterias son capaces de promover el crecimiento de las plantas y mejorar la calidad de los cultivos (Bhattacharyya y Jha, 2012). Entre los mecanismos directos encontramos la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales o la producción de fitohormonas (García-Fraile et al., 2017). Por otro lado, entre los mecanismos indirectos, se encuentra la biosíntesis de enzimas extracelulares, el biocontrol, la reducción de la susceptibilidad a estreses y los cambios en las propiedades físico-químicas de la rizosfera (Martínez-Viveros et al., 2010; Richardson et al., 2009; Upadhyay et al., 2012).

Aunque estas propiedades PGP han sido estudiadas de forma amplia en aquellas bacterias utilizadas en las interacciones planta-microorganismo en condiciones de laboratorio, el avance en la secuenciación genómica ha permitido realizar avances significativos en el área (Paterson et al., 2017).

Ya que los mecanismos PGP de las bacterias están mediados por la producción de enzimas y metabolitos, el análisis del genoma ofrece la oportunidad de analizar el potencial bacteriano mediante la búsqueda de los genes involucrados en la codificación de dichos enzimas y metabolitos, que, aunque muchas veces no se detecten de manera *in vitro* pueden expresarse en el momento de la interacción con la planta.

De esta forma, en la presente Tesis Doctoral se realizó un estudio de algunos de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal comunes en los aislados de ambas plantas, para posteriormente, en base a estos resultados y la caracterización genotípica previa del capítulo I, seleccionar 4 cepas bacterianas a las que se les realizó un estudio *in silico* de su genoma a través del cual se profundizó en el potencial para promover el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

1. Análisis *in vitro* de los mecanismos PGP.

1.1 Producción de sideróforos.

El hierro es uno de los elementos más importantes en el metabolismo tanto bacteriano como vegetal. Por un lado, se ha descrito como un factor limitante en el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, además de ser cofactor en multitud de rutas metabólicas interviene en procesos fundamentales, como es la síntesis del ADN (Butaitė et al., 2018). En las plantas, el hierro es requerido en la síntesis de la clorofila y en la respiración celular, además, su déficit causa la aparición de zonas amarillentas y blanquecinas en las hojas, las cuales conducen a la muerte de los tejidos foliares (Li et al., 2019).

La cantidad de este elemento en el suelo es destacable, encontrándose en dos formas de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}), siendo esta última la más abundante y menos disponible para las plantas, debido a la formación de óxidos e hidróxidos que limitan su biodisponibilidad (Radzki et al., 2013). La forma ferrosa sólo se encuentra en ambientes anóxicos, ya que en presencia de oxígeno se oxida y se transforma a la forma férrica (Chu et al., 2010).

Para satisfacer esta limitación, tanto plantas como bacterias han desarrollado un sistema de captación de hierro a través de la biosíntesis de sideróforos, compuestos orgánicos capaces de quelar el hierro (Li et al., 2019; Neilands, 2003; Saha et al., 2016). Además de los propios fitosideróforos, la producción de sideróforos por parte de las bacterias es también un mecanismo utilizado por las plantas a través del cual pueden captar el hierro necesario para su desarrollo y metabolismo (Radzki et al., 2013).

En la bibliografía se ha descrito que algunas cepas bacterianas tienen la habilidad además de detectar y utilizar xenosideróforos, que son los sideróforos producidos por otros organismos (Galet et al., 2015).

En este estudio, el análisis de la capacidad de producción de sideróforos por parte de los aislados mostró que en más de un tercio de las cepas analizadas se observaron halos indicadores de producción de sideróforos como los presentes en la figura 19 (tablas 49, 50, 51 y 52).

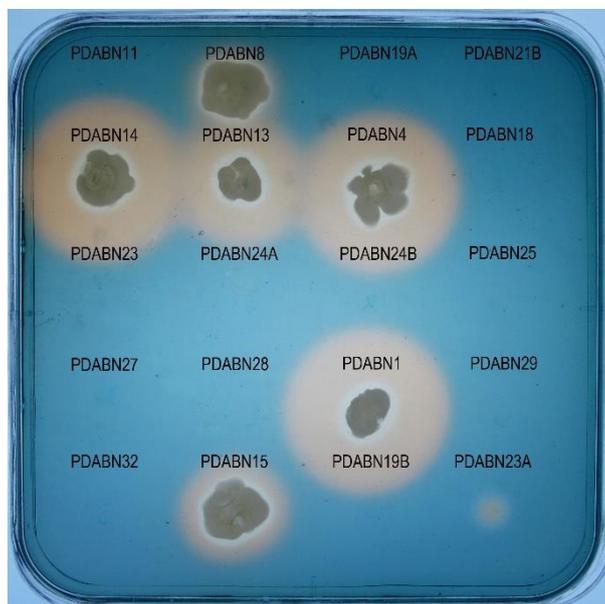


Figura 19: Aislados sembrados en medio M9-Cas-Agar en los que se observa la producción o ausencia de sideróforos.

En los resultados obtenidos se observó que de los 197 aislados, 76 cepas (38.6 %) mostraron capacidad para producir sideróforos, de las cuales 43 cepas (21.8 %) originaban halos de mayor diámetro, sin embargo, 33 cepas (16.8 %) producían halos más pequeños. Finalmente, en un 61.4 % de las cepas no se observó capacidad de producir sideróforos. Si se realiza un análisis por procedencia, de los 85 aislados procedentes de nódulos de alubia sólo 18 (21.2 %) producen halos detectables, mientras que de los 112 aislados de plantas de colza la cifra de positivos se eleva hasta 58, suponiendo un 51.8 % del total.

Entre las cepas que mostraron mayor capacidad para producir sideróforos se encuentran cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (CDVBN70, CDVBN71, CDVBN21, CDVBN10, CDVBN65, CDVBN20), *Bacillus* (SCCPVE07, CDVBN6, CDVBN68),

Pseudoarthrobacter (CDVBN44) y *Rhizobium* (SCCPV30, SCCPVE13, MACPV17, MACPV19, MACPV20).

Aunque la mayoría de los estudios publicados de análisis y producción de sideróforos se hayan realizado con hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* o *Rhizopus* (Saha et al., 2016), hoy en día también se ha descrito la producción de sideróforos por parte, entre otros, de géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Pseudoarthrobacter* (Galet et al., 2015; Ghasemi et al., 2018; Saïdi et al., 2014; Yu et al., 2017).

Kloepper et al., (1980) demostraron la importancia de la producción de sideróforos por parte de bacterias del género *Pseudomonas* en la inhibición del crecimiento de *Erwinia carotovora*. Tras este estudio han sido muchas las investigaciones que establecen una relación directa entre la síntesis de sideróforos y la capacidad para inhibir el crecimiento de otras especies, debido a que la producción de sideróforos por parte de las bacterias beneficiosas disminuye la disponibilidad del hierro, elemento necesario para el patógeno y, por tanto, se reduce su propagación y desarrollo (Sajeed Ali y Vidhale, 2013). Loper y Henkels, (1999) demostraron cómo mutantes incapaces de producir sideróforos, como la pioverdina, redujeron significativamente su capacidad para inhibir el crecimiento de otros patógenos vegetales.

Se ha comprobado también cómo algunos sideróforos inducen la respuesta sistémica de la planta frente a diferentes fitoenfermedades, desembocando en una disminución de los efectos negativos causados (Höfte y Bakker, 2007). Así pues, es imprescindible evaluar esta capacidad en los estudios microbiológicos y su interacción con organismos vegetales.

1.2 Solubilización de fosfato.

Tras el nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente limitante para la producción agrícola, debido, en parte, a la disponibilidad limitada de las formas asimilables por las plantas. Sin embargo, la concentración de fósforo en formas insolubles en el suelo es muy elevada (Merlin et al., 2013). Por esta razón, la búsqueda de microorganismos solubilizadores de fosfato es uno de los pilares clave en el diseño de biofertilizantes bacterianos.

Por este motivo, se decidió analizar la solubilización de fosfato por parte de los aislados a partir de su inoculación en medio Pikovskaya como medio base (Pikovskaya, 1948) y fosfato bicálcico (Ca_2PO_3) como fuente de fósforo.

Los resultados obtenidos muestran que el 31.9 % del total de los aislados fueron incapaces de solubilizar el fosfato del medio y que el 66.5 % presentó una solubilización positiva. Si realizamos un análisis por procedencia de los aislados, 54 cepas de las 85 aisladas de nódulos de alubia (63.5 %) producen halos de solubilización detectables, mientras que de los 112 aislados de plantas de colza esta cifra se eleva hasta 77, suponiendo un 68.7 % del total (figura 20) (tablas 49, 50, 51 y 52).

La mayoría de las cepas que mostraron mayor capacidad para solubilizar fosfato se encuentran dentro del género *Pseudomonas*, incluyendo a las especies *P. thivervalensis* (PDABN2, PDABN3, PDABN4, PDABN6, PDABN7, PDABN8, PDABN13, PDABN15, CDVBN16), *P. brassicacearum* (CDVBN10, CDVBN13, CDVBN64, CDVBN69), *P. baetica* (CDBN4, CDVBN39) y *P. orientalis* (CDBN65).

Otros aislados que presentaron una solubilización positiva y destacable pertenecen a las especies *Bacillus aryabhatai* (MACPV15, CDVBN68) y *Rhizobium fabae* (SCCPV28).

Estos resultados coinciden con los descritos en Pereira y Castro (2014) y Arruda et al., (2013), en estos trabajos se mostró como en los escrutinios de aislados cultivables del interior de plantas de maíz, las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron aquellas que presentaron una mayor capacidad para solubilizar fosfato en placa.



Figura 20: Placa de medio Pikovskaya en la que se observa la solubilización de fosfato por parte de algunos de los aislados de este estudio.

Por otra parte, el género *Bacillus* ha sido ampliamente descrito por ser uno de los géneros bacterianos al que pertenece una multitud de cepas con una importante capacidad para solubilizar fosfato (Ramesh et al., 2014). En la bibliografía encontramos la descripción de especies como; *B. cereus* (Yu et al., 2011); *B. aryabhatai* (Lee et al., 2012); *B. megaterium* (Tao et al., 2008); *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis* (De Freitas et al., 1997).

Varios estudios reportan que la habilidad para solubilizar fosfato por parte de aislados pertenecientes al género *Rhizobium* es común, aunque presentan grandes variaciones según el tipo de sustrato o fuente de fósforo utilizado (Taktek et al., 2015).

1.3 Producción de celulosa.

La capacidad bacteriana para adherirse a superficies biológicas o inorgánicas está determinada por su habilidad para biosintetizar diferentes polisacáridos y proteínas,

entre los que se encuentra la celulosa (Janczarek et al., 2014). Este polisacárido es esencial para la adhesión bacteriana a la superficie radicular. Fue en el grupo de investigación en el cual se ha realizado la presente Tesis Doctoral donde se consiguieron detectar microfibrillas de celulosa por parte de cepas del género *Rhizobium* (Mateos et al., 1995) y se describió su importante implicación en la colonización radicular (Robledo et al., 2008) y formación de biofilms en raíces de trébol y superficies abióticas (Robledo et al., 2012).

Este polisacárido ha sido descrito por su especial relevancia en los procesos de adhesión, aglutinación celular y estabilización de biofilms, todo ello gracias a la creación de redes tridimensionales (Kumar et al., 2007).

Para la clasificación de los distintos niveles de producción de celulosa por parte de los aislados del presente estudio se estableció una escala de coloración que abarcaba desde el rosa pálido al rojo intenso, según los tonos descritos en la “Royal Horticultural Society Color Chart” de la Royal Horticultural Society (1966) (Robledo, 2010). La intensidad de la coloración de las colonias está relacionada con la cantidad de celulosa que forma parte del polisacárido bacteriano producido, debido a la afinidad del Rojo Congo por los enlaces β -1,4 que unen las moléculas de glucosa en la estructura de la celulosa.

Los resultados observados se muestran en las tablas 49, 50, 51 y 52 y, una muestra de las distintas tonalidades de los aislados en la figura 21.



Figura 21: Aislados sembrados en medio de cultivo suplementado con Rojo Congo en los que se observa la diferencia en la producción de celulosa.

Se observó que el 22.8 % del total de los aislados presentaron una producción negativa de celulosa, mientras que el resto (77.2 %) presentó una producción positiva, aunque con diferentes grados de intensidad. En cuanto a los resultados según su procedencia, el 65.8 % de los aislados de nódulos de *Phaseolus vulgaris L.* y el 85.7 % de los aislados de raíces de *Brassica napus L.* presentaron una coloración intensa.

Los aislados que presentaron un color rojizo más intenso corresponden a las especies de los géneros *Rhizobium* (*R. sophorae* MACPV37, *R. laguerreae* MACPV28 y MACPV40, *R. anhuiense* MACPV16 y *R. leguminosarum* MACPV17), *Bacillus* (*B. halotolerans* SCCPVE07), *Paenibacillus* (*P. xylanexedens* MACPVE10), *Pseudoarthrobacter* (*P. siccitolerans* CDVBN33) y *Clavibacter* (*C. capsici* CDVBN34).

1.4 Producción de enzimas líticas de polímeros vegetales.

En los últimos años se ha descrito la importancia de la producción de enzimas líticas de polímeros vegetales por parte de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal y su implicación en la competición de la rizosfera, la utilización de sustratos o la interacción con las plantas (Ruginescu et al., 2018). Así, resulta importante el análisis y evaluación de la producción de estas enzimas capaces de degradar o alterar componentes de la pared celular de las plantas como son las celulasas, las pectinasas o las xilanasas (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011; Reetha et al., 2014; Yang et al., 2011).

La hidrólisis y degradación de los componentes celulares de las plantas aporta a los microorganismos una fuente de carbono excepcional, la cual permite su desarrollo y proliferación en el suelo (Wilson, 2011). Además, la degradación de los componentes celulares constituye una vía de entrada eficaz a la planta por parte de las bacterias (Yang et al., 2017), de forma que establecen una relación más íntima con el hospedador, evitan la competencia microbiana del exterior, acceden continuamente al sustrato y obtienen una protección frente a otros organismos o diferentes estreses (Hallmann et al., 1997).

Así pues, en este apartado se presentan los datos obtenidos en el análisis de la producción de celulasas, pectinasas y xilanasas por parte de los aislados.

En primer lugar, las cepas que producen celulasas presentaron un halo visible de hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC; celulosa no cristalina) alrededor de la colonia (figura 22). Los resultados (tablas 49, 50, 51 y 52) muestran que el 65.8 % de los aislados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. y el 67.8 % de los aislados de raíces de *Brassica napus* L. presentaron un halo de hidrólisis significativo.

Los mejores resultados se obtuvieron en cepas pertenecientes a géneros muy diversos como *Bacillus* (*B. halotolerans* SCCPVE07, *B. siamensis* PDABN11 y *B. thuringiensis* MACPV28), *Rhizobium* (*R. laguerreae* MACPV40), *Acidovorax* (*A. radialis* PDABN9), *Shinella* (*S. kummerowiae* PDABN19A) e *Isoptericola* (*I. nanjungensis* CDVBN100).

En la bibliografía científica se ha descrito como la producción de celulasas por parte de especies del género *Rhizobium* es clave a la hora del establecimiento de la simbiosis con plantas leguminosas (Martinez-Molina et al., 1979; Robledo et al., 2008). Además, en los últimos años se ha estudiado el papel de la actividad celulolítica en otras especies y géneros bacterianos (Jung et al., 2007) como *Bacillus* (Juturu y Wu, 2014) o *Pseudomonas* (Ude et al., 2006) debido a la importancia en la colonización y penetración radicular, donde se ha demostrado una mejoría en la competitividad en la rizosfera y

una mejora en el establecimiento de una simbiosis con el hospedador (Compant et al., 2005; Menendez et al., 2019).

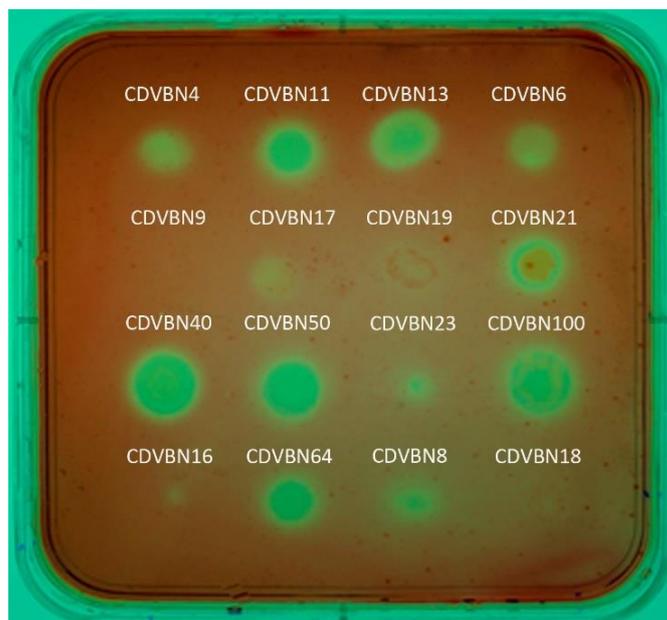


Figura 22: Fotografía de los aislados en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración rojiza indica ausencia de celulosa en el medio y por tanto una actividad celulítica positiva.

En segundo lugar, se analizó la capacidad de los aislados para producir pectinasas a través del crecimiento en el medio de cultivo suplementado con pectina. Los resultados observados se muestran en las tablas 49, 50, 51 y 52. Algunos halos de hidrólisis se muestran en la figura 23.

Los resultados obtenidos muestran que el 60 % de los aislados de nódulos presentaron una producción de pectinasas positiva, mientras que solo el 45.5 % de los aislados de raíces de colza presentó un halo de hidrólisis detectable.

Los mejores resultados corresponden a aislados pertenecientes a los siguientes géneros y especies; *P. brassicacearum* (CDVBN10, CDVBN64), *P. baetica* (CDVBN4), *P. orientalis* (CDVBN20), *P. thivervalensis* (PDABN4), *Bacillus paralicheniformis* (MACPV08, MACPVE01, MACPVE09), *B. aryabhattai* (MACPV15), *B. simplex* (CDVBN6), *B. siamensis* (PDABN19B), *Rhizobium ecuadorensis* (MACPV09) y *R. fabae* (MACPV11).

En la bibliografía encontramos que bacterias promotoras del crecimiento de plantas de algodón y guisante pertenecientes a las especies *Pseudomonas alcaligenes*, *P. denitrificans* y *Bacillus polymyxa* fueron descritas por una actividad pectinasa positiva (Egamberdiyeva y Höflich, 2004). Además, bacterias pertenecientes a otros géneros como *Vibrio* o *Zhihengliuella*, y su acción promotora en *Salicornia brachiata* han sido también descritas por su acción pectinasa positiva (Jha et al., 2012).



Figura 23: Fotografía de los aislados en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración rojiza indica ausencia de pectina en el medio y por tanto una actividad pectinasa positiva.

Ya que la pectina es el componente mayoritario de la pared celular primaria, la producción de pectinasas y la posterior degradación del material vegetal se ha descrito como una vía eficaz de obtención de carbono por parte de los microorganismos. Teixeira et al., (2000) realizaron un análisis de la utilización de diferentes fuentes de carbono por parte de la especie *Aspergillus japonicus* y su actividad hidrolítica asociada, observaron que la mejor fuente de carbono y la mayor actividad (pectinesterasa) se correspondía a los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de pectina. Por otra parte, Reetha et al., (2014) demostraron como la actividad pectinolítica por parte de cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, además de servir como fuente de carbono para el desarrollo bacteriano tiene una repercusión significativa en la disminución de los efectos negativos causados por cepas fúngicas fitopatógenas en los cultivos.

Como se describió anteriormente, debido a que el xilano es el componente principal de la hemicelulosa y se encuentra en gran porcentaje en la pared celular vegetal, conocer el complejo enzimático bacteriano involucrado en su hidrólisis resulta útil para profundizar en la interacción de los microorganismos con sus plantas hospedadoras, además de conocer el posible potencial de entrada al interior de estas.

Así pues, se estudió la producción de xilanasas por parte de nuestros aislados, para ello se crecieron en el medio de cultivo correspondiente suplementado con xilano. Los resultados observados se muestran en las tablas 49, 50, 51 y 52. Algunos halos de hidrólisis se muestran en la figura 24.

Las cepas con mejor capacidad para hidrolizar xilano pertenecen a las especies *Bacillus paralicheniformis* (SCCPV02), *B. safensis* (PDABN29), *Paenibacillus xylanexedens*

(MAPVE10), *Microbacterium yannicii* (CDVBN50) y *Flavobacterium pectinovorum* (PDABN18).

En la bibliografía se describe que las especies bacterianas con mayor actividad xilanásica pertenecen a los géneros *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Xanthomonas* y *Bacillus* (Mathur et al., 2015; Talamantes et al., 2016).



Figura 24: Fotografía de los aislados en la que se muestra el halo producido por cada una de las cepas indicadas. La ausencia de coloración indica ausencia de xilano en el medio y por tanto una actividad xilanásica positiva.

Debido a que el xilano es el componente principal de la hemicelulosa y ésta se encuentra en gran proporción en la pared celular vegetal, aquellos microorganismos que tengan la posibilidad de producir cualquier tipo de xilanasas perteneciente a la familia de las Glucosil hidrolasas (GH) tendrán la posible ventaja de usar la xilosa como fuente de carbono, otorgándoles un beneficio destacable frente aquellos que no tengan esa capacidad. Además, supone una gran ventaja ya que la cepa seleccionada para aplicarse como biofertilizante tendría la posibilidad de penetrar en el interior vegetal, forjando una relación más íntima y más segura con el hospedador.

Nandi et al., (2018), tras un análisis transcriptómico realizado en plantas de tomate infectadas con *Clavibacter michiganensis*, un importante fitopatógeno de este cultivo, describieron la importancia de dos genes codificantes para dos xilanasas (*xysA* y *xysB*) y su importancia clave en el proceso infectivo en la planta hospedadora. Así pues, el estudio de la producción de xilanasas acerca a un mejor conocimiento de las interacciones del microorganismo y su hospedador vegetal.

Tabla 49: Caracterización de los mecanismos PGP *in vitro* producidos por los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en San Cristóbal de la Cuesta (Salamanca). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa.

Cepa	Solubilización de fosfato	Producción de sideróforos	Producción de celulosa	Producción de celulasas	Producción de pectinasas	Producción de xilanasas
SCCPV01	-	-	+	-	+	+
SCCPV02	-	-	+	+	+	++
SCCPV03	+	+	+	+	-	+
SCCPV04	-	-	+	+	-	+
SCCPV05	+	-	+	++	+	+
SCCPV06	+	+	+	+	+	+
SCCPV07	+	-	-	+	+	+
SCCPV09	+	-	-	+	+	+
SCCPV10	+	-	-	+	-	-
SCCPV11	-	-	+	+	+	+
SCCPV12	+	-	+	-	-	-
SCCPV14	-	-	-	-	-	-
SCCPV15	+	+	-	+	+	+
SCCPV16	+	-	-	+	+	+
SCCPV17	-	-	+	+	+	+
SCCPV18	+	-	+	+	+	+
SCCPV19	-	-	++	-	+	+
SCCPV20	-	+	+	+	+	+
SCCPV21	-	-	-	+	+	+
SCCPV23	+	-	++	+	+	+
SCCPV24	+	-	-	-	-	-
SCCPV26	-	-	-	-	-	-
SCCPV28	++	-	-	-	-	-
SCCPV29	+	-	+	+	+	+
SCCPV30	+	+++	++	+	+	-
SCCPV31	-	-	-	++	+	+
SCCPV32	+	-	-	+	-	-
SCCPV33	+	++	++	++	+	-
SCCPV34	-	-	+	+	-	+
SCCPVE01	-	+	+	++	+	+
SCCPVE04	-	-	+	+	+	+
SCCPVE05	-	-	+	-	+	+
SCCPVE07	-	+	+++	+++	+	+
SCCPVE08	-	-	-	-	+	+
SCCPVE09	-	-	-	-	+	+
SCCPVE10	-	+	+	-	-	-
SCCPVE11	+	-	+	+	-	-
SCCPVE12	-	-	+	+	+	+
SCCPVE13	+	+++	+	-	+	-

Tabla 50: Caracterización de los mecanismos PGP *in vitro* producidos por los aislados de nódulos de plantas de *P. vulgaris* L. crecidas en Machacón (Salamanca). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa.

Cepa	Solubilización de fosfato	Producción de sideróforos	Producción de celulosa	Producción de celulasas	Producción de pectinasas	Producción de xilanasas
MACPV01	+	-	++	++	+	+
MACPV02	+	-	+	-	-	+
MACPV03	+	-	-	-	-	+
MACPV04	+	-	+	-	+	+
MACPV05	+	-	-	++	+	-
MACPV06	+	++	++	+	-	+
MACPV08	+	-	+	+	++	+
MACPV09	+	-	-	+	++	-
MACPV10	+	-	+	+	-	+
MACPV11	-	-	-	-	++	+
MACPV12	+	-	+	++	+	+
MACPV13	+	-	-	+	-	-
MACPV15	+++	-	-	-	+++	++
MACPV16	-	-	+++	+	-	-
MACPV17	+	+++	+++	+	-	+
MACPV18	+	-	+	++	-	+
MACPV19	+	+++	+	+	-	+
MACPV20	+	+++	++	+	-	+
MACPV21	+	-	-	+	-	+
MACPV22	+	-	-	+	+	+
MACPV23	-	-	+	+	+	+
MACPV24	+	-	+	-	+	+
MACPV25	+	-	++	++	-	-
MACPV26	-	-	++	+	+	-
MACPV27	-	-	++	++	+	+
MACPV28	+	-	+++	+++	-	-
MACPV29	+	-	++	-	-	+
MACPV30	+	-	+	+	-	-
MACPV31	-	-	-	++	+	+
MACPV32	+	-	-	+	+	+
MACPV34	+	-	-	++	-	+
MACPV35	+	+	-	+	-	-
MACPV36	-	-	-	+	+	+
MACPV37	+	+	+++	+	+	+
MACPV38	+	-	-	++	-	+
MACPV39	+	++	+++	++	+	++
MACPV40	++	+	+++	+++	+	++
MACPV41	+	+	+++	++	-	+
MACPVE01	-	-	+	+	++	-
MACPVE02	+	-	+	+	+	+
MACPVE04	++	-	+	-	+	+
MACPVE06	-	-	-	+	-	-
MACPVE09	-	-	+	+	+++	+
MACPVE10	++	-	+++	+	-	+++
MACPVE11	-	-	+	+	++	-
MACPVE12	-	-	+	+	++	-

Tabla 51: Caracterización de los mecanismos PGP *in vitro* producidos por los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en Peleas de Arriba (Zamora). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa, (NG) indica crecimiento bacteriano negativo.

Cepa	Solubilización de fosfato	Producción de sideróforos	Producción de celulosa	Producción de celulasas	Producción de pectinasas	Producción de xilanasas
PDABN1	+++	+++	+++	++	-	-
PDABN2	++++	++	+++	+	-	+
PDABN3	++++	++	+++	+	+	-
PDABN4	++++	+++	+++	-	++	-
PDABN5	+++	++	++	-	+	+
PDABN6	++++	++	+++	-	-	+
PDABN7	++++	++	+++	-	-	+
PDABN8	++++	++	+++	+	-	+
PDABN9	-	-	+++	+++	++	-
PDABN11	++	NG	+++	+++	+	+
PDABN12	+++	++	++	-	+	+
PDABN13	++++	++	+++	-	+	+
PDABN14	+++	+++	+++	-	+	+
PDABN15	++++	++	+++	-	-	+
PDABN18	-	-	+++	+++	-	++
PDABN19A	+	NG	++++	+	+	-
PDABN19B	++	NG	+++	+++	++	-
PDABN20	+++	NG	+++	-	+	-
PDABN21	-	NG	+++	+	-	+
PDABN21B	+	-	-	+	+	-
PDABN22B	+	-	-	-	-	-
PDABN23	++	NG	+++	++	-	+
PDABN23A	-	+	+++	+	+	+
PDABN24A	++	NG	+++	-	-	-
PDABN24B	++	NG	+++	+	-	-
PDABN25	+++	NG	++++	-	+	+
PDABN26	-	NG	-	+	-	-
PDABN27	-	NG	+	+	-	+
PDABN28	-	NG	+++	-	+	-
PDABN29	+++	NG	++	++	-	+++
PDABN32	-	NG	+++	+	+	-

Tabla 52: Caracterización de los mecanismos PGP *in vitro* producidos por los aislados de raíces de plantas de *B. napus* L. crecidas en Castellanos de Villiquera (Salamanca). Mayor número de (+) indica mayor producción, (-) indica producción negativa, (NG) indica crecimiento bacteriano negativo.

Cepa	Solubilización de fosfato	Producción de sideróforos	Producción de celulosa	Producción de celulasas	Producción de pectinasas	Producción de xilanasas
CDVBN1	+++	++++	-	+	-	+
CDVBN2	++	++++	+++	-	-	+
CDVBN3	+	+++	++	-	-	-
CDVBN4	++++	++++	+++	+	++	-
CDVBN6	++++	++++	+++	+	++	+
CDVBN8	+++	+++	++	+	+	+

CDVBN9	+++	NG	++	-	-	-
CDVBN10	++++	++++	+++	+	++	-
CDVBN11	+++	++++	+++	++	+	-
CDVBN13	++++	+++	+++	++	+	+
CDVBN14	++++	+++	+++	++	+	-
CDVBN15	+++	++++	+++	++	+	-
CDVBN16	++++	++	++	-	-	-
CDVBN17	+++	++++	+++	+	+	+
CDVBN18	+++	+++	++	-	+	-
CDVBN19	+	NG	+	+	+	-
CDVBN20	++++	++++	++	+	++	+
CDVBN21	++++	++++	++	++	-	-
CDVBN22	++	+++	+++	-	-	-
CDVBN23	+++	+++	+++	+	-	-
CDVBN24	+++	++++	-	+	-	-
CDVBN25	+++	+++	-	+	-	-
CDVBN26	+++	++++	-	+	-	-
CDVBN27	++	+++	-	+	-	+
CDVBN28	++	+++	++	+	-	-
CDVBN29	+	++	++	+	+	-
CDVBN31	++	++	++	+	+	+
CDVBN32	++	-	+++	-	-	-
CDVBN33	+	NG	++++	+	+	-
CDVBN34	+++	++	++++	-	-	-
CDVBN37	+++	++	-	-	+	-
CDVBN38	+++	++	-	-	-	-
CDVBN39	++++	++	++	-	+	-
CDVBN40	-	NG	+++	++	+	+
CDVBN41	+++	++	++	-	-	+
CDVBN42	-	NG	++	+	-	-
CDVBN43	-	NG	++	+	-	-
CDVBN44	+++	+++	+++	+	+	-
CDVBN45	+++	++	++	-	+	-
CDVBN46A	-	-	+++	+	+	-
CDVBN46B	-	NG	+++	+	+	-
CDVBN47	+++	+++	++	-	-	-
CDVBN49	-	-	+++	+	-	-
CDVBN50	+	NG	++++	++	+	++
CDVBN51	-	NG	+++	+	-	+
CDVBN52	+++	+++	++	-	-	-
CDVBN53	+	NG	+++	+	+	-
CDVBN54	+	NG	+++	+	-	-
CDVBN55	-	NG	+++	+	+	-
CDVBN57	-	-	+++	+	-	-
CDVBN58	-	-	+++	+	-	-
CDVBN59	-	-	++	-	-	-
CDVBN60	-	-	+++	+	+	-
CDVBN61	-	-	+++	+	-	-
CDVBN62	+++	+++	-	-	-	+
CDVBN63	+++	++++	-	+	-	-
CDVBN64	++++	+++	++	++	+++	-
CDVBN65	++++	++++	-	++	+	+

CDVBN66	+++	+++	++	+	-	+
CDVBN67	+++	-	+++	+	+	+
CDVBN68	++++	++++	+++	++	-	+
CDVBN69	++++	++++	++	+	+	+
CDVBN70	+++	++++	+++	+	+	-
CDVBN71	+++	++++	+++	+	-	-
CDVBN72	-	-	+++	+	-	-
CDVBN73	-	-	+++	+	+	-
CDVBN77	NG	-	+++	-	-	-
CDVBN78	-	-	++	-	-	-
CDVBN81	+	++	+++	-	++	+
CDVBN83	++	NG	-	+	-	-
CDVBN84	NG	NG	+++	+	+	+
CDVBN89	-	-	+++	++	-	+
CDVBN90	-	-	+++	-	-	-
CDVBN91	-	-	++	+	-	+
CDVBN92A	-	-	++	+	-	-
CDVBN92B	NG	-	+++	-	-	-
CDVBN98	-	-	+++	+	+	+
CDVBN100	-	-	+++	+++	-	+
CDVBN101	-	-	-	+	-	-
CDVBN102	NG	-	-	+	-	-
CDVBN108	+++	++++	+++	++	-	-

2. Estudio *in silico* de los genomas de las cepas seleccionadas.

Los análisis *in vitro* mostraron cómo los aislados de este estudio poseen algunos mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas. Sin embargo, los microorganismos pueden presentar muchos más tipos de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Así pues, se decidió realizar un análisis de los genomas de aquellas que mejores resultados mostraron o mayor interés presentaron. A partir de los análisis *in silico* se puede profundizar en las características genómicas de las cepas seleccionadas y obtener una mayor información de los mecanismos PGP, lo cual resulta de especial interés en el desarrollo de un biofertilizante eficaz (Ali et al., 2018).

En primer lugar, debido a la problemática del aumento de la salinidad en los suelos agrícolas mencionada en la presente Tesis Doctoral y los graves efectos negativos que conlleva en la producción vegetal, se decidió trabajar con la especie *Bacillus halotolerans* en concreto con la cepa *B. halotolerans* SCCPVE07, cuya capacidad para crecer en condiciones de estrés salino ha sido descrita en la bibliografía (Sagredo-Beltrán et al., 2018). Además, hasta la fecha no existen trabajos publicados que analicen su interacción con cultivos agrícolas de interés bajo un estrés de este tipo.

En segundo lugar, debido a la escasez de estudios previos que analicen la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal de cultivos de colza, se seleccionó una cepa endófito de este cultivo, la cepa *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10, que además presentó unos de los mejores resultados en el análisis *in vitro*.

Debido a que las cepas del género *Rhizobium* no presentan problemas para el medio ambiente ni la salud humana (García-Fraile et al., 2012) y, además existen

múltiples trabajos que analizan el efecto positivo de la inoculación de distintas especies y cepas pertenecientes a este género, tanto en leguminosas como en otros cultivos de interés agroalimentario (Diez-Mendez et al., 2015; Flores-Félix et al., 2018; Silva et al., 2014), se decidió trabajar con la cepa *Rhizobium laguerreae* MACPV40, una de aquellas que mejores resultados *in vitro* presentaron. Sin embargo, en el grupo de investigación se había descrito anteriormente la cepa PEPV40, perteneciente también a la especie *R. laguerreae*, aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. y, la cual presentó un potencial interés para interactuar con los cultivos vegetales. Así pues, se decidió secuenciar y estudiar el genoma de ambas para poder decidir cuál de las dos presenta un mayor número de genes relacionados con la posible interacción beneficiosa planta-microorganismo en su genoma.

2.1 Descripción general de los genomas.

El genoma de *B. halotolerans* SCCPVE07 presentó 4.022.469 pares de bases y un contenido en G+C de 43.9 %. En este caso el número de contigs fue de 33, y el número de regiones codificantes detectadas fueron 4188.

En el caso del genoma de *P. brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10 se obtuvieron 6,180,897 pares de bases, cuyo contenido en G+C ascendió a 60.8 %. El número de contigs fue 85 y el número de regiones codificantes detectadas 5773.

El genoma de *R. laguerreae* PEPV40 tiene 7.202.215 pares de bases. El número de contigs es 99 y el contenido en G+C es 60.8 %, porcentaje muy similar al obtenido para otras especies de *R. laguerreae* (Flores-Félix, 2018). El programa RAST consiguió anotar 7351 regiones codificantes (CDS).

En el caso del genoma de *R. laguerreae* MACPV40 se obtuvieron 6.941.990 pares de bases. El contenido en G+C fue de 61.2 %, el número de contigs 115 y el número de regiones codificantes detectadas fue de 7098.

Las principales características de estos cuatro genomas se resumen en la tabla 53.

Tabla 53: Características generales de los genomas de *Bacillus halotolerans* SCCVPE07, *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10, *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y *Rhizobium laguerreae* MACPV40.

Característica	SCCPVE07	CDVBN10	PEPV40	MACPV40
Tamaño (pb)	4.022.469	6.180.897	7.202.215	6.941.990
Contenido en G+C (%)	43.9	60.8	60.8	61.2
Número de contigs	33	85	99	115
Porcentaje de genes clasificados (%)	31	32	28	25
Número de CDSs	4188	5773	7351	7098
rRNAs	93	61	51	51

Los porcentajes de genes clasificados indican que la mayoría de los genes anotados no han podido ser clasificados automáticamente en algún subsistema. En la figura 25 podemos ver las representaciones gráficas de los genomas y los subsistemas a los que el programa RAST ha conseguido asignar una función previamente descrita.

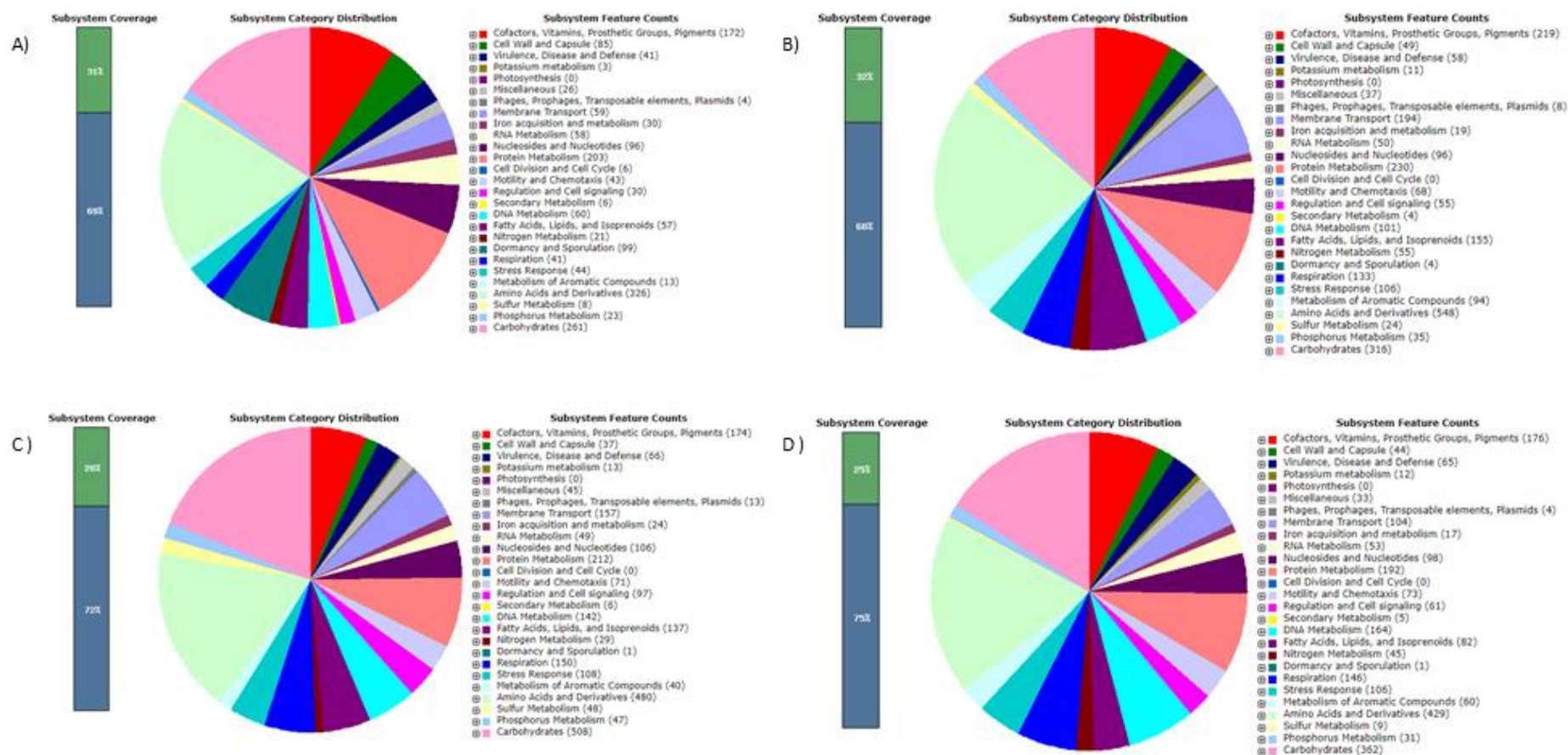


Figura 25: Representación gráfica de la anotación automática y el análisis funcional mediante RAST de los genomas obtenidos en el presente estudio. a) *Bacillus halotolerans* SCCPE07, b) *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10, c) *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y d) *Rhizobium laguerreae* MACPV40.

2.2. Análisis de genes de interés implicados en la promoción del crecimiento vegetal.

En este apartado se presentan los resultados de la búsqueda de genes implicados en los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal. En concreto, los genes implicados en la producción de fitohormonas y sideróforos, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, solubilización de potasio, tolerancia a la salinidad, biosíntesis de polisacáridos y producción de biofilms.

2.2.1 Genes implicados en la fijación de nitrógeno.

El nitrógeno es el componente mayoritario de la atmósfera, sin embargo, no se encuentra en la forma asimilable para las plantas. La transformación a una forma asimilable por los seres vivos es un proceso denominado Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Dentro de los varios tipos de FBN, existe la que se lleva a cabo en la simbiosis mutualista entre especies bacterianas del género *Rhizobium* y plantas leguminosas, la cual es el resultado de un diálogo molecular altamente regulado descrito desde hace décadas (Smit et al., 1987).

En este sentido, debido a la importancia del nitrógeno en el desarrollo y crecimiento vegetal se realizó un análisis de los genes involucrados en la fijación y metabolismo del nitrógeno contenidos en los genomas de las cepas seleccionadas.

La capacidad de fijación de nitrógeno viene determinada por la codificación de la enzima nitrogenasa a través de los genes *nif* (Bloch et al., 2020). El gen *nifH* se localizó tanto en *R. laguerreae* MACPV40 como en PEPV40, sin embargo, el resto de los genes del operón *nifHDK* no fueron observados posiblemente al no encontrarse anotados por el sistema automático. Por otro lado, todos los genes que conforman el operón *fixABCX*, que juega un papel en el equilibrio redox durante la fijación de nitrógeno (Masson-Boivin et al., 2009) fueron localizados en MACPV40 y PEPV40.

En el genoma de la cepa CDVBN10 no se localizó ningún gen *nif*, tan sólo un regulador transcripcional *fixJ*, cuya función posiblemente haya sido anotada por homología de la secuencia, este resultado difiere a los descritos en otras investigaciones en las cuales varios genes del operón *nifHDK* fueron observados en especies del género *Pseudomonas* (Hatayama et al., 2005; Yan et al., 2008).

Por último, en el genoma de la cepa *Bacillus halotolerans* SCCPVE07 no se detectó ningún gen implicado en la FBN, a diferencia de otros estudios en especies como *Bacillus azotofixans* (Seldin et al., 1984), *B. megaterium* y *B. cereus* (Ding et al., 2005).

2.2.2 Genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas.

La producción bacteriana de fitohormonas es considerada uno de los mecanismos más importantes a través de los cuales se promociona el crecimiento de las plantas (Martínez-Viveros et al., 2010). Entre la amplia variedad de fitohormonas existente, el ácido indol-3-acético (AIA) es de las más estudiadas, debido a sus efectos positivos en el desarrollo de los tejidos vegetales (Khan et al., 2016).

Hoy en día se conocen 5 rutas alternativas de biosíntesis de AIA, con alta similitud entre bacterias y plantas. En el caso de las bacterias, se ha identificado el aminoácido triptófano como el precursor principal y se ha descrito que las rutas mayoritarias y más comunes son la ruta del indol-3-acetamida y la ruta del indol-3-piruvato (Spaepen et al., 2007).

La ruta indol-3-acetamida (IAM) es la mejor caracterizada y estudiada en bacterias. En primer lugar, el triptófano es convertido en IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa. Después, la enzima IAM hidrolasa convierte el IAM en ácido indol-3-acético. Los genes involucrados en esta ruta han sido clonados y caracterizados en bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, entre otros (Theunis et al., 2004).

La producción de ácido indol-3-acético vía indol-3-piruvato (IPyA) ha sido descrita para un amplio rango de bacterias (Spaepen et al., 2007). En primer lugar, el triptófano es convertido a IPyA por transaminación. IPyA es descarboxilado a indol-3-acetaldehído (IAAld) gracias a la enzima indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC). En el último paso IAAld es oxidado y convertido en AIA gracias a la acción de IAAld deshidrogenasa.

Aunque las rutas anteriores son las más estudiadas y conocidas en las bacterias, la ruta Triptamina (TAM) ha sido identificada también en cepas pertenecientes a la especie *Bacillus cereus* gracias a la actividad triptófano descarboxilasa (Perley y Stowe, 1966).

Cabe resaltar que las investigaciones realizadas en los últimos años han descrito que, en multitud de casos, las bacterias contienen en su genoma la capacidad de biosintetizar ácido indol-3-acético a través de varias rutas metabólicas. Así pues, debido al avance de los estudios *in silico* se pueden conocer exacta y previamente las posibles rutas alternativas disponibles en los genomas de cada cepa de estudio (Land et al., 2015).

En el presente estudio, en las dos cepas de *Rhizobium* se encontraron genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis del AIA, como la indol-3-glicerol fosfato sintasa (EC 4.1.1.48) o indol-3-acético transferasa. La primera de ellas está involucrada en la síntesis de AIA en una de las rutas denominadas triptófano independiente. También se han encontrado genes codificantes de acetamidasa AmiE (EC 3.5.1.4), involucradas en la síntesis de AIA por la denominada ruta del indol-3-acetamida al convertir el indol-3-acetamida en ácido indol acético. Además, poseen genes codificantes para la enzima aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3), que es la que convierte el indol-3-acetaldehído en AIA a través de la ruta indol-3-piruvato. Sin embargo, en la figura 26, se observa cómo no se han detectado todos los genes concretos para una determinada ruta y como la vía más probable es la del indol-3-acetamida, lo que coincide con lo descrito anteriormente para otras especies del mismo género (Kobayashi et al., 1995; Theunis et al., 2004).

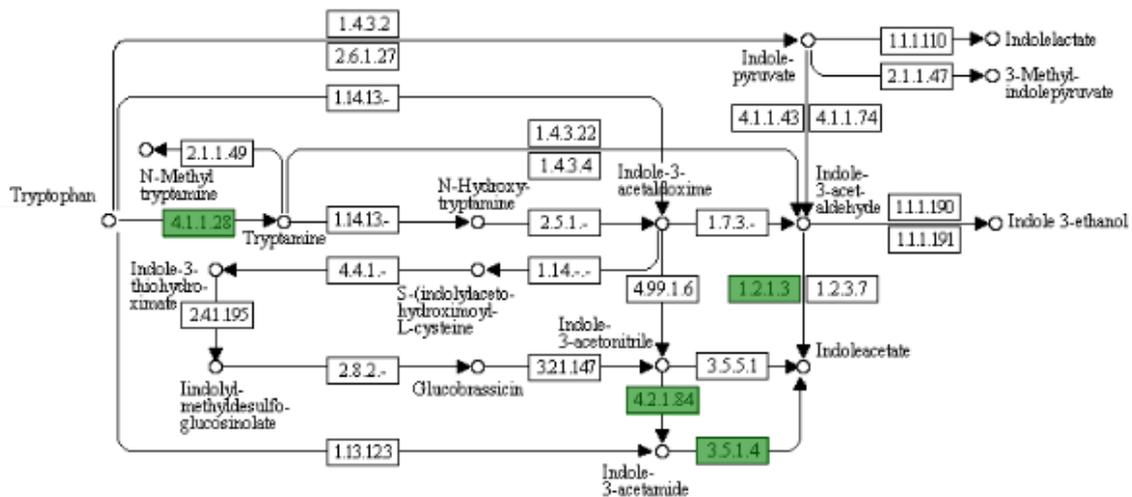


Figura 26: Esquema obtenido mediante KEGG de la ruta metabólica de síntesis del ácido indol acético. En verde se representan las enzimas presentes en los genomas de *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y *Rhizobium laguerreae* MACPV40.

En el caso de las cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* se encontraron enzimas involucradas tanto en la síntesis de AIA mediante la vía triptófano independiente (EC 4.1.1.48), como la del indol-3-acetamida (EC 3.5.1.4) e indol-3-piruvato (EC 1.2.1.3).

Una de las hormonas gaseosas más involucrada en el desarrollo vegetal es el etileno. Esta hormona ha sido descrita ampliamente por su función en el desarrollo de pelos radiculares, elongación de la raíz, abscisión de hojas y pétalos, madurez del fruto y senescencia de los órganos (Gamalero et al., 2015). Sin embargo, cuando la planta está sometida a estreses, tanto bióticos como abióticos, la concentración de etileno aumenta desembocando en una reducción drástica del desarrollo vegetal (Siddikee et al., 2011).

En este sentido, diversos estudios han descrito que las bacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa, implicada en la degradación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor del etileno, reducen significativamente los niveles de esta hormona, confiriendo, por tanto, una resistencia a la planta frente al estrés (Choudhary et al., 2016). El gen *acdS* implicado en la biosíntesis de la enzima ACC-desaminasa (EC 3.5.99.7) no se detectó en ninguna de las cepas, sin embargo, estudios previos han demostrado la presencia y la correlación de una región reguladora *upstream* al gen que pertenece a la familia *Irp* (Ma et al., 2003). Según Glick et al., (2007) está región reguladora actúa de la siguiente manera, LRP se une a un complejo formado por el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y la proteína AcdB. Juntos, LRP y el complejo AcdB-ACC son los encargados de activar la transcripción del gen *acdS*, a través del cual se sintetiza la enzima ACC desaminasa. Esta región se ha determinado en especies de los géneros *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Azospirillum*, entre otros (Grichko y Glick, 2000) y ha sido detectada en las 4 cepas de este estudio.

Las giberelinas son hormonas vegetales relacionadas con el desarrollo floral, germinación de las semillas y alargamiento de los brotes (Urbanova y Leubner-Metzger, 2018). En bacterias su síntesis está determinada por el operón *GA*, a diferencia del operón descrito en hongos, este contiene una enzima reductasa y otra enzima alcohol

deshidrogenasa. Desde hace años, además se ha descrito otro cluster de genes compuesto por el gen *IDS*, que codifica una isopreno sintasa junto con una o varias diterpeno ciclasas, ambas involucradas en la biosíntesis de giberelinas (Nett et al., 2016; Tudzynski et al., 2018). A pesar de que estos genes se han detectado en bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* (Nett et al., 2017), *Pseudomonas* (Kapoor et al., 2016) y *Bacillus* (Khan et al., 2019), no se han observado ninguno de ellos en el análisis de los genomas de las 4 cepas seleccionadas.

Las citoquininas, otro tipo de hormonas vegetales, están involucradas en la estimulación y división celular de las plantas, diferenciación vascular y proliferación y desarrollo de los pelos radiculares (Nardoza et al., 2020). La producción de citoquininas isoprenoides se ha documentado en bacterias PGPR como *Pseudomonas fluorescens* o *Bacillus subtilis* (García de Salamone et al., 2001; Liu et al., 2013). Sin embargo, y del mismo modo que en los casos anteriores, no se la localizado la presencia de ningún gen involucrado en su biosíntesis en el análisis de los genomas de las 4 cepas seleccionadas en la presente Tesis Doctoral.

2.2.3 Genes implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se encuentran dentro de los metabolitos secundarios más estudiados en las plantas. Estos compuestos son una parte esencial tanto de la dieta humana como de la dieta animal. Los compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los ácidos fenólicos y los flavonoides, son el grupo más importante de antioxidantes naturales (Huyut et al., 2017).

En la bibliografía científica se han descrito ampliamente sus efectos antialérgicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antimicrobianos y vasodilatadores, además de sus efectos en problemas del corazón, cataratas y Alzheimer (Comunian et al., 2017; Vodnar et al., 2017).

Además de los efectos descritos en la salud humana, se ha descubierto como estos metabolitos secundarios tienen una importancia significativa en la mitigación de los efectos producidos por algún tipo de estrés en los cultivos (Riaz et al., 2018).

Así pues, en este sentido, se analizó si las 4 cepas seleccionadas tenían potencial en sus genomas para la biosíntesis de alguno de estos compuestos.

Por ejemplo, se buscaron los genes involucrados en la ruta del ácido cafeico, que interviene en la síntesis de lignina e interactúa con las especies reactivas de oxígeno. La biosíntesis del ácido ferúlico se realiza a través del ácido cafeico, cuyo proceso está mediado por la enzima 3-O-metiltransferasa [EC 2.1.1.68], la cual no se detectó en el análisis *in silico* de ninguno de los genomas. Sin embargo, sí que se detectaron varios genes involucrados en pasos anteriores en la ruta de síntesis de compuestos fenilpropanoides, como el gen que codifica para la enzima cinamoil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195) involucrada en la biosíntesis del ácido cinámico (Sibout et al., 2005), que se detectó en las cepas CDVBN10 y SCCPVE07, o el gen que codifica la enzima cinamoil esterasa, observada en el genoma de la cepa PEPV40.

Además, en las cepas *R. laguerreae* MACPV40, *R. laguerreae* PEPV40 y *P. brassicaearum* CDVBN10 se detectó el gen que codifica la enzima trans-hidratasa-feruloyl-CoA, involucrada en la producción de ácido vainílico a partir del ácido ferúlico como sustrato (Leonard et al., 2006).

También se detectó cómo la cepa *Bacillus halotolerans* SCCPVE07 contenía en su genoma el gen *Qdol* que codifica para la enzima quercetina 2,3-dioxigenasa, involucrada en el catabolismo de la quercetina (Bowater et al., 2004).

2.2.4 Genes implicados en el metabolismo del hierro.

Aunque el hierro es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre, su concentración y biodisponibilidad varía ampliamente (Chu et al., 2010). En este sentido, las bacterias han sido capaces de desarrollar complejos sistemas metabólicos que facilitan la obtención y manejo de este elemento con el fin de evitar situaciones de déficit (Radzki et al., 2013).

Hoy en día, se han descrito más de 500 tipos de sideróforos bacterianos distintos, con grandes diferencias en sus estructuras entre las diferentes especies. Sin embargo, los sideróforos tipo hidroxamato, catecolato y carboxilato son los mayoritarios (Ali y Vidhale, 2013), aunque en géneros como *Pseudomonas* abunda la pioverdina, mezcla de los principales (Cornelis, 2010).

En general, la producción de sideróforos se relaciona con el mecanismo de transportadores dependientes del sistema TonB, el cual es más común en bacterias Gram-negativas (Sajeed Ali y Vidhale, 2013). Una vez que el sideróforo se une al receptor de la membrana externa denominado complejo TonB-ExbB-ExbD, la captación posterior se realiza a través de un sistema transportador de unión ABC. Por ejemplo, el cluster de genes para la captación de hidroxamato férrico se denomina *Fhu*, compuesto por cuatro genes *fhuA*, *fhuB*, *fhuC* y *fhuD* (Braun y Braun, 2002).

En el caso de las cepas MACPV40 y PEPV40 el sistema automático de anotación RAST identificó, respectivamente, 17 y 24 genes diferentes relacionados con el metabolismo y el transporte de sideróforos. Entre ellos encontramos los genes *fhuB*, *fhuC* y *fhuD*, además de los involucrados en la producción del sideróforo aerobactina (*iucB* e *iucD*) y los genes del complejo TonB-ExbB-ExbD.

Para la cepa SCCPVE07 se encontraron 30 genes, entre ellos, *fhuB*, *fhuC* y *fhuD*, aparte de los genes involucrados en la síntesis y transporte del sideróforo bacillibactina (*dhbA*, *dhbB*, *dhbC*, *dhbE*, *dhbF*, *feuA*, *feuB* y *feuC*) y genes involucrados en el transporte de antrachelina.

Sin embargo, para la cepa CDVBN10 se encontraron 19 genes, entre los que se destacan los correspondientes al complejo TonB-ExbB-ExbD, además de los genes involucrados en la síntesis de pioverdina (*PvdL*, *PvdY* y *PvdE*) y el complejo receptor-TonB para el sideróforo acromobactina.

2.2.5 Genes implicados en el metabolismo del fósforo.

El fósforo es uno de los elementos esenciales para las plantas (Bhat et al., 2018). Sin embargo, en la naturaleza no siempre se encuentra en la forma química disponible (Biswas et al., 2018). La solubilización del fosfato inorgánico y la mineralización del fosfato orgánico son los dos procesos a través de los cuales el fósforo se hidroliza y se convierte en una forma biodisponible (Khan et al., 2014; Koch et al., 2018).

Las formas insolubles de fósforo como fosfato bicálcico, fosfato de aluminio (AlPO_4) o fosfato ferroso (Fe_3PO_4)₂ pueden ser convertidas en solubles gracias a la secreción bacteriana de ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999).

El sistema automático de anotación RAST identificó 31, 47, 35 y 23 genes, todos ellos relacionados con la captación y solubilización de fosfato inorgánico (PI) para las cepas MACPV40, PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07, respectivamente.

La principal forma asimilable de fósforo para las bacterias es el anión ortofosfato (PO_4^{3-}). El regulón Pho, descrito por primera vez en *E. coli*, es el mecanismo involucrado en la solubilización del fosfato inorgánico (Wanner y Chang, 1987). Este sistema está mediado por dos componentes PhoB y PhoR. PhoR es un sensor quinasa cuya actividad depende de la disponibilidad de fosfato. Cuando se activa, PhoR fosforila PhoB, que a su vez activa un programa de expresión génica para adaptarse al estado limitado de fosfato (Prunty et al., 2018).

Existe, además, una serie de genes directamente relacionados con la solubilización de fosfato inorgánico, como las trifosfatasa inorgánicas (EC 3.6.1.25) localizadas para la cepa CDVBN10 o las pirofosfatasa inorgánicas (EC 3.6.1.1) encontradas en las cepas MACPV40, PEPV40 y SCCPVE07. Ambas actúan sobre sustratos inorgánicos transformándolos en formas químicas más fácilmente asimilables (Anand et al., 2016). También fueron localizadas exopolifosfatasa (EC 3.6.1.11) en los genomas de las cepas pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Pseudomonas*. Además, los genes que codifican la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) fueron localizadas en los 4 genomas analizados.

Otras enzimas implicadas en la solubilización de fosfato, descritas en la bibliografía, son aquellas relacionadas con la síntesis de ácidos orgánicos como la enzima citrato sintasa (EC 2.3.3.1), detectada en las 4 cepas o la enzima lactato deshidrogenasa detectada en MACPV40, PEPV40 y CDVBN10. Ambas enzimas han sido descritas por su relación con la solubilización de fosfato en bacterias (Kwak et al., 2015). Para la primera se ha propuesto que debido a su alta afinidad por los cationes divalentes y trivalentes, el citrato es capaz de desplazar al fósforo de los complejos insolubles y, por tanto, se convierte en una forma disponible para la absorción por parte de la planta (López-Bucio et al., 2000). La enzima lactato deshidrogenasa involucrada en la síntesis de ácido láctico y la correspondiente disminución del pH también ha sido definida como mecanismo involucrado en la solubilización de fósforo por parte de diferentes géneros bacterianos (Chen et al., 2006).

Se ha descrito que el principal mecanismo de solubilización de fosfato en bacterias Gram-negativas es la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico (Miller et al., 2008). Esta reacción es catalizada por la enzima extracelular glucosa deshidrogenasa (*gdh*), la cual necesita como coenzima la pirroloquinolina quinona (*pqq*) (Wagh et al., 2014). Estos sistemas se han detectado en los genomas de las cepas pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Pseudomonas*.

2.2.6 Genes implicados en la tolerancia a la salinidad y la solubilización de potasio.

En base a los objetivos propuestos en la presente Tesis Doctoral, se debían analizar los genes bacterianos implicados en la disminución de los efectos negativos y la tolerancia a estrés salino.

Puesto que el sodio y el potasio se encuentran relacionados debido a la bomba Na^+/K^+ , proteína que actúa como transportador en el intercambio existente entre dos solutos, se aborda el apartado en conjunto.

En los últimos años se ha descrito que la acumulación en plantas y bacterias, de osmolitos, de bajo peso molecular como la prolina, colina o glicina-betaína, reduce significativamente los efectos negativos del estrés salino (Hmida-Sayari et al., 2005). La prolina actúa como osmoprotector, y juega un papel importante en el balance osmótico, la turgencia celular o la disminución de la desnaturalización de enzimas causada por el calor, NaCl u otros estreses (Matysik et al., 2002; Sairam, 2004).

Los análisis de los genomas revelaron que las 4 cepas disponen de diversos genes relacionados con la tolerancia a la salinidad. Se observaron en las 4 cepas seleccionadas, dos de los genes considerados como responsables de la tolerancia a la salinidad (Lamark et al., 1991). Estos son los genes *betA* y *betB*, que codifican respectivamente la enzima colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1) y la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH). Liu et al., (1997) mostraron como la sobreexpresión de estas dos enzimas en plantas transgénicas desembocó en un menor daño de la membrana celular y, por tanto, una mayor tolerancia al estrés salino inducido.

Otra de las sustancias con interés en la disminución de los efectos provocados por los estreses abióticos es la trehalosa. La trehalosa tiene repercusiones ambientales, ya que se trata de un osmoprotector bajo estreses salinos, hídricos y térmicos en muchos microorganismos y plantas, ya que induce una reducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Mostofa et al., 2015). Jang et al., (2003) demostraron como la acumulación de trehalosa en un arroz transgénico mejoró la tolerancia al estrés salino. En las 4 cepas se detectaron genes involucrados en la codificación de múltiples enzimas involucradas en la biosíntesis de trehalosa, como la trehalosa sintasa (EC 5.4.99.16) o la trehalosa-6-fosfato sintasa (EC 3.1.3.12).

Por otro lado, el potasio es uno de los macronutrientes esenciales en el desarrollo y crecimiento de los cultivos, sin embargo, debido a la escasez y baja disponibilidad de este nutriente en los suelos, en los últimos años se ha estudiado el

efecto de las bacterias solubilizadoras de potasio, las cuales son encargadas de convertir las formas insolubles en formas disponibles para la absorción y desarrollo vegetal (Han y Lee, 2005).

Al igual que la solubilización de fosfato, la solubilización de potasio también se debe al descenso del pH en el medio tras la excreción bacteriana de ácidos orgánicos, como son el ácido glucónico, láctico, oxálico, fumárico, cítrico y tartárico (Singh et al., 2013) o tras la formación de complejos metálicos en solución (Zhang et al., 2013). Como se describió en el apartado anterior, en los 4 genomas se detectaron genes involucrados en la biosíntesis de estos ácidos, y por tanto en la solubilización de potasio.

En las bacterias, se han descrito hasta la fecha varios operones encargados de la absorción y transporte de potasio denominados Trk, Ktr, Kup y Kdp, los cuales reflejan diferentes adaptaciones ambientales según el modo de vida (Corratgé-Faillie et al., 2010). En los genomas de las cepas del género *Rhizobium* encontramos los genes *KdpA*, *KdpB* y *KdpC* descritos anteriormente en otras especies del mismo género (Prell et al., 2012). Sin embargo, los sistemas encontrados en *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 fueron Trk y Kdp, y en la cepa *Bacillus halotolerans* SCCPVE07 fueron Ktr y Kdp, ambos resultados concuerdan con lo descrito en la bibliografía para diferentes cepas de los mismos géneros (Bakker et al., 1987; Corratgé-Faillie et al., 2010; Gallagher et al., 2011).

2.3. Análisis de genes de interés implicados en la colonización.

Debido a la importancia de la colonización e infección radicular por parte de las bacterias y sus beneficios en la interacción planta-microorganismo (Zhang et al., 2019), se decidió realizar una búsqueda en el genoma de aquellos genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos, entre los que se encuentra la celulosa, y aquellos implicados en la producción y formación de biofilms, paso esencial en la colonización bacteriana (Chao et al., 2014).

2.3.1 Genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos.

Los polisacáridos son descritos como los componentes esenciales de las células en la formación de estructuras tridimensionales o biofilms, además influyen en su adhesión y protección (Limoli et al., 2015). Los polisacáridos permiten que las células bacterianas se cohesionen entre sí y se adhieran a las superficies. La adhesión facilita la colonización de las superficies permitiendo que las bacterias resistan tensiones y movimientos.

Los polisacáridos bacterianos secretados al exterior y conocidos como exopolisacáridos (EPSs) pueden dividirse según su composición química en diferentes grupos, aunque todos ellos están compuestos por la secuenciación repetida de monosacáridos (Birch et al., 2019). De forma general, los EPSs son requeridos tanto para el inicio y propagación de la colonización, como para la protección general de las bacterias (Kopycińska et al., 2018). Entre los EPS más comunes se destaca la celulosa, Pel, Psl o PIA (Limoli et al., 2015).

La biosíntesis de celulosa bacteriana desempeña un papel crucial en la colonización radicular (Robledo et al., 2012). Así pues, debido a los datos obtenidos de manera *in vitro* en apartados anteriores de la Tesis Doctoral, la búsqueda de los genes relacionados con la producción de celulosa resulta de gran interés.

Los genes implicados en la síntesis de celulosa bacteriana están próximos entre sí, localizados en un operón denominado *celABC* o *bcsABC*. El gen *celA* o *bcsA* codifica una celulosa sintasa y el gen *celB* o *bcsB* la subunidad B del complejo celulosa sintasa (Limoli et al., 2015). Esta subunidad posee un dominio de unión a di-GMP cíclico, que actúa como un regulador de la biosíntesis de celulosa (Römling y Galperin, 2015). Por último, el gen *celC* o *bcsC* codifica una β -1,4 glucanasa (EC. 3.2.1.4), que es una endoglucanasa de la familia 8 de las glucósido hidrolasas. Este operón está ampliamente distribuido entre el género *Rhizobium*, y ha sido descrito por su importancia en los procesos de infección y nodulación (Robledo et al., 2008, 2012).

Las cepas MACPV40 y PEPV40, presentaron en su genoma los genes *celA*, *celB* y *celC*. Sin embargo, en los otros dos genomas no se localizaron los genes que conforman el operón *celABC*. Sin embargo, en la cepa SCCPVE07 se detectó un gen que codifica la enzima endo- β -1,4 glucanasa (EC. 3.2.1.4) perteneciente a la familia glucósido hidrolasa 5 (GH5) (tabla 54). La familia GH5 junto a la familia GH9 son las principales enzimas celulolíticas involucradas en la hidrólisis de celulosa (Badiéyan et al., 2012).

Tabla 54: Porcentaje de similitud entre la secuencia aminoacídica de la endoglucanasa anotada en *B. halotolerans* SCCPVE07 con las secuencias disponibles en bases de datos públicas tras el uso de la herramienta BLASTp.

Función descrita	Especie bacteria	Similitud (%)
Glucósido hidrolasas Familia 5	<i>Bacillus halotolerans</i> SCCPVE07	100
Glucósido hidrolasas Familia 5	<i>Bacillus</i> sp. HB102	99.4
Glucósido hidrolasas Familia 5	<i>Bacillus halotolerans</i> NRRL B-41617	99.2
Glucósido hidrolasas Familia 5	<i>Bacillus halotolerans</i> NRRL B-41618	99.2

Los EPSs de muchas especies bacterianas están compuestos por succinoglicano y otros polisacáridos como celulosa o glucanos. El succinoglicano es un exopolisacárido compuesto por glucosa y galactosa en proporción 7:1, en cuya biosíntesis están involucrados los genes *exo* (Leigh y Walker, 1994). En las cepas MACPV40 y PEPV40 se localizaron los genes *exoQ*, *exoZ* y *exoF*. Además, se encontró el gen *nvdB* que codifica la enzima β -1,2 glucano cíclico sintasa (Ec 2.4.1.-), junto al gen *ndvA*, el cual codifica un transportador de membrana específico de este compuesto, que conforma parte de los polisacáridos extracelulares en numerosas especies del género *Rhizobium* (Breedveld et al., 1994).

En el caso de la cepa CDVBN10 se localizaron genes *Waa* (De Kievit y Lam, 1997) y los genes *YihG* y *YihE* (Figueroa-Bossi et al., 2006), ambos relacionados con la producción de lipopolisacáridos. Además, se observaron los genes que codifican 7 proteínas esenciales en su transporte (Lpt), localizadas en la membrana interna (LptBCFG), en el periplasma (LptA) y su membrana externa (LptDE), ambas fueron

descritas en *Escherichia coli* y en múltiples especies pertenecientes al género *Pseudomonas* (Bollati et al., 2015; Polissi y Sperandeo, 2014).

En el genoma de la cepa SCCPVE07 se localizaron genes relacionados con la producción de EPS (*yhxB* y el operón *epsA-O*), cuya función ha sido descrita en géneros como *Pseudomonas*, *Ralstonia* o *Bacillus* (Drummelsmith, 2000; Gerwig et al., 2014; Stout, 1996).

2.3.2 Genes relacionados con la producción de biofilms.

Como se ha explicado anteriormente, la colonización de la raíz por parte de las bacterias se considera un paso esencial en la interacción planta-microorganismo (Seneviratne et al., 2010). En este contexto, el desarrollo de biofilms aporta a las bacterias amplias ventajas frente al estilo de vida plantónico, tanto en condiciones normales como de estrés, además de suponer el punto de anclaje radicular (Ansari et al., 2018).

En la formación de los biofilms, además de la celulosa, están implicados otro tipo de polisacáridos bacterianos y moléculas involucradas en su formación y maduración (Romero y Kolter, 2011).

En ambas cepas del género *Rhizobium* se detectaron los genes *nod* los cuales han sido, desde hace décadas, descritos por la implicación en la formación y desarrollo de nódulos en leguminosas (Lerouge et al., 1990), pero también han sido descritos como necesarios en el establecimiento y formación de las estructuras tridimensionales de los biofilms (Fujishige et al., 2008).

Por otra parte, en las 4 cepas se localizaron genes que codifican las proteínas flagelares FlhP y FlgH, cuya delección desemboca en una disminución de la cantidad de biofilms bacterianos producidos en *Ensifer meliloti* (Fujishige et al., 2006).

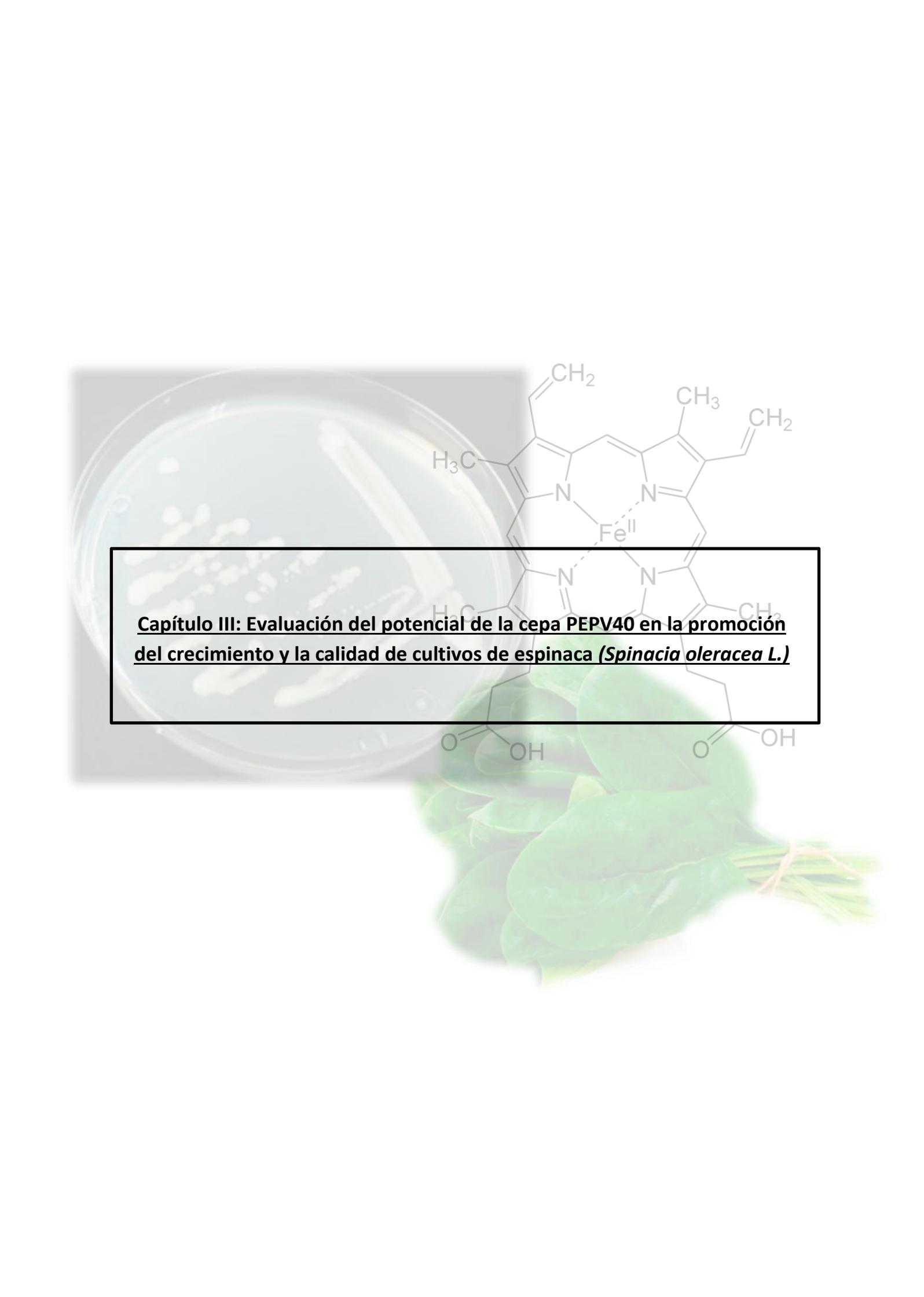
Se ha demostrado también como la adhesión y cohesión bacterianas dependen significativamente de la adhesina β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA) (Agladze et al., 2005), en el genoma de la CDVBN10 se localizaron todos los genes del operón Pga (*PgaA*, *PgaB*, *PgaC* y *PgaD*).

Respecto al género *Bacillus*, trabajos previos han descrito varios genes involucrados en la formación de biofilms (Branda et al., 2001; Hamon y Lazazzera, 2001; Hamon et al., 2004). Entre ellos se encuentran los genes involucrados en las etapas principales de la esporulación (*spoOA* y *abrB*), SpoOA regula AbrB, cuya función es esencial en la transición de una colonización basada en la generación de una monocapa a la formación de una estructura tridimensional. Ambos estos genes se localizan en el genoma de la cepa SCCPVE07.

Por otro lado, se ha descrito como el gen *tasA*, el cual codifica la proteína TasA es imprescindible en la formación de biofilm, ya que TasA es el componente proteico mayoritario de la matriz. Además, YqxM es una proteína importante en la localización

de TasA en la matriz (Branda et al., 2006). En el genoma de SCCPVE07 se localizó tanto el gen *tasA* como el gen *yqxM*.

Así pues, en este capítulo se detalla el análisis del potencial, que tienen los aislados en general y las 4 cepas seleccionadas en concreto, para la biosíntesis de fitohormonas, la producción de sideróforos, la síntesis de enzimas involucradas en la solubilización de elementos esenciales para la planta como fósforo o potasio, la biosíntesis de polisacáridos y otras sustancias implicadas en la colonización radicular. Por lo tanto, se pone de manifiesto de una forma *in vitro* e *in silico* el interés que tienen las cepas bacterianas seleccionadas para la promoción, desarrollo vegetal e interacción con cultivos de interés agroalimentario y bioenergético, tanto en condiciones normales como de estrés salino.



Capítulo III: Evaluación del potencial de la cepa PEPV40 en la promoción del crecimiento y la calidad de cultivos de espinaca (*Spinacia oleracea* L.)

Desde las últimas décadas, múltiples grupos de investigación desarrollan investigaciones en las que se determina y analiza el potencial de los microorganismos con capacidades promotoras del crecimiento vegetal en una amplia variedad de cultivos. Este tipo de biofertilización intenta evitar el uso excesivo de fertilizantes químicos, y con ello disminuir los efectos negativos tanto en la salud humana como en el medio ambiente (Pérez-Montaña et al., 2014).

En este contexto, la legislación actual de muchos países aboga por incluir este tipo de iniciativas dentro de sus políticas verdes. La Comunidad Europea es uno de los territorios que mayor número de medidas gubernamentales ha establecido con el fin de controlar y regular el mercado de los biofertilizantes (García-Fraile et al., 2017). En el caso de España, se permite que sean las administraciones autonómicas quienes establezcan los estándares mínimos. En concreto, Andalucía, la región española con mayor producción agrícola, ya permite la aplicación, en el suelo o en las semillas, de organismos que mejoren la nutrición vegetal, como aquellos pertenecientes a los géneros bacterianos *Rhizobium* o *Azotobacter* (Malusá y Vassilev, 2014).

Además de la promoción del crecimiento vegetal, se ha demostrado como este tipo de biofertilización puede mejorar el contenido y la concentración de sustancias bioactivas, como antioxidantes o vitaminas beneficiosas para la salud humana, en las especies vegetales de interés agroalimentario, incrementando así la calidad de los cultivos (Jiménez-Gómez et al., 2017).

Así pues, el uso de bacterias seguras para el medio ambiente y la salud humana es una alternativa eficaz y realista a los fertilizantes químicos, y su uso prolongado reporta una mejora en la fertilidad de las tierras de cultivo (Mahanty et al., 2017).

Por estas razones, en este capítulo se presentan los resultados de la interacción de plantas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y la cepa bacteriana *Rhizobium laguerreae* PEPV40, aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. y cuyo potencial *in vitro* e *in sílico* ha sido presentado anteriormente. Se eligió el cultivo de espinaca ya que es la hortaliza de hoja más vendida en España (para su procesado o congelación) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2017) y la cepa PEPV40 por pertenecer a un género bacteriano descrito como seguro, además de ser susceptible para ser usado en este tipo de fertilización en base a resultados previos descritos en la literatura científica.

De forma general, se observa que no solo existe una promoción del crecimiento tanto en los primeros estadios del desarrollo vegetal como un aumento significativo en condiciones de invernadero, sino que también se detecta una mejora en el análisis del contenido nutricional realizado en las hojas de espinaca inoculadas con la cepa PEPV40 respecto a las hojas del tratamiento control. Además, existe una colonización bacteriana significativa en las raíces, la cual aumentó respecto al tiempo.

1. Determinación de la producción de ácido indol-acético.

Dentro del grupo de las auxinas, el ácido indol-acético es una de las más estudiadas y analizadas en las interacciones planta-microorganismo (Duca et al., 2014). Esta hormona tiene un papel fundamental en el desarrollo de las plantas, influyendo en la elongación de los tallos, el desarrollo radicular y las raíces secundarias. La síntesis bacteriana de dicha auxina se lleva a cabo mayoritariamente a partir de L-triptófano, un aminoácido presente en los exudados de las raíces de las plantas (Ali et al., 2010). En el caso del género *Rhizobium* se ha visto cómo la adición exógena al medio de L-triptófano multiplica hasta diez veces la cantidad de ácido indol-acético producida (Bhattacharjee et al., 2012).

En la presente tesis doctoral la producción de ácido indol-acético por parte de la cepa *R. laguerreae* PEPV40 se analizó por dos métodos diferentes: un método colorimétrico semi-cuantitativo, basado en el crecimiento en medio JMM (Graham et al., 1989) y un método cuantitativo basado en la utilización de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En primer lugar, cuando la producción de esta fitohormona se analizó utilizando el medio JMM suplementado con L-triptófano se obtuvo un valor de 56.1 mg·L⁻¹, sin embargo, cuando el análisis se realizó por HPLC el valor de la producción descendió hasta 0.14 mg·L⁻¹.

Esta diferencia ya ha sido descrita en otros estudios los cuales también comparan ambos métodos (Crozier et al., 1988; Fuentes-Ramirez et al., 1993), y se debe a que el método colorimétrico no distingue ni diferencia entre los distintos tipos de auxinas, mientras que la cromatografía líquida de alta eficacia mide específicamente el ácido indol-acético (Wöhler, 1997).

En investigaciones previas se ha mostrado la relación directa entre la masa radicular y la concentración de ácido indol-acético producida por las bacterias utilizadas como bioinoculantes (Gumiere et al., 2014). Sin embargo, una producción elevada de esta auxina también se ha descrito en bacterias patógenas como *Pseudomonas savastanoi* o *Agrobacterium tumefaciens* durante la colonización y formación de agallas (Gohlke y Deeken, 2014; Spaepen et al., 2007).

Estos resultados concuerdan con los múltiples estudios de la promoción del crecimiento vegetal por parte de inoculantes bacterianos, en los que se ha detectado la producción significativa de esta hormona por parte de cepas bacterianas pertenecientes a diferentes especies del género *Rhizobium* como *R. tropici* CIAT 899 (Imada et al., 2017), *R. panacihumi* DCY116 (Kang et al., 2019), *R. phaseoli* GA1 (Atzorn et al., 1988), *R. etli* CNPAF512 (Spaepen et al., 2009), *R. leguminosarum* PEPV16 (Flores-Félix et al., 2013), *R. phaseoli* 8002 (Atzorn et al., 1988) o *R. lupini* RS110 (García-Rodríguez et al., 1982).

2. Determinación de la formación de biofilms *in vitro*.

La formación de biofilms es descrita como una de las estrategias bacterianas más comunes para colonizar ambientes y adherirse a distintos tipos de superficies (Romero y Kolter, 2011). Este modo de actuación permite a las bacterias colonizar superficies de naturaleza muy diversa, implicando genes involucrados en la síntesis de proteínas específicas, como las adhesinas, y exopolisacáridos (Wijman et al., 2007).

El análisis de la capacidad para formar biofilms por parte de la cepa PEPV40 fue llevado a cabo a través de un método cuantitativo que permite evaluar la capacidad para formar biofilms en superficies abióticas (Fujishige et al., 2006). Los resultados muestran que, como se observa en la figura 27, la formación de biofilms en las placas multipocillo aumentó respecto al tiempo de análisis.

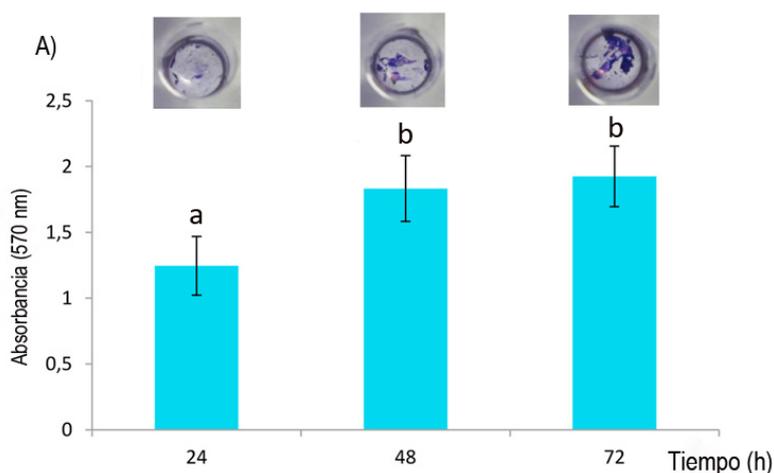


Figura 27: Producción de biofilms en superficies inertes por parte de la cepa *R. laguerreae* PEPV40. Se indica la producción de biofilms en 24, 48 y 72 horas en una superficie abiótica (placas multipocillo). Las barras de error indican el error estándar. Barras con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

Estos resultados concuerdan con la capacidad de formación de biofilms por parte de cepas bacterianas pertenecientes al género *Rhizobium* descrita anteriormente (Fujishige et al., 2006; Janczarek, 2011). Además, la misma tendencia de aumento respecto al tiempo también ha sido identificada en otros estudios con cepas del mismo género dentro de nuestro grupo de investigación, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 (Robledo et al., 2012), *R. leguminosarum* TPV08 (Diez-Mendez et al., 2015) y *Rhizobium* sp. PEPV12 (Jiménez-Gómez et al., 2016).

Dentro de la colonización radicular, la formación de biofilms supone una protección bacteriana frente a diferentes tipos de estreses, además de actuar como fuente de nutrientes o protección contra los posibles fitopatógenos de la rizosfera (Govindasamy et al., 2010). En este sentido, los resultados obtenidos por parte de la

cepa PEPV40 nos informan de la eficacia potencial en la colonización radicular de plantas de espinaca y la ventaja frente a otras rizobacterias.

3. Determinación de la producción de celulosa.

La capacidad bacteriana para la adhesión a las superficies está determinada, entre otros factores, por su habilidad para sintetizar polisacáridos, entre los que destaca la celulosa, descrita por su papel esencial en la adhesión a los pelos y superficie radicular (Davey y O'toole, 2000). Gracias a trabajos previos de nuestro grupo de investigación, hace más de dos décadas se detectó la producción de microfibrillas de celulosa por parte de cepas del género *Rhizobium* y su importancia en el proceso de colonización radicular (Mateos et al., 1995).

Aunque en el capítulo anterior se muestra la producción de exopolisacáridos de enlace β por parte de la cepa PEPV40, para poder determinar su naturaleza se realizó un ensayo de floculación, seguido de un ensayo enzimático (figura 28).

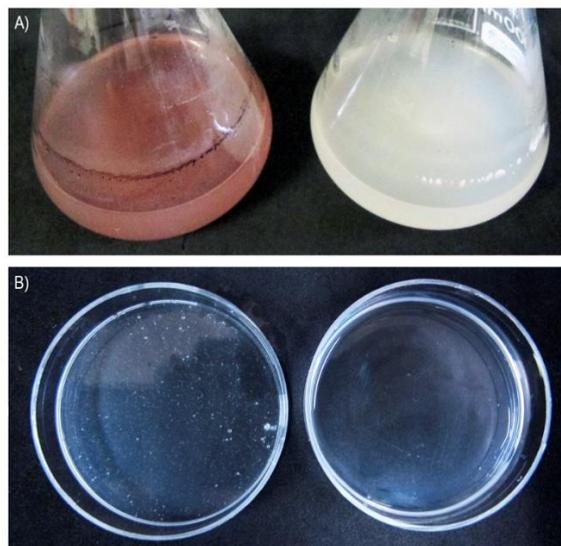


Figura 28: Ensayo de floculación realizado con la cepa *R. laguerreae* PEPV40. A) Crecimiento en YMB más Rojo Congo (izquierda) e YMB (derecha) tras 5 días de incubación. B) Tratamiento de los flóculos. Izquierda: flóculos sin tratar. Derecha: flóculos tratados con 10 U mL⁻¹ de celulasas comerciales de *Trichoderma viridae*. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

En primer lugar, la cepa PEPV40 creció por duplicado en medio YMB suplementado con Rojo Congo y medio YMB durante 5 días a 180 rpm y 28° C. Tras este periodo observamos la formación de flóculos bacterianos depositados en el fondo, así como un anillo en el interior del matraz (figura 28).

Con los flóculos obtenidos se realizó un ensayo enzimático, empleando celulasas de *Trichoderma viridae* (Sigma Co., USA). Estudios previos determinaron la eficacia de 10 U mL⁻¹ para la disgregación de los flóculos producidos por otras cepas de *Rhizobium* (Robledo et al., 2008). Los resultados muestran que los flóculos producidos se disgregan

con la presencia de las celulasas empleadas, por tanto, se determina que la composición del exopolisacárido producido por la cepa *R. laguerreae* PEPV40 es celulosa.

4. Análisis de la capacidad de colonización mediante microscopía óptica de fluorescencia.

La colonización bacteriana de las raíces de las plantas se describe como uno de los pasos clave en la interacción planta-microorganismo y la promoción del desarrollo vegetal (Compant et al., 2010; Hassan et al., 2019). En la presente tesis doctoral, para evaluar la capacidad de *R. laguerreae* PEPV40 para colonizar las raíces de plantas de espinaca se realizó un estudio mediante técnicas de microscopía óptica de fluorescencia, que permite la observación directa de bacterias que expresan una proteína verde fluorescente (GFP). Así pues, los ensayos fueron realizados con la cepa PEPV40_GFP, que contiene el plásmido pHC60, el cual contiene la secuencia que codifica una proteína fluorescente GFP. Como se explica en el apartado 7.1 de materiales y métodos, semillas de espinaca desinfectadas en superficie fueron inoculadas con la cepa PEPV40_GFP. Se llevó a cabo una observación microscópica de las raíces en un microscopio óptico con luz de fluorescencia en diferentes días post-inoculación (3, 5 y 7 dpi) (figura 29).

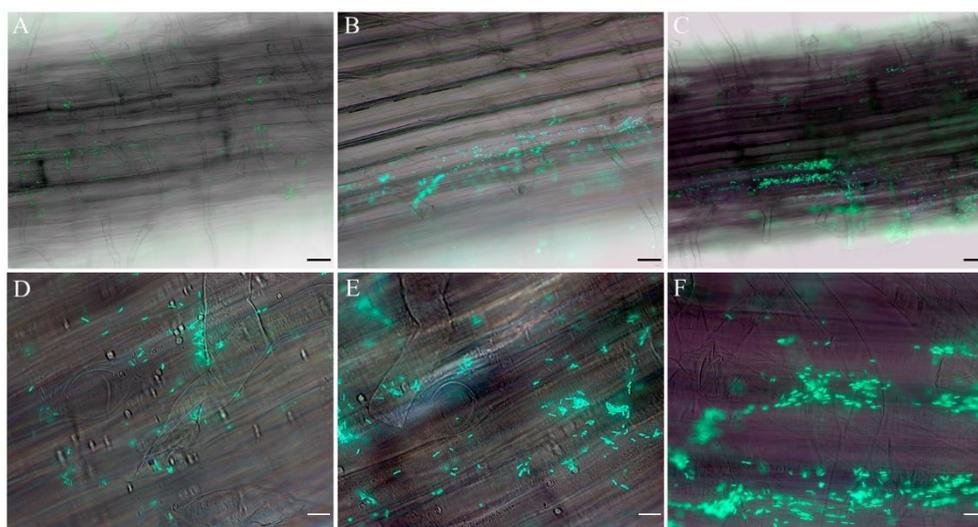


Figura 29: Evaluación de la capacidad de la cepa *R. laguerreae* PEPV40_GFP para colonizar raíces de espinaca. Se muestran las fotografías obtenidas a 3 (A, D), 5 (B, E) y 7 (C, F) días post inoculación. El tamaño de la barra de las figuras A, B y C representa 60 μm . El tamaño de la barra de las figuras D, E y F representa 12 μm . Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

Los resultados del ensayo de colonización mostraron un incremento del número de bacterias adheridas a la superficie radicular respecto al paso del tiempo, así como una colonización destacable en los espacios intercelulares. Además, se observaron inicios de formación de biofilms en los últimos días de análisis a lo largo de toda la superficie de la raíz.

El incremento de la colonización y el patrón anteriormente descrito ha sido observado previamente en otras cepas del género *Rhizobium* y en otros tipos de cultivos hortícolas. García-Fraile et al., (2012) mostraron que las cepas *R. leguminosarum* PETP01 y *R. leguminosarum* TPV08 se adhieren firmemente a la superficie de raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annuum*), colonizando además los espacios intercelulares. Por otra parte, Flores-Félix et al., (2013) describieron que la cepa de *R. leguminosarum* PEPV16 coloniza los espacios intercelulares de las células de la epidermis de raíces de lechuga (*Lactuca sativa*) y zanahoria (*Daucus carota*).

En este caso, los estudios realizados en la presente tesis doctoral describen por primera vez la colonización eficaz de una cepa perteneciente a la especie de *R. laguerreae* en raíces de espinaca (Jiménez-Gómez et al., 2018).

5. Análisis de la promoción del crecimiento.

Debido al potencial *in vitro* e *in silico* que presentó la cepa PEPV40, así como una colonización eficaz de las raíces, se decidió realizar ensayos de promoción vegetal, tanto en los primeros estadios, en condiciones de cámara iluminada, como ensayos en condiciones de invernadero. Como se explica en el apartado 7.1 de materiales y métodos, semillas de espinaca desinfectadas en superficie fueron inoculadas con la cepa PEPV40. El análisis de la promoción del crecimiento vegetal en los primeros estadios del desarrollo se realizó a diferentes días post inoculación (dpi), los mismos en los cuales se analizó la colonización (figuras 30 y 31).

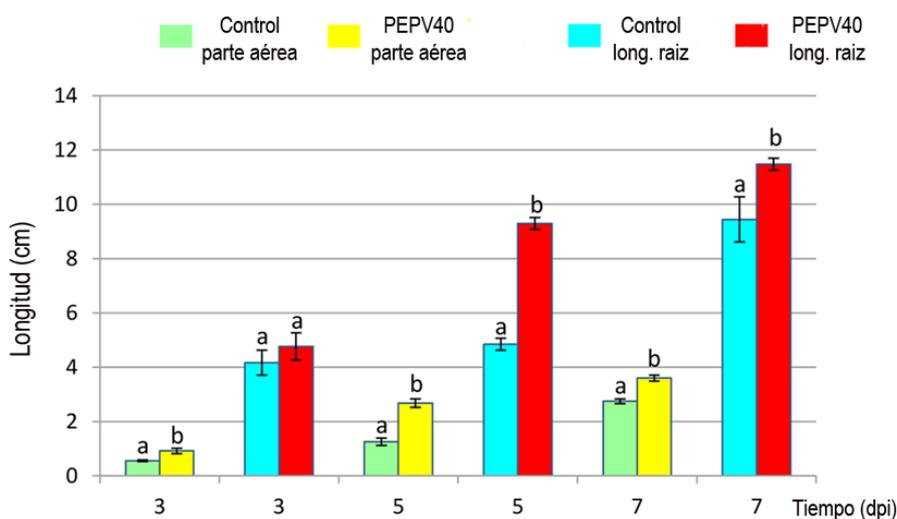


Figura 30: Evaluación del efecto de la inoculación de la cepa *R. laguerreae* PEPV40 en los primeros estadios del desarrollo vegetal de plantas de espinaca. Evolución de la longitud de la parte aérea y de la raíz. Barras indican el error estándar. Los histogramas con las barras y las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

Los resultados mostraron en general un mayor desarrollo, estadísticamente significativo, de las plantas inoculadas respecto a las plantas control en todos los días de análisis, excepto a los 3 dpi, cuyo desarrollo radicular fue mayor, pero no significativo. La promoción más destacable se describió a los 5 dpi, donde los valores de promoción alcanzan el 90% en el desarrollo radicular del tratamiento con la cepa PEPV40 respecto al tratamiento control. Este mayor desarrollo radicular confiere a las plantas beneficios destacables relacionados con la disminución de los efectos negativos del estrés térmico e hídrico, así como una mayor superficie de absorción de nutrientes y una mayor fijación al substrato (Pinto y Reynolds, 2015).

Al tratarse de un cultivo cuyo interés agroalimentario reside en las hojas comestibles, el desarrollo de la parte aérea es de suma importancia. Así pues, hay que destacar, que en todos los días de análisis las plantas inoculadas con la cepa PEPV40 mostraron un mayor desarrollo vegetal, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas pertenecientes al tratamiento control. Los resultados obtenidos destacan el potencial como probiótico vegetal que la cepa PEPV40 puede tener sobre cultivos de espinaca.

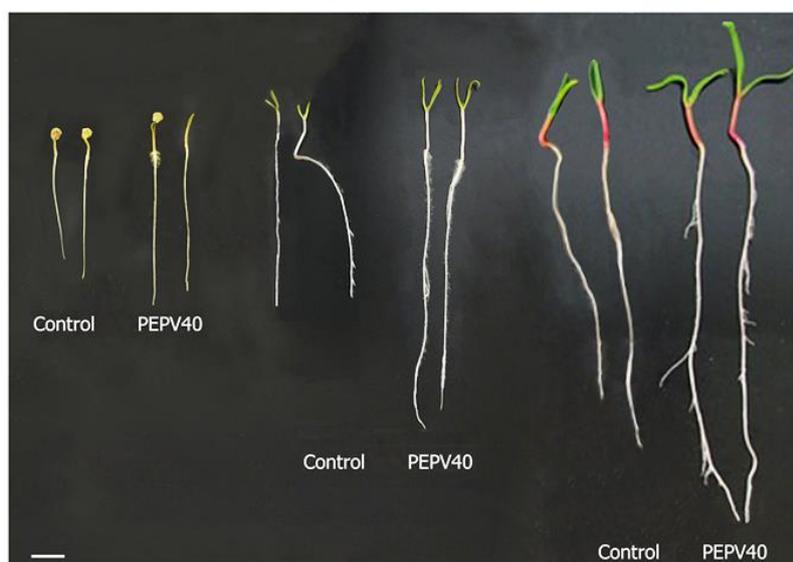


Figura 31: Evaluación del efecto de la inoculación de la cepa *R. laguerreae* PEPV40 en los primeros estadios del desarrollo vegetal de plantas de espinaca. Evolución de la longitud de la parte aérea y de la raíz. Se muestran ejemplares representantes de los tres días de análisis (izquierda = 3 dpi, centro = 5 dpi y derecha = 7 dpi). El tamaño de la barra representa 1 cm. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

En base a los resultados anteriores se realizó un ensayo en condiciones de invernadero. El sustrato utilizado en este caso fue una mezcla de vermiculita y turba (1:3) no estéril, las semillas de espinaca se desinfectaron en superficie y se pregerminaron siguiendo el mismo protocolo establecido en apartados anteriores.

Las espinacas son un alimento que puede ser consumido en diferentes estados del desarrollo vegetal. En primer lugar, y en base a la creciente moda de las hortalizas “baby” encontramos aquellas espinacas de menor tamaño, que llegan a alcanzar aproximadamente una longitud de hoja de hasta 8-10 centímetros en el momento de la recolecta. La otra categoría corresponde a plantas de un tamaño “adulto” superior al anteriormente mencionado. Así pues, el ensayo en invernadero se realizó analizando los datos cuando las plantas alcanzaron ambos tamaños. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 32 y 33.

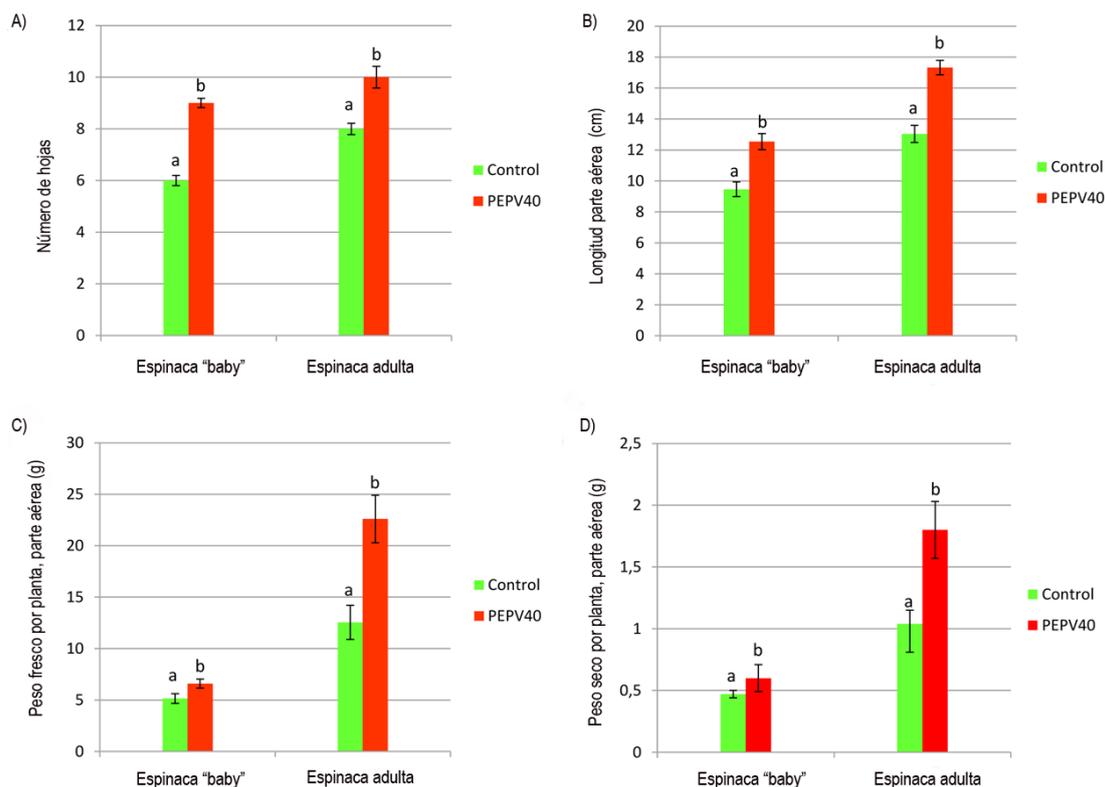


Figura 32: Promoción del desarrollo vegetal de plantas de espinaca en condiciones de invernadero. Número de hojas (A), longitud de la parte aérea (B), peso fresco de la parte aérea (C) y peso seco de la parte aérea (D). Las barras indican el error estándar. Los histogramas con las barras y las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

La inoculación de las plantas con la cepa PEPV40 mostró un desarrollo vegetal significativamente mayor en ambas medidas realizadas. En la figura 32 (A y B) se observa el aumento significativo en el número de hojas y longitud de la parte aérea, lo que se traduce también en un aumento del peso fresco y peso seco por planta (figura 32 (C) y D), respectivamente). El aumento en el número de hojas alcanzó valores superiores respecto al control de 50% y 25%, respectivamente, en las plantas inoculadas. El incremento observado en el peso seco fue, respecto al control, de 27.7% en el caso de las espinacas “baby” y 73.1% en el caso de las espinacas “adultas”.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios con cepas del mismo género, los cuales describen porcentajes de aumento similares en la parte aérea de otras plantas de interés agroalimentario como son la lechuga (Flores-Félix et al., 2013) o la rúcula (de Souza et al., 2016).

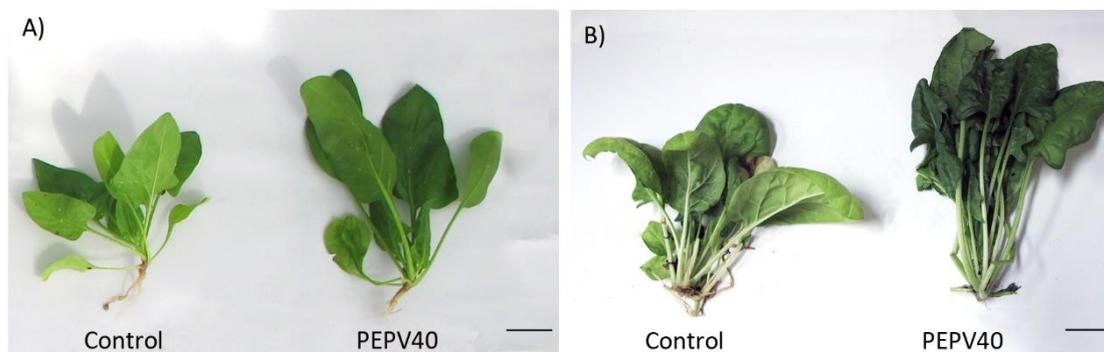


Figura 33: Promoción del desarrollo vegetal de plantas de espinaca en condiciones de invernadero. (A) Plantas de espinaca tamaño “baby”. (B) Plantas de espinaca tamaño “adulto”. El tamaño de las barras representa 270 mm. Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

Al tratarse de un cultivo cuya parte aérea es la consumida, la apariencia y aspecto que se aporta al consumidor es relevante. Así pues, una de las variables que se analizó es el contenido de clorofila en las hojas de ambos tratamientos, característica muy apreciada cuando se trata de cultivos de hojas verdes comestibles. Las plantas inoculadas presentaron valores significativamente superiores de clorofila (figura 34). Este incremento se traduce en un mayor color verde en las hojas. Además, la ingesta humana de clorofila provoca un aumento de la cantidad de hemoglobina en sangre, traduciéndose en una mejora de la circulación sanguínea y la oxigenación (Mairbäurl, 2013).

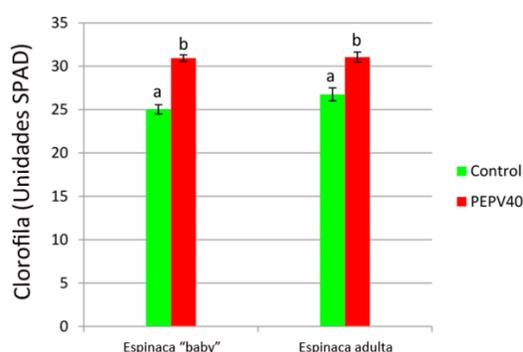


Figura 34: Análisis del contenido de clorofila en hojas (Unidades SPAD). Las barras indican el error estándar. Los histogramas con las barras y las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de Jiménez-Gómez et al., 2018.

Este aumento significativo coincide con el descrito por Cruz-González et al., (2017) en hojas de *Trifolium repens* tras la inoculación con las cepas NRTH2, NRTH6 y ATCC 14480, ambas pertenecientes también al género *Rhizobium* y en concreto a la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

En cuanto a cultivos de interés alimentario, Lee et al., (2005) describieron como la cepa 128C56G perteneciente a la especie *R. leguminosarum* es capaz de aumentar el contenido de clorofila en las hojas de plantas de lechuga crecidas tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés salino.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió realizar un análisis de micro y macronutrientes contenidos en sus hojas, así como su comparación y diferencia entre el tratamiento control y el tratamiento con la cepa PEPV40 (tabla 55).

Tabla 55: Resultado del análisis nutricional de las plantas de espinaca en condiciones de invernadero. Se muestran tanto las espinacas tamaño “baby” como las espinacas tamaño “adulto”.

Tratamiento	N (%)	P (%)	K (%)	Mg (%)	Ca (%)	Fe (%)
Espinacas “Baby”						
Control	2.2 ± 0.03 a	1.2 ± 0.03 a	7.7 ± 0.72 a	1.2 ± 0.13 a	1.3 ± 0.02 a	8.1 ± 1.30 a
PEPV40	2.4 ± 0.02 b	1.2 ± 0.03 a	7.5 ± 0.52 a	1.5 ± 0.17 a	1.4 ± 0.03 a	8.3 ± 0.63 a
Espinaca tamaño adulto						
Control	2.1 ± 0.13 a	1.5 ± 0.35 a	9.6 ± 0.89 a	1.1 ± 0.12 a	1.3 ± 0.14 a	6.8 ± 0.66 a
PEPV40	3.8 ± 0.12 b	1.6 ± 0.08 a	9.9 ± 0.43 a	1.2 ± 0.11 a	1.6 ± 0.32 a	8.5 ± 0.89 b

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher’s Protectec LSD (Least significant differences). Modificado de (Jiménez-Gómez et al., 2018).

El contenido de nitrógeno en plantas de espinaca de tamaño “adulto” inoculadas con la cepa PEPV40 respecto a las plantas del tratamiento control alcanzó un aumento del 80.1%. Este aumento significativo ya se ha observado y descrito en cultivos de tomate, pimiento, lechuga y zanahoria (Flores-Félix et al., 2013; García-Fraile et al., 2012) los cuales fueron inoculados con diferentes cepas y especies del género *Rhizobium*.

Estos resultados sugieren que los rizobios, que aumentan el contenido de nitrógeno de las leguminosas a través de la fijación simbiótica de nitrógeno, también pueden aumentar el contenido de este elemento en plantas no leguminosas a través de la promoción y del desarrollo radicular, que favorece la absorción de nutrientes del suelo (Dent y Cocking, 2017).

En todos los elementos analizados las plantas de espinaca inoculadas presentaron valores superiores respecto al control. Se ha demostrado que el incremento de nutrientes no es homogéneo, presentando diferencias entre las diferentes variables analizadas (Esitken et al., 2010). En la mayoría de los casos los elementos que muestran

un incremento son aquellos sobre los que las bacterias hacen mayor incidencia a través de sus aptitudes potenciales PGPR, como la solubilización de fosfato o la producción de sideróforos. Así pues, las mayores diferencias suelen aparecer, entre otras, en el contenido de fósforo o hierro, siendo estos elementos de vital importancia para el desarrollo vegetal (Gravel et al., 2007; Orhan et al., 2006).

Estos resultados concuerdan con los análisis nutricionales realizados en otras plantas de interés agroalimentario tras la inoculación con cepas del género *Rhizobium*. Flores-Félix et al., (2013) también describen un aumento en las concentraciones de hierro, nitrógeno, fósforo y magnesio, tanto en la parte comestible de plantas de lechuga como en las hojas de plantas de zanahoria, todo ello tras la inoculación con la cepa *R. leguminosarum* PEPV16. De Souza et al., (2016) describen como la aplicación de las cepas de *R. leguminosarum* E15 y L5 aumentan significativamente en las hojas de rúcula la concentración de potasio, fósforo y nitrógeno.

En otro tipo de cultivos como son los cereales, también se ha observado un aumento significativo en las concentraciones de determinados elementos tras la aplicación de cepas del género *Rhizobium*. Naher et al., (2009) señalan un aumento en la concentración de nitrógeno en plantas de arroz, además de un incremento significativo en el desarrollo de la parte aérea. En cultivos de trigo, Afzal y Bano (2008) describen un aumento significativo en el contenido de fósforo de la parte aérea tras la inoculación con *R. leguminosarum* Thal8, sin embargo, el mayor contenido fue obtenido cuando se inoculó junto a la cepa *Pseudomonas sp.* 54RB.

Dentro de los compuestos con mayor interés analizados en la evaluación del contenido nutricional se encuentran los ácidos fenólicos, los cuales representan uno de los grupos de metabolitos secundarios producidos por las plantas con mayor relevancia en la salud humana, el desarrollo de los cultivos y la disminución de los efectos derivados tanto de estreses bióticos como abióticos (Jaganath y Crozier, 2009; Kisa et al., 2016; Mandal et al., 2010).

En concreto, el ácido cafeico, precursor del ácido ferúlico, interviene en la síntesis de lignina e interactúa con las especies reactivas de oxígeno (Riaz et al., 2018). Además, varios estudios demuestran la significativa incidencia en la disminución del crecimiento y desarrollo de distintas líneas de células tumorales (Kuo et al., 2015; Rosendahl et al., 2015).

En este sentido, se analizó el contenido de ácido cafeico y ferúlico de las hojas de ambos tratamientos en las espinacas de tamaño adulto. Como se puede observar en la tabla 56, los valores pertenecientes al tratamiento inoculado presentan valores superiores al tratamiento control en el contenido de ácido cafeico. Sin embargo, también ocurre la situación contraria, la mayor concentración de ácido ferúlico se encuentra en el tratamiento control.

Tabla 56: Resultado del análisis nutricional de las plantas de espinaca en condiciones de invernadero. Se muestra el contenido de ácido cafeico y ácido ferulico. Los valores se muestran en nanogramos por gramo de muestra. Se estableció la cantidad de < 3 ng/g como límite de detección. (n.d= no detectado).

Tratamiento	Ácido Cafeico	Ácido ferúlico
Control	n.d	21.2 ± 0.11 a
PEPV40	51.03 ± 0.66	8.3 ± 1.74 b

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

La biosíntesis del ácido ferúlico se realiza a través del ácido cafeico, cuyo proceso está mediado por la enzima 3-O-metiltransferasa [EC 2.1.1.68], la cual no se detectó en el análisis *in silico* del genoma de la cepa PEPV40. Sin embargo, sí que se detectaron varios genes involucrados en pasos anteriores en la ruta de síntesis de compuestos fenilpropanoides. Además, la cepa PEPV40 contiene en su genoma la información necesaria para la biosíntesis de la enzima trans-hidratasa-feruloyl-CoA, involucrada en la producción de ácido vainílico a partir del ácido ferúlico como sustrato (Leonard et al., 2006).

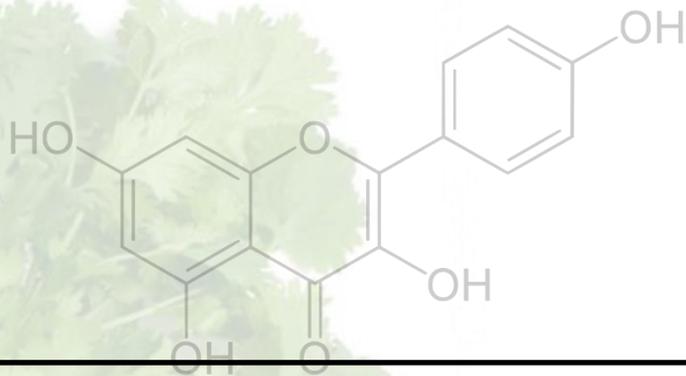
Así pues, se sugiere que los resultados observados en la concentración del ácido cafeico y ácido ferúlico pueden deberse en primer lugar a las enzimas producidas por el microorganismo e involucradas en la ruta de biosíntesis del precursor o, por otro lado, a la maquinaria genética de la cepa PEPV40 para reaccionar con el ácido ferulico y continuar con las reacciones sucesivas de la ruta del ácido vainílico.

De forma global, es relevante destacar que la suma total de ambos compuestos en el tratamiento con la cepa PEPV40 supera al tratamiento control presentando un valor significativamente superior (más del 50 %), lo que confiere un valor extra a la inoculación con la cepa de estudio.

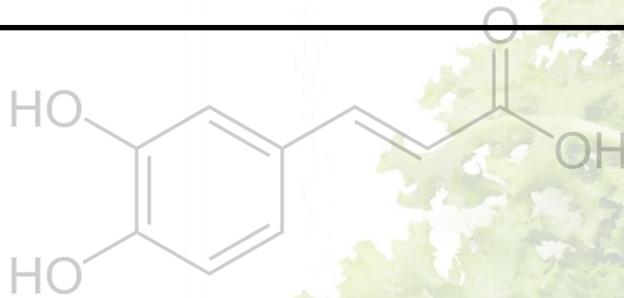
Aunque son muy escasos, también existen en la literatura científica trabajos en los cuales se ha analizado la interacción o relación de diferentes cepas del género *Rhizobium* con especies vegetales pertenecientes a la familia de las amarantáceas, a la que pertenece la espinaca. Mora-Ruiz et al., (2015) mostraron que la especie *R. tarimense* es un endófito de diferentes plantas halófitas de la subfamilia *Salicornioideae*, sin embargo, de las 5 zonas de España y Chile muestreadas solo se describió la presencia de esta especie del género *Rhizobium* en una de ellas, Ses Fontenalles (España). Ortuño et al., (2014) realizaron un estudio de la biodiversidad bacteriana asociada a plantas de quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivadas en diferentes lugares del altiplano boliviano. En este estudio se describen diferentes cepas del género *Rhizobium* como endófitos de quinoa, además de ser cepas solubilizadoras de fosfato y productoras de sideróforos. Por otro lado, Sene et al., (2012) analizaron la biodiversidad de suelos donde se habían

plantado diferentes especies de la familia de las amarantáceas, y observaron que más del 80% de los aislados correspondían al grupo *Bradyrhizobium-Mesorhizobium-Rhizobium*.

En general, los resultados obtenidos en este capítulo III ponen de manifiesto que existe una interacción beneficiosa y positiva entre la cepa *Rhizobium laguerreae* PEPV40 y la espinaca (*Spinacia oleracea* L.). Además, debido a su potencial y su capacidad promotora del crecimiento vegetal se abre la posibilidad al estudio y análisis de la interacción con otras especies vegetales de interés agroalimentario como el cilantro o la escarola o incluso bioenergético como la colza.



Capítulo IV: Evaluación del potencial de las cepas PEPV40, SCCPVE07 Y CDVBN10 en la promoción del crecimiento y la calidad de cultivos de escarola (*Cichorium endivia* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.) en condiciones normales y de estrés salino.



Tras el análisis de la secuenciación de amplicones y el culturoma realizado en el capítulo I, se comprobó que el género *Rhizobium* es el mayoritario en los nódulos de *P. vulgaris* L. El estudio de la diversidad de la familia Rhizobiaceae asociada a los nódulos proporciona información sobre las relaciones existentes entre huésped y hospedador, además, sirve como fuente potencial de aislamiento de cepas promotoras del crecimiento vegetal para una gran variedad de cultivos (Martínez-Romero, 2003), los cuales pueden ser biofertilizados con estas cepas sin desencadenar efectos negativos asociados, ya que se trata de un género seguro para el medio ambiente y la salud humana (García-Fraile et al., 2012).

Por otro lado, tras el análisis del culturoma y la secuenciación de amplicones de raíces de *B. napus* L. se comprobó la amplia relación entre este cultivo y una gran diversidad de especies bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Un género bacteriano que también ha sido descrito por sus efectos en las relaciones planta-microorganismo, ya sea como promotor del desarrollo vegetal o su papel como agente de biocontrol (Aw et al., 2019; Pliego et al., 2019).

Sin embargo, dentro de los múltiples estudios realizados con especies bacterianas promotoras del crecimiento y desarrollo vegetal encontramos otros géneros distintos, como *Bacillus*, en cuyas investigaciones se demuestra la habilidad para mitigar los efectos en los cultivos producidos por estreses de tipo tanto abiótico como biótico (Kashyap et al., 2019; Zafar et al., 2019). Además, en el análisis realizado en el capítulo I se observó una presencia significativa de especies de este género en ambos cultivos.

En este contexto, hay que destacar la diversa problemática medio ambiental a la que la agricultura actual se debe de enfrentar. La salinidad es uno de los problemas cuyos efectos son más devastadores y, desembocan en una gran disminución de la producción agrícola, disminución que se ve acentuada con los efectos del cambio climático (Machado y Serralheiro, 2017).

Se calcula que en el año 2050 más del 50 % de las tierras cultivables en la Tierra estarán afectadas por problemas serios de salinidad (Chauhan et al., 2019). La salinidad del suelo afecta aproximadamente a 1 millón de hectáreas en la Unión Europea, principalmente en los países mediterráneos, en los cuales los efectos de la desertificación son más notables y severos. En España, hoy en día están afectadas seriamente alrededor del 3 % de las hectáreas dedicadas a la agricultura, mientras que otro 15 % está en grave riesgo (Machado y Serralheiro, 2017).

La salinidad del terreno agrícola reduce significativamente las producciones y cosechas de la mayoría de los cultivos, sobre todo de aquellos con baja tolerancia. Sin embargo, en el contexto actual se requiere un aumento sustancial de la producción de cultivos hortícolas y herbáceos, que incluyan porciones comestibles como hojas, tallos, brotes o tubérculos. De hecho, este tipo de cultivos juega un rol importante en la

nutrición y salud humana, al tratarse de fuentes excepcionales de vitaminas, antioxidantes y minerales, cuya ingesta reducida desemboca en trastornos nutricionales comunes (Machado y Serralheiro, 2017). Entre estos cultivos se encuentran el cilantro y la escarola, cultivos herbáceo y hortícola, respectivamente, sensibles a la salinidad de los suelos y de relevante importancia económica.

El cilantro es una planta cuyo interés no es solo alimentario sino también medicinal, debido a la alta composición de compuestos bioactivos como antioxidantes o sus propiedades antimicrobianas descritas ampliamente en la bibliografía científica (Laribi et al., 2015). Es un cultivo sensible a la salinidad del suelo (Shannon y Grieve, 1999) y a día de hoy, uno de los cultivos aromáticos más demandados mundialmente tanto en agricultura convencional como ecológica (Pacheco et al., 2016).

Por su parte, la escarola es un cultivo hortícola ampliamente demandado desde los últimos años, ya que su alto contenido en agua (94 %), su elevado contenido en vitaminas y minerales, y su escaso valor calórico hacen que este alimento sea ampliamente consumido (Papetti et al., 2008). Además, cabe destacar el alto contenido en compuestos fenólicos, metabolitos secundarios vegetales con destacada importancia en la resistencia hacia estreses bióticos y abióticos (El-Shafey y Abdelgawad, 2014).

En este sentido, el aumento de la salinización del suelo requiere la introducción de variedades más tolerantes, sin embargo, su desarrollo a través de tecnología transgénica es de elevada dificultad, requiriéndose mucho tiempo hasta la consecución de los objetivos (Kumari et al., 2009). Por tanto, teniendo en cuenta estos factores, se han de plantear nuevas alternativas para conseguir la producción agrícola demandada. Entre estas iniciativas se encuentra el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas que sean capaces de mitigar los efectos de la salinidad en los cultivos y poder así mantener las producciones requeridas.

Hay que destacar que la búsqueda de un biofertilizante multifuncional es una labor que no siempre cumple ni satisface todos los objetivos propuestos, ya que, una misma cepa no suele presentar la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de diferentes tipos de cultivo debido a su incapacidad para interactuar correctamente (Grobelač et al., 2015).

Hasta la fecha, y a pesar de la importancia económica y alimentaria destacada, existen escasos trabajos científicos donde se haya analizado la mejora tanto en el desarrollo vegetal como en el contenido nutricional de cultivos de cilantro y escarola tras la inoculación con bacterias PGPR.

Así pues, en la presente Tesis Doctoral se seleccionaron tres cepas de diferentes géneros, *Rhizobium laguerreae* PEPV40, *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 y *Bacillus halotolerans* SCCPVE07, las cuales presentaron los mejores resultados y el perfil más completo de mecanismos de promoción de crecimiento *in vitro*. Además, el análisis

in silico de sus genomas, realizado y descrito en capítulos anteriores, puso de manifiesto su posible potencial como bacterias promotoras del desarrollo vegetal incluso bajo condiciones de estrés salino.

1. Estudio de la colonización de las cepas PEPV40, SCCPVE07 y CDVBN10 en raíces de escarola y cilantro mediante técnicas de microscopía electrónica.

Mediante técnicas de microscopía óptica de fluorescencia, se analizó, a los 7 y 14 dpi, la colonización bacteriana en raíces de ambos cultivos. Con el objetivo de inducir y aumentar el contraste entre las células vegetales y bacterianas se utilizó yoduro de propidio (Montes-Berrueta et al., 2012). Las cepas PEPV40 y CDVBN10 fueron conjugadas con el plásmido pHc60, el cual, como se ha explicado anteriormente, contiene un gen que codifica una proteína verde fluorescente *GFP*, así pues, podemos localizar *in situ* las bacterias en la superficie radicular. Sin embargo, las raíces de escarola y cilantro inoculadas con la cepa SCCPVE07 fueron sometidas a un proceso de inmunolocalización, utilizando anticuerpos policlonales comerciales anti-uricasa, ya que la uricasa es una enzima muy conservada dentro del género *Bacillus* (Torres, 2007).

De forma general, y para ambos cultivos, la colonización fue eficaz en los dos días de análisis, siendo a los 14 dpi donde se observó, con las tres cepas de estudio, una mayor colonización radicular, tanto de la raíz principal como de los pelos radiculares.

La colonización de las raíces de cilantro por parte de la cepa CDVBN10 (figura 35) presentó patrones similares en los dos días de estudio, ya que desde los 7 dpi se observó una colonización eficaz y extendida a lo largo de toda la raíz principal. A los 14 dpi se apreció una amplia colonización general, con una formación destacable de biofilms en la base de los pelos radiculares, patrón que fue encontrado en toda la superficie radicular. En el caso de la cepa PEPV40 la colonización observada fue más discreta (figura 35). A los 7 dpi se observó la formación de pequeños cúmulos bacterianos en zonas aisladas, detectándose, por tanto, una colonización localizada y dispersa. Este patrón fue similar al presentado a los 14 dpi, sin embargo, estas formaciones se hicieron más abundantes a lo largo de toda la superficie radicular. La cepa SCCPVE07 presentó a los 7 dpi una colonización dispersa e irregular (figura 35), con pequeñas acumulaciones que indican el inicio de la formación de biofilms. Por el contrario, a los 14 dpi se observó una colonización muy eficaz y extensa, con multitud de acumulaciones en la base de las zonas de emergencia de raíces secundarias, patrón que se repitió a lo largo de toda la raíz principal desde la zona apical hasta la parte superior.

En el caso de la escarola (figura 36) los patrones de colonización por parte de las cepas de estudio fueron similares, aunque con alguna mejoría destacable. En el caso de la cepa CDVBN10, la colonización presentada en este cultivo fue prácticamente igual, grandes cúmulos bacterianos y extensas formaciones de biofilms a lo largo de toda la superficie radicular y en los dos días de análisis. A los 7 dpi ya se observó una

colonización eficaz en la zona de emergencia de las raíces secundarias. La colonización por parte de la cepa PEPV40 fue diferente a la presentada en plantas de cilantro, en este caso, en ambos días de análisis se observó la formación de cúmulos irregulares y extensos, además de múltiples formaciones de biofilms a lo largo de toda la superficie radicular desde el extremo apical. En ambos días se observó también una colonización que seguía perfectamente el patrón geométrico de las células epidérmicas de la raíz colonizando ampliamente las depresiones entre las mismas. A los 7 dpi y por parte de la cepa SCCPVE07 la colonización analizada fue dispersa, con la formación de pequeños biofilms en la superficie radicular y en ocasiones entre los pelos radiculares. Por el contrario, a los 14 dpi la colonización fue abundante y muy eficaz, se mostró la formación de grandes estructuras tridimensionales por toda la raíz, con gran incidencia en la base de las zonas de emergencia de raíces secundarias, así como en los espacios intercelulares.

La colonización radicular es descrita como un paso clave por parte de las bacterias con capacidades para promocionar el crecimiento vegetal, la adhesión bacteriana es requerida para la producción de múltiples metabolitos relacionados con esta mejora, como son la biosíntesis de fitohormonas o la habilidad para absorber nutrientes (Compant et al., 2010).

Como se ha observado, la colonización radicular por parte de las bacterias difiere entre los cultivos. El desarrollo y presencia de una colonización eficaz está determinado por factores diversos como son la producción de exopolisacáridos, tasa de división celular o la capacidad de respuesta ante estímulos (Poonguzhali et al., 2007), además de los mecanismos de captación de exudados radicuales (Glick, 2014), o las diferencias en la síntesis de enzimas líticas (Robledo et al., 2012).

Estos resultados concuerdan con los observados en el capítulo II, donde por un lado se observaron genes implicados en la formación de biofilms y por otro, en ambas cepas se observó una alta producción de celulosa, polímero descrito por su importancia en la adhesión bacteriana y colonización radicular (Augimeri et al., 2015; Robledo et al., 2012; Tan et al., 2016).

El patrón observado en la cepa CDVBN10 ya ha sido descrito con anterioridad en otro tipo de cultivos por parte de cepas del mismo género. En este caso, Gamalero et al., (2004) describieron una colonización eficaz y similar en raíces de plantas de tomate por parte de una cepa de la especie *Pseudomonas fluorescens*.

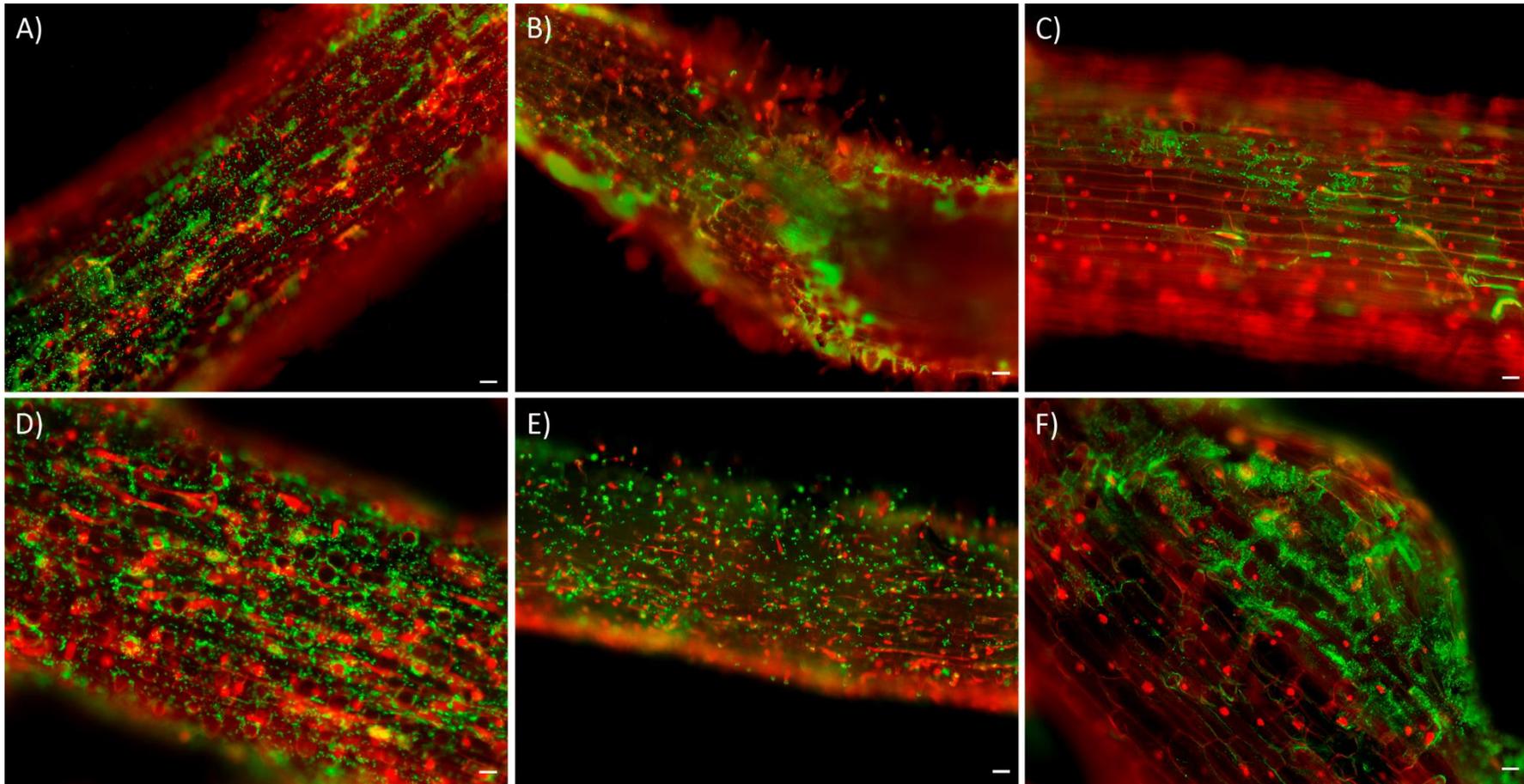


Figura 35: Microscopia de fluorescencia de raíces de cilantro inoculadas con las cepas seleccionadas CDVBN10_GFP (A y D), PEPV40_GFP (B y E) y SCCPVE07 (C y F). Raíces teñidas con ioduro de propidio (10 μ M). A), B) y C) corresponden a los 7 dpi y D), E) y F) a los 14 dpi. Las barras de las fotografías C), D) y F) corresponden a 100 μ m, las de las fotografías A), B) y E) a 200 μ m.

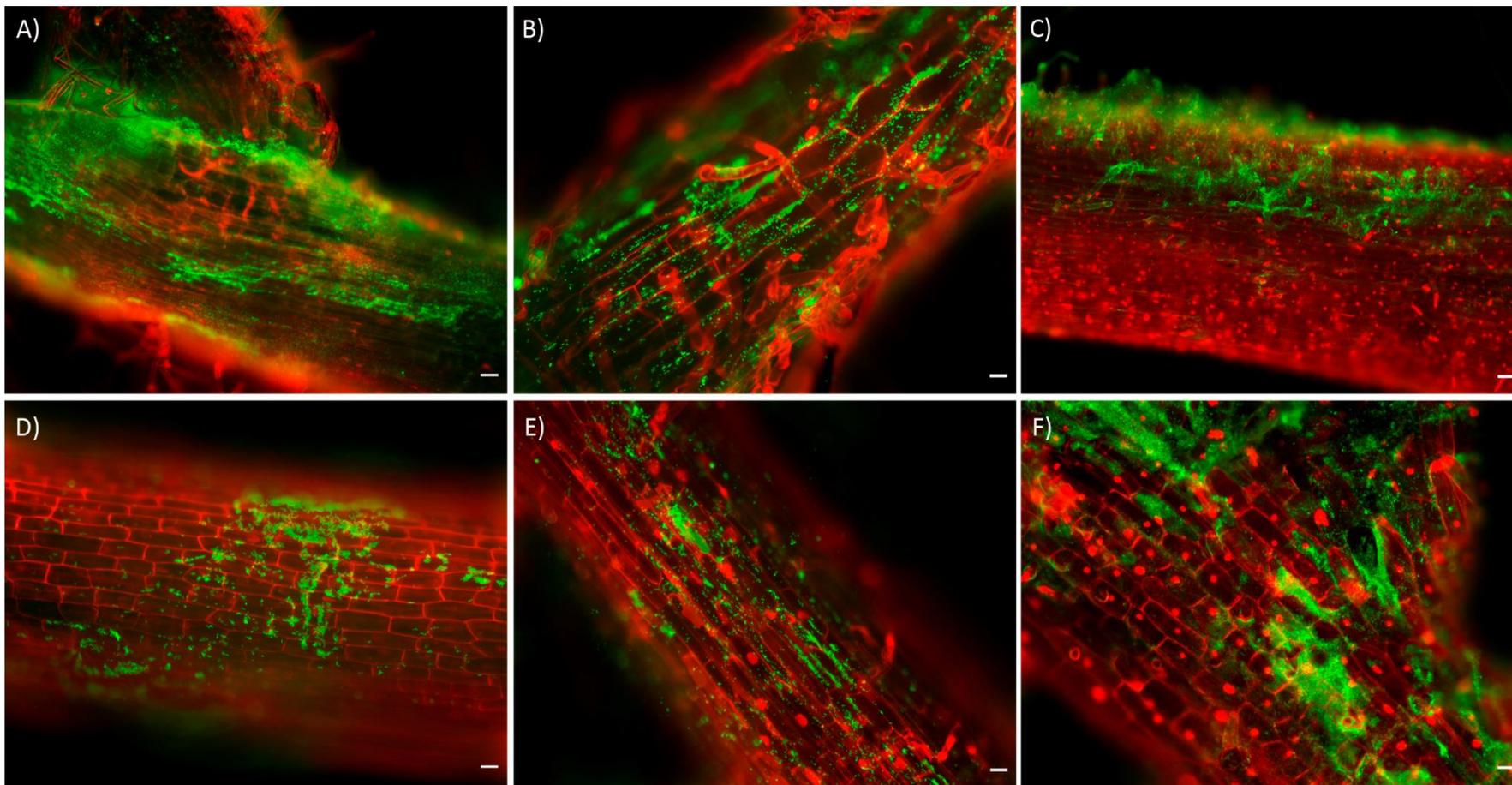


Figura 36: Microscopia de fluorescencia de raíces de escarola inoculadas con las cepas seleccionadas CDVBN10_GFP (A y D), PEPV40_GFP (B y E) y SCCPVE07 (C y F). Raíces teñidas con ioduro de propidio (10 μ M). A), B) y C) corresponden a los 7 dpi y D), E) y F) a los 14 dpi. Las barras de las fotografías B), D), E) y F) corresponden a 100 μ m, las de las fotografías A) y C) a 200 μ m.

En el caso del género *Rhizobium*, Mitra et al., (2016) también han descrito un patrón similar de colonización al descrito en esta Tesis Doctoral, en raíces de otros cultivos como *Sesbania cannabina* L. y *Oryza sativa* L., donde se observa en ambas una colonización eficaz de la superficie radicular y las bases de las zonas de emergencia de raíces secundarias.

Hasta la fecha no existen estudios que analicen la colonización radicular por parte de cepas pertenecientes a la especie *Bacillus halotolerans*, pero patrones similares a los descritos en la presente Tesis Doctoral han sido observados en cepas pertenecientes a otras especies del género *Bacillus*. Liu et al., (2006) describieron que la colonización de cultivos de maíz y arroz por parte de la cepa *Bacillus megaterium* C4 seguía un patrón similar, formación de biofilms a lo largo de toda la raíz con especial incidencia en los espacios intercelulares, así como en las zonas de elongación de la raíz o zonas de emergencia de raíces secundarias.

2. Análisis de la promoción del crecimiento bajo condiciones normales y de estrés salino inducido.

2.1 Ensayo en cámara iluminada.

A la vez que se analizó la colonización de las raíces por parte de las tres cepas se estudió el efecto en el crecimiento en las primeras etapas del desarrollo vegetal tras la respectiva inoculación con las cepas de estudio.

A los 30 dpi se analizó la longitud, el peso húmedo y el peso seco de la parte aérea. Para analizar el efecto de la salinidad en la capacidad de promoción del crecimiento de las cepas, se llevaron a cabo dos experimentos en paralelo. En primer lugar, se dispuso de plantas de cilantro y escarola crecidas en vermiculita estéril, las cuales fueron regadas con una solución nutritiva (Fahräeus). Por otra parte, se realizó una batería de plantas de cilantro y escarola, crecidas en el mismo tipo de sustrato y al mismo tiempo, pero que fueron regadas con una solución nutritiva salina (Fahräeus-100mM NaCl). En ambos tratamientos se dispusieron y colocaron las plantas inoculadas con las cepas mencionadas anteriormente. Las tres cepas se inocularon de forma independiente para su respectivo tratamiento. Además, plantas de ambos cultivos sin inocular se trataron como tratamientos control.

Tanto para las plantas crecidas en condiciones normales como para las que habían sido sometidas a estrés salino, se observó, de forma general, un incremento estadísticamente significativo en los parámetros evaluados en las plantas inoculadas frente a aquellas correspondientes a los tratamientos control (tablas 57 y 58, figuras 37 y 38).

En primer lugar, en las plantas de cilantro crecidas en condiciones normales, se observó un incremento en la longitud de la parte aérea en las plantas inoculadas con las

tres cepas. Sin embargo, los mejores valores fueron observados con las cepas CDVBN10 y SCCPVE07, un 14 % y 21 % más respecto al control, respectivamente. Los valores de peso húmedo y peso seco fueron estadísticamente superiores con las tres cepas, llegando a alcanzar hasta un 48 % más en el peso seco respecto al control con la cepa SCCPVE07.

En el caso de las plantas de cilantro regadas con solución salina se obtuvieron resultados similares. Las plantas inoculadas con las cepas presentaron incrementos estadísticamente significativos en las variables peso húmedo y peso seco de la parte aérea. En cuanto a los valores de longitud de parte aérea, estos sólo se vieron mejorados de forma significativa con la inoculación de las cepas PEPV40 y SCCPVE07.

En cuanto a las plantas de escarola hay que destacar que la diferencia entre los valores de las plantas del tratamiento control y las plantas inoculadas fue ligeramente más discreta que en el caso del cilantro, pero siempre superior. En condiciones normales y en las tres variables, las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 mostraron valores estadísticamente significativos y mayores que las plantas control. En cambio, en condiciones de salinidad los mejores valores se obtuvieron con las cepas PEPV40 y SCCPVE07 en las variables peso húmedo y peso seco de la parte aérea.

Analizando los datos, se destaca y resalta un aumento general de los valores obtenidos en las variables de las plantas crecidas bajo estrés salino respecto a las plantas crecidas en condiciones normales. Este fenómeno fue nombrado hace décadas como "*osmotic priming seeds*" (Khan, 1992), que describe una mejoría en el desarrollo vegetal de semillas y plantas en las primeras fases de crecimiento. Este fenómeno se debe al cambio en el pH del medio y la correspondiente aceleración metabólica, que desemboca en una mayor rapidez de crecimiento. Sin embargo, la incidencia del estrés salino duradero genera la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales causan, entre otros múltiples efectos, una disminución del contenido en clorofila, un daño en la actividad meristemática y, por tanto, una reducción en el desarrollo vegetal (Habib et al., 2016).

Algunos autores ya han descrito la mejora en el crecimiento vegetal en los primeros estadios de plantas de cilantro tras la inoculación con bacterias PGPR. Warwate et al., (2017) muestran una mejora, pero discreta, en la longitud radicular y de la parte aérea con inoculaciones simples o combinadas de cepas pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Anandaraj y Bini (2011) extienden sus experimentos bajo condiciones de invernadero, en diferentes regiones y tipos de suelo, inoculando dos cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Microbacterium*. En cuanto a la mitigación de los efectos sobre algún tipo de estrés, Farahani et al., (2008) describieron un aumento en la captación de agua por parte de plantas de cilantro inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares bajo estrés hídrico. Sin embargo, hasta la fecha, la presente Tesis Doctoral muestra por primera vez los efectos de cepas del

género *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus* en el crecimiento y desarrollo de plantas de cilantro sometidas a estrés salino.

En el caso de la escarola (*C. endivia*) y hasta la fecha, no existen estudios que describan un efecto beneficioso por parte de bacterias PGPR. Sin embargo, Stanojković-sebić et al., (2018) analizan y muestran un aumento y una mejora nutricional de plantas de Radicchio (*C. intybus*), del mismo género, tras la inoculación con bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*. En esta último cultivo, Bratkova et al., (2012) analizan la elevada presencia de diferentes especies del género *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) en la rizosfera y lo relacionan con la solubilización bacteriana de fosfato, debido a la alta deficiencia de este elemento en las zonas muestreadas.

Los resultados aquí descritos confirman la importancia de la realización de ensayos en planta en las etapas iniciales del desarrollo. Además, las prácticas agrícolas llevadas a cabo en especies como la escarola se basan en la obtención de plantones en una primera fase desde la germinación, por tanto, es necesario procurar un adecuado desarrollo vegetal en los primeros estadios que asegure el éxito del cultivo en las fases posteriores.

Tabla 57: Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de cilantro bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Fahræus (M.F.) y medio Fahræus + 100 mM NaCl (M.F. - 100 mM NaCl).

	Longitud parte aérea (cm)		Peso húmedo parte aérea (g)		Peso seco parte aérea (mg)	
	M.F.	M.F. - 100 mM NaCl	M.F.	M.F. - 100 mM NaCl	M.F.	M.F. - 100 mM NaCl
Control	10.81 ± 1.55 a	11.37 ± 2.02 a	0.21 ± 0.01 a	0.28 ± 0.01 a	23.0 ± 1.5 a	31.0 ± 1.9 a
PEPV40	11.20 ± 2.00 a	13.47 ± 2.00 b	0.24 ± 0.01 b	0.31 ± 0.01 b	27.0 ± 5.4 b	39.0 ± 4.8 b
CDVBN10	12.78 ± 1.78 b	11.06 ± 0.99 a	0.25 ± 0.01 b	0.20 ± 0.01 c	28.0 ± 1.3 b	24.0 ± 0.9 c
SCCPVE07	13.57 ± 2.51 c	13.25 ± 2.32 b	0.27 ± 0.01 c	0.31 ± 0.01 b	34.0 ± 1.8 c	41.0 ± 5.4 b

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Tabla 58: Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de escarola bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Fahræus (M.F.) y medio Fahræus + 100 mM NaCl (M.F. - 100 mM NaCl).

	Longitud parte aérea (cm)		Peso húmedo parte aérea (g)		Peso seco parte aérea (mg)	
	M.F.	M.F. - 100 mM NaCl	M.F.	M.F. - 100 mM NaCl	M.F.	M.F. - 100 mM NaCl
Control	4.53 ± 0.27 a	4.69 ± 0.16 a	0.33 ± 0.02 a	0.36 ± 0.01 a	14.0 ± 0.3 a	16.0 ± 0.2 a
PEPV40	5.43 ± 0.15 a	4.71 ± 0.11 a	0.39 ± 0.03 b	0.40 ± 0.05 b	16.0 ± 1.0 b	18.0 ± 3.4 b
CDVBN10	5.23 ± 0.15 b	5.02 ± 0.17 a	0.42 ± 0.01 c	0.37 ± 0.05 a	18.0 ± 0.3 c	16.0 ± 1.0 a
SCCPVE07	4.61 ± 0.21 a	5.34 ± 0.11 b	0.36 ± 0.01 a,b	0.45 ± 0.01 c	15.0 ± 0.3 a,b	18.0 ± 0.2 b

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

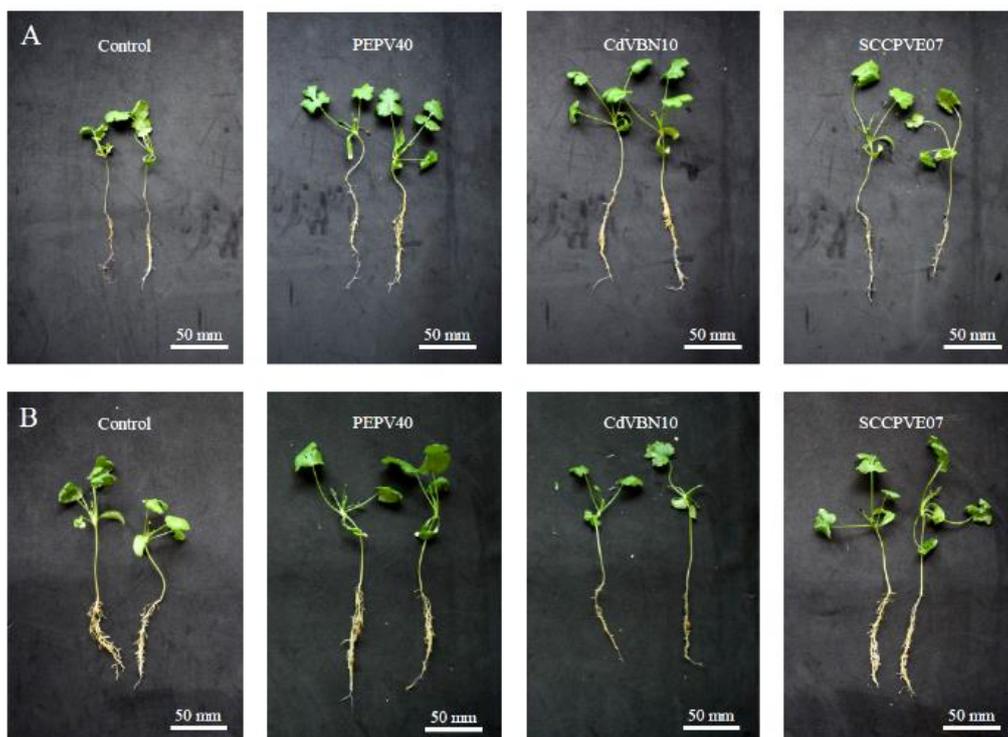


Figura 37: Resultado a los 30 dpi de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plantas de cilantro desarrolladas en cámara iluminada. Plantas regadas con medio Fahræus (A) y regadas con medio Fahræus NaCl 100mM (B).



Figura 38: Resultado a los 30 dpi de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plantas de escarola desarrolladas en cámara iluminada. Plantas regadas con medio Fahræus (A) y regadas con medio Fahræus NaCl 100mM (B).

2.2. Ensayo en invernadero.

Una vez comprobado que las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 colonizan las raíces de los dos cultivos seleccionados e interaccionan de forma positiva con las mismas en las primeras etapas del desarrollo, el siguiente paso para analizar su efecto sobre el crecimiento fue la realización de ensayos en condiciones de invernadero. De nuevo se presentan los datos de las plantas en condiciones normales y bajo estrés salino (tablas 59 y 60).

En las plantas de cilantro se analizó la longitud de la parte aérea, su peso húmedo, peso seco y el contenido de clorofila, ya que se trata de un cultivo de hoja verde cuya apariencia hacia el consumidor es destacable. En el caso de las plantas de escarola se analizó el número de hojas y el peso húmedo y seco de la parte aérea, ya que se trata de un cultivo agrícola cuyo interés reside en las hojas. La clorofila no se evaluó en la escarola debido al tipo de hoja rizada que impidió su análisis.

Estas variables fueron analizadas a los 55 y 60 días, para el cilantro y escarola, respectivamente. El sustrato utilizado fue una mezcla de vermiculita y turba (1:3) no estéril. Las semillas de cilantro y escarola se desinfectaron en superficie y se pregerminaron siguiendo el protocolo establecido en el apartado 7.1 de materiales y métodos.

Las plantas fueron divididas en dos tratamientos, aquellas que estaban sometidas a un estrés salino (regadas con una solución salina 100 mM NaCl) y aquellas que crecían en condiciones normales. En ambos tratamientos se incluyeron plantas control y plantas inoculadas con las tres cepas de forma independiente.

Como se ve en las tablas 59 y 60, tanto las plantas de cilantro como las plantas de escarola inoculadas con las diferentes cepas presentaban valores superiores respecto a las plantas control, en ambas condiciones.

Las plantas de cilantro inoculadas con la cepa CDVBN10 fueron aquellas que presentaron, en condiciones habituales y en las tres primeras variables, valores estadísticamente significativos, llegando a mejorar el rendimiento en el peso seco de la parte aérea hasta un 17 % respecto al control. El mejor contenido de clorofila se obtuvo en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40, mejorando las plantas control en un 5 %. En condiciones de estrés salino los mejores valores, en todas las variables, fueron obtenidos en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07, llegando a mejorar el rendimiento en el peso seco de la parte aérea hasta un 25 % y el contenido en clorofila un 34 %, ambos datos respecto al control.

En el caso de la escarola los resultados varían ligeramente. Con este cultivo son las plantas inoculadas con la cepa PEPV40 las que presentan los mejores valores de las

tres variables en condiciones normales y respecto a las plantas control. Se mejora un 18 % el peso seco de la parte aérea y un 14 % el número de hojas.

Bajo condiciones de estrés salino los mejores valores son los siguientes: el número de hojas se mejora en un 16 % en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 y el peso húmedo y peso seco de la parte aérea incrementa hasta un 76 % en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07.

Hasta la fecha, son muy pocos los estudios que analizan el efecto de la inoculación de bacterias PGP sobre plantas de cilantro. Un estudio previo realizado por Warwate et al., (2017) con una cepa de *Pseudomonas* muestra rendimientos del cultivo similares, pero inferiores, a los mostrados en la presente Tesis Doctoral, ya que describen solamente un 4.3 % de mejora en el contenido de clorofila, un 25 % en la biomasa total del cultivo y un 3 % en la longitud aérea.

Mishra et al., (2017) evalúan parámetros de desarrollo vegetal de plantas de cilantro crecidas en condiciones de aridez bajo la inoculación independiente de cepas de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. aerophilus*), *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas stutzeri*. Los mejores resultados respecto al control en todas las variables analizadas se obtuvieron tras las inoculaciones con las cepas del género *Bacillus*. Resultados que, bajo el estrés salino inducido en la presente Tesis Doctoral, concuerdan con los publicados anteriormente.

Sin embargo, aquí se analiza la interacción por primera vez de una cepa perteneciente al género *Rhizobium* (*Rhizobium laguerreae*) con plantas de cilantro. Además, también es la primera vez que se describen los efectos en el desarrollo vegetal de *Coriandrum sativum* tras la inoculación con cepas pertenecientes a las especies bacterianas *Bacillus halotolerans* y *Pseudomonas brassicacearum*, ya sea en condiciones normales o bajo estrés salino inducido.

En el caso de la escarola (*C. endivia*), y como se comentó en el apartado anterior, hasta la fecha no existe ningún estudio realizado previamente que analice la interacción de alguna bacteria promotora del crecimiento vegetal con esta especie. Aun así, resultados similares a los aquí descritos fueron obtenidos en especies vegetales del mismo género. Stanojković-sebić et al., (2018) analizan el efecto positivo de la inoculación independiente y conjunta de una cepa de *Pseudomonas* sp. y otra cepa de *Bacillus* sp. en *C. intybus*. Los mejores resultados en biomasa fueron obtenidos tras la inoculación con la cepa de *Pseudomonas*, sin embargo, el mejor desarrollo radicular fue descrito con la inoculación conjunta de ambas especies.

En este sentido, la presente Tesis Doctoral también describe por primera vez el efecto en plantas de escarola (*C. endivia*) de la inoculación de cepas pertenecientes a las especies *Rhizobium laguerreae*, *Bacillus halotolerans* y *Pseudomonas brassicacearum* (figura 39).

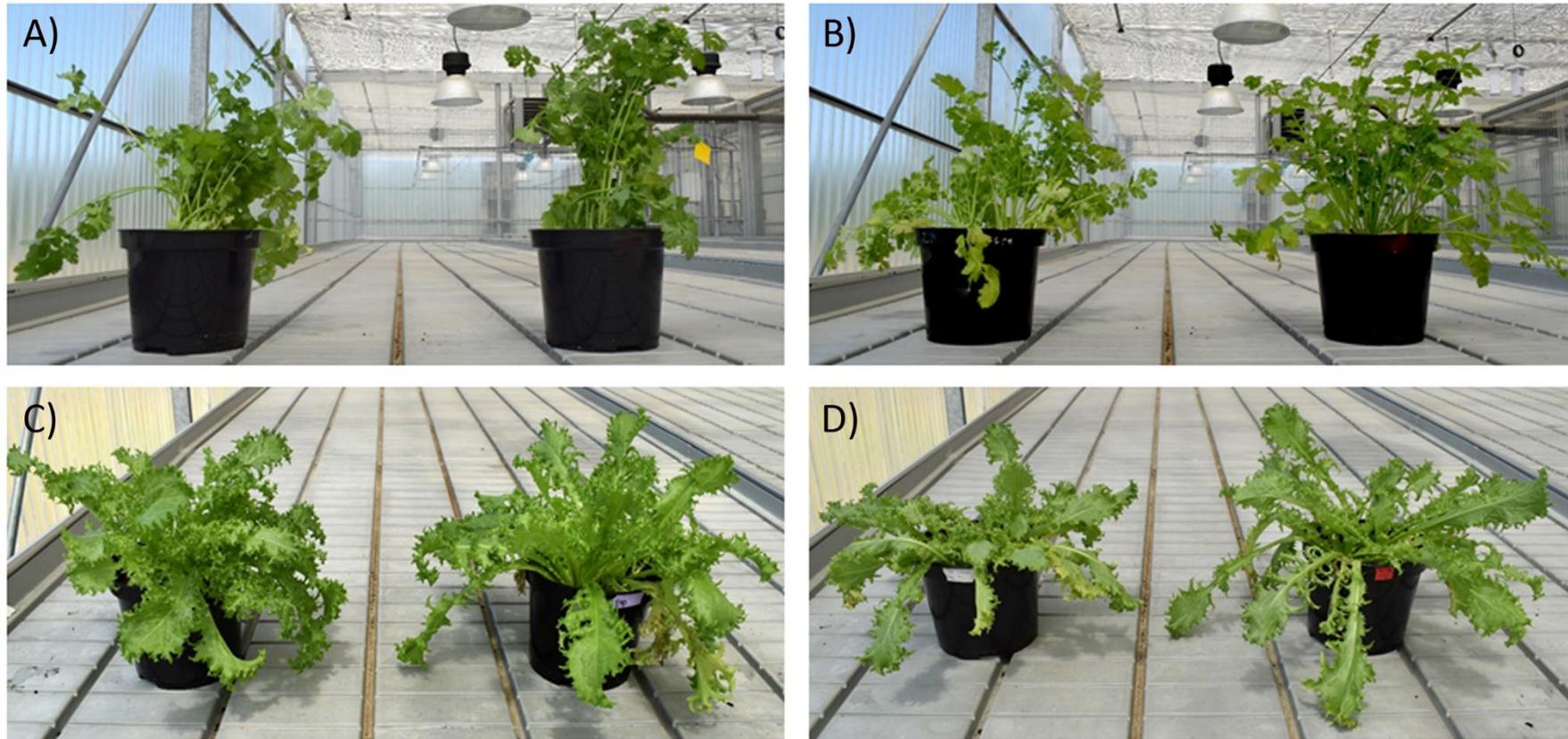


Figura 39: Comparación del fenotipo mostrado por plantas de cilantro bajo condiciones normales (A) [(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa CDVBN10] y bajo condiciones de estrés salino (B) [(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07]. Comparación del fenotipo mostrado por plantas de escarola bajo condiciones normales (C) [(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa PEPV40] y bajo condiciones de estrés salino (D)[(izquierda) plantas control; (derecha) plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07].

Tabla 59: Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de cilantro bajo condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	Longitud parte aérea (cm)		Peso húmedo parte aérea (g)		Peso seco parte aérea (g)		Clorofila (Unidades SPAD)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	32.27 ± 0.62 a	27.9 ± 0.29 a	13.70 ± 0.19 a	12.10 ± 0.14 a	1.52 ± 0.02 a	1.36 ± 0.02 a	31.16 ± 0.60 a	24.38 ± 0.40 a
PEPV40	33.64 ± 0.52 a	30.13 ± 0.64 a	14.96 ± 0.23 b	14.08 ± 0.24 b	1.67 ± 0.02 b	1.57 ± 0.03 b	32.68 ± 0.55 a	29.26 ± 0.81 b
CDVBN10	36.40 ± 1.16 b	29.53 ± 0.55 a	16.12 ± 0.32 c	13.64 ± 0.17 b	1.78 ± 0.03 c	1.57 ± 0.02 b	31.50 ± 0.82 a	29.36 ± 0.73 b
SCCPVE07	34.20 ± 0.54 a,b	32.81 ± 0.60 b	15.63 ± 0.33 b,c	14.84 ± 0.25 c	1.76 ± 0.04 c	1.68 ± 0.03 c	31.26 ± 0.56 a	32.70 ± 0.61 c

Los valores representan la media ± el error estándar.

Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Tabla 60: Resultado de la inoculación de las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07 en plántulas de escarola bajo condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	Número de hojas		Peso húmedo parte aérea (g)		Peso seco parte aérea (g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	12.87 ± 0.44 a	12.60 ± 0.43 a	42.18 ± 0.55 a	27.07 ± 0.67 a	1.76 ± 0.02 a	1.13 ± 0.01 a
PEPV40	14.67 ± 0.47 b	12.47 ± 0.39 a	49.81 ± 0.53 b	31.18 ± 0.61 b	2.07 ± 0.02 b	1.30 ± 0.03 b
CDVBN10	14.00 ± 0.43 a,b	14.60 ± 0.56 b	42.54 ± 0.36 a	33.21 ± 0.66 c	1.77 ± 0.02 a	1.39 ± 0.03 c
SCCPVE07	14.47 ± 0.61 b	13.20 ± 0.39 a	43.64 ± 0.61 a	47.63 ± 0.62 d	1.82 ± 0.03 a	1.99 ± 0.03 d

Los valores representan la media ± el error estándar.

Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

3. Evaluación y análisis del contenido nutricional.

Una vez finalizado el ensayo de invernadero, se realizó, en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC, un análisis del contenido en elementos químicos de las partes comestibles. Los resultados para ambas especies vegetales se muestran en las tablas 61 y 62. En ambos casos, los mejores valores se obtuvieron siempre en las plantas que habían sido inoculadas con alguna de las cepas de estudio, excepto el contenido de hierro en condiciones salinas en el cilantro y el contenido de potasio en condiciones salinas en la escarola. En ambos cultivos los mejores contenidos de los elementos analizados se obtuvieron en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40 ya fuese en condiciones normales o de salinidad, seguidos por los resultados mostrados en los tratamientos en los que se utilizó la cepa SCCPVE07.

En el caso del cilantro bajo condiciones normales, se obtuvieron unos incrementos estadísticamente significativos del 60 % en fósforo, 203 % en hierro y 30 % en magnesio en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40; un 25 % en potasio, un 34 % en nitrógeno y un 23 % en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10; un 38 % en fósforo y un 179 % en hierro en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07, ambos datos respecto a las plantas control. Bajo condiciones de estrés salino los rendimientos obtenidos se incrementaron de la siguiente manera: un 11 % en carbono y un 113 % en fósforo en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07 y, finalmente, un 43 % en nitrógeno y un 23 % en potasio en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10; un 48 % en potasio y un 33 % en fósforo y en nitrógeno en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40.

En el caso de la escarola y bajo condiciones normales se obtuvieron unos incrementos estadísticamente significativos del 47 % en fósforo, 35 % en hierro y 34 % en magnesio en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40; un 25 % en fósforo, un 121 % en hierro y un 55 % en magnesio en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07 y un 15 % en fósforo, un 88 % en hierro y un 42 % en magnesio en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10. Bajo condiciones de estrés salino los incrementos obtenidos fueron los siguientes: un 9 % en carbono, un 16 % en nitrógeno, un 43 % en fósforo, un 870 % en hierro y un 44 % en magnesio en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40; un 11 % en nitrógeno y carbono, un 43 % en fósforo, un 21 % en hierro y un 44 % en magnesio en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 y, finalmente, un 14 % en potasio y un 21 % en hierro en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07. Todos estos datos son en comparación con los obtenidos en los tratamientos control.

Aumentos similares se han detectado también en otros cultivos tras la inoculación con otras cepas del género *Rhizobium*. Flores-Félix et al., (2013) describieron un aumento del contenido de nitrógeno y carbono en las partes comestibles de cultivos de lechuga tras la inoculación la cepa de *R. laguerreae* PEPV16. En cultivos de rúcula de

Souza et al., (2016) observaron un aumento del contenido en potasio y fósforo tras la inoculación con cepas pertenecientes a las especies *R. fabae* y *R. leguminosarum*.

Incrementos en el contenido nutricional de los cultivos tras la inoculación de especies del género *Bacillus* también han sido descritos en las últimas décadas. Según Turan et al., (2014) la inoculación con la cepa TV-91C de *Bacillus megaterium* aumentó el contenido en nitrógeno, potasio, hierro, fósforo y magnesio de las hojas de la especie vegetal *Brassica oleracea* L. No sólo se ha descrito un incremento destacable en cultivos cuya importancia reside en la hoja sino, también en cultivos de raíz, como la batata. Dawwam et al., (2013) describieron un aumento de nitrógeno, fósforo y potasio en este tipo de cultivo tras la inoculación de *Bacillus cereus*.

Tabla 61: Resultados del análisis elemental de las plantas de cilantro en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	C (g/100 g)		N (g/100 g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	40.56 ± 0.07 a	37.39 ± 0.05 a	2.44 ± 0.09 a	3.06 ± 0.02 a
PEPV40	41.24 ± .26 a	39.24 ± 1.71 a	2.79 ± 0.09 a,b	4.05 ± 0.48 b
CDVBN10	39.79 ± 0.09 a	37.41 ± 0.16 a	3.26 ± 0.06 b	4.37 ± 0.04 b
SCCPVE07	41.16 ± 0.20 a	41.36 ± 0.08 b	2.73 ± 0.02 a,b	3.46 ± 0.11 a
	P (g/100 g)		K (g/100 g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	0.68 ± 0.04 a	0.67 ± 0.01 a	3.61 ± 0.11 a	3.46 ± 0.03 a
PEPV40	1.09 ± 0.03 b	0.89 ± 0.12 b	3.12 ± 0.12 b	5.09 ± 0.06 b
CDVBN10	0.80 ± 0.03 a,c	0.68 ± 0.04 a	4.35 ± 0.03 c	4.27 ± 0.28 c
SCCPVE07	0.94 ± 0.05 b,c	1.43 ± 0.03 c	3.68 ± 0.20 a	3.29 ± 0.05 a
	Fe (g/Kg)		Mg (g/100 g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	0.12 ± 0.01 a	0.28 ± 0.01 a	0.91 ± 0.06 a	0.81 ± 0.01 a
PEPV40	0.37 ± 0.02 b	0.12 ± 0.01 b	1.18 ± 0.04 b	0.79 ± 0.07 a,b
CDVBN10	0.15 ± 0.01 a	0.15 ± 0.01 b	1.12 ± 0.04 b	0.65 ± 0.05 b
SCCPVE07	0.34 ± 0.06 b	0.25 ± 0.01 a	0.94 ± 0.07 a	0.81 ± 0.01 a

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Son múltiples los estudios publicados que describen un aumento del contenido nutricional en una amplia variedad de cultivos tras la inoculación con diferentes especies del género *Pseudomonas*. Esitken et al., (2006) describieron un aumento del contenido en nitrógeno, fósforo, manganeso y potasio en hojas de cerezo tras la inoculación de *Pseudomonas* sp., sin embargo, los mejores incrementos se obtuvieron al realizar una coinoculación con una cepa del género *Bacillus*. Según Ordoorkhani et al., (2010) los

mejores resultados de contenido de potasio en tomate fueron los obtenidos tras la co-inoculación con cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp.

Tabla 62: Resultados del análisis elemental de las plantas de escarola en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	C (g/100 g)		N (g/100 g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	41.88 ± 0.15 a	35.74 ± 0.47 a	3.69 ± 0.10 a	2.90 ± 0.05 a
PEPV40	43.25 ± 0.27 a	39.07 ± 0.23 b	3.58 ± 0.01 a	3.36 ± 0.01 b
CDVBN10	41.18 ± 0.21 a	39.78 ± 0.12 b	3.76 ± 0.06 a	3.22 ± 0.04 b
SCCPVE07	41.53 ± 1.20 a	35.18 ± 0.32 a	3.24 ± 0.22 b	2.74 ± 0.05 a
	P (g/100 g)		K (g/100 g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	0.60 ± 0.02 a	0.40 ± 0.01 a	2.90 ± 0.08 a	3.18 ± 0.07 a
PEPV40	0.88 ± 0.03 b	0.57 ± 0.01 b	1.83 ± 0.09 b	2.50 ± 0.07 b
CDVBN10	0.69 ± 0.01 b	0.25 ± 0.02 c	2.82 ± 0.19 a	2.55 ± 0.17 b
SCCPVE07	0.75 ± 0.01 b	0.35 ± 0.02 a	2.87 ± 0.04 a	3.61 ± 0.22 c
	Fe (g/Kg)		Mg (g/100 g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	0.51 ± 0.04 a	0.10 ± 0.01 a	0.67 ± 0.03 a	0.46 ± 0.01 a
PEPV40	0.69 ± 0.06 b	0.94 ± 0.03 b	0.90 ± 0.07 b	0.66 ± 0.01 b
CDVBN10	0.97 ± 0.05 c	0.12 ± 0.01 a	0.95 ± 0.05 b,c	0.28 ± 0.02 c
SCCPVE07	1.14 ± 0.02 d	0.12 ± 0.01 a	1.04 ± 0.01 c	0.38 ± 0.02 a,c

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

4. Evaluación y análisis de compuestos fenólicos.

Los estreses abióticos y bióticos determinan y afectan de forma negativa el desarrollo y crecimiento vegetal de los cultivos debido a la deficiencia de nutrientes, la toxicidad de iones o las tensiones de estrés osmótico y oxidativo generadas (Riaz et al., 2018). En respuesta a estas variaciones ambientales, las plantas han desarrollado un mecanismo combativo, la biosíntesis de metabolitos secundarios. Gracias a este tipo de metabolitos, las plantas pueden disminuir los efectos generados por los estreses gracias, entre otros mecanismos, a la capacidad antioxidante o la regulación de la absorción de nutrientes (Sugiyama y Yazaki, 2014).

Los metabolitos secundarios más estudiados en la mitigación de los efectos producidos por algún tipo de estrés son los compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los flavonoles y los ácidos fenólicos (Riaz et al., 2018), ambos descritos por sus propiedades biológicas en base a su estructura química y su alta relación con la

disminución del riesgo de enfermedades humanas (Cao et al., 2019; Fikry et al., 2019; Pittalá et al., 2018).

En base a los resultados anteriores se decidió realizar un análisis de los compuestos fenólicos mayoritarios en cada cultivo y sus derivados (Dardanelli et al., 2010; Riaz et al., 2018; Singh et al., 2012; Sugiyama y Yazaki, 2014), con el fin de comprobar si existía un aumento del contenido nutricional en ambos cultivos tras la inoculación bacteriana y la inducción de estrés salino.

El contenido en ácidos fenólicos y flavonoles fué analizado en ambos cultivos, condiciones y tratamientos. Gracias a la colaboración con el Grupo de Investigación en Polifenoles de la Universidad de Salamanca se obtuvieron los datos recogidos en las tablas 63, 64, 65, 66 y 67.

En el caso del cilantro se analizaron los siguientes ácidos fenólicos: ácido vanílico, ácido 5-o-cafeoil-quínico (ácido clorogénico), ácido cinámico y ácido ferúlico (tabla 63). Todos ellos descritos por disminuir los efectos negativos en plantas sometidas a altas concentraciones de metales pesados, estrés salino o hídrico (An et al., 2019; Kisa et al., 2016).

Bajo condiciones habituales se obtuvieron unos incrementos estadísticamente significativos respecto al tratamiento control del 16 % en ácido vanílico y 8 % en ácido 5-o-cafeoil-quínico en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40; un 21 % en ácido vanílico y un 51 % en ácido 5-o-cafeoil-quínico en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, y un 23 % en ácido 5-o-cafeoil-quínico en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07.

Bajo condiciones de estrés salino los rendimientos obtenidos respecto al tratamiento control fueron los siguientes: un 28 % en ácido vanílico y un 8 % en ácido 5-o-cafeoil-quínico en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40; un 10 % en ácido ferúlico en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, y un 82 % en ácido 5-o-cafeoil-quínico y un 21 % en ácido cinámico en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07.

En el caso de la escarola se analizaron los contenidos en ácido cafeico, ácido protocatecuico, ácido tartárico y ácido cicórico (tabla 64). Todos ellos descritos por los efectos en los cultivos frente a distintos tipos de estreses (Riaz et al., 2018) y los beneficios reportados ampliamente ante enfermedades humanas como la diabetes o el *Parkinson* (Aguilar et al., 2016; Fazili et al., 2015; Pittalá et al., 2018).

Bajo condiciones habituales y respecto al tratamiento control se obtuvieron unos incrementos estadísticamente significativos del 58 % y 67 % en ácido protocatecuico en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40 y SCCPVE07, respectivamente.

Tabla 63: Resultado del análisis de ácidos fenólicos de las plantas de cilantro en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	Ácido vanílico (mg/g)		Ácido 5-O-cafeoil-quinico (mg/g)		Ácido cinámico (mg/g)		Ácido ferúlico (mg/g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	14.31 ± 0.27 a	14.55 ± 0.27 a	3.00 ± 0.05 a	5.52 ± 0.03 a	0.61 ± 0.02 a	0.75 ± 0.01 a	0.86 ± 0.03 a	0.73 ± 0.03 a
PEPV40	16.62 ± 0.06 b	18.59 ± 0.31 b	2.35 ± 0.09 b	5.96 ± 0.01 b	0.57 ± 0.03 a	0.72 ± 0.01 a	0.87 ± 0.01 a	0.76 ± 0.02 a,b
CDVBN10	17.37 ± 0.08 c	14.76 ± 0.47 a	4.53 ± 0.02 c	3.37 ± 0.08 c	0.39 ± 0.01 b	0.68 ± 0.05 a	0.68 ± 0.02 b	0.80 ± 0.02 b
SCCPVE07	6.01 ± 0.01 d	12.90 ± 0.11 c	3.69 ± 0.03 d	10.23 ± 0.03 d	0.48 ± 0.01 c	0.91 ± 0.01 b	0.62 ± 0.02 b	0.77 ± 0.02 a,b

Los valores representan la media ± el error estándar.

Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Tabla 64: Resultado del análisis de ácidos fenólicos de las plantas de escarola en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	Ácido cafeico (mg/g)		Ácido protocatecuico (mg/g)		Ácido tartárico (mg/g)		Ácido cicórico (mg/g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	0.64 ± 0.01 a	0.48 ± 0.01 a	8.39 ± 0.04 a	3.76 ± 0.14 a	6.10 ± 0.02 a	4.91 ± 0.15 a	37.05 ± 0.09 a	24.56 ± 0.78 a
PEPV40	0.53 ± 0.02 b	0.67 ± 0.01 b	13.29 ± 0.04 b	6.42 ± 0.04 b	4.52 ± 0.01 b	6.44 ± 0.04 b	24.83 ± 0.13 b	34.51 ± 0.02 b
CDVBN10	0.60 ± 0.01 c	0.58 ± 0.01 c	4.29 ± 0.06 c	13.09 ± 0.01 c	6.25 ± 0.03 a	5.15 ± 0.03 c	35.39 ± 0.07 c	30.71 ± 0.16 c
SCCPVE07	0.58 ± 0.01 c	0.44 ± 0.01 d	14.04 ± 0.08 d	3.11 ± 0.04 d	5.85 ± 0.04 c	3.94 ± 0.01 d	25.76 ± 0.05 d	23.38 ± 0.04 d

Los valores representan la media ± el error estándar.

Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Bajo condiciones de estrés salino los rendimientos obtenidos respecto al tratamiento control fueron los siguientes: un 40 % en ácido cafeico, un 71 % en ácido protocatecuico, un 31 % en ácido tartárico y un 41 % en ácido cicórico en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40; un 21 % en ácido cafeico, un 248 % en ácido protocatecuico, un 5 % en ácido tartárico y un 25 % en ácido cicórico en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10.

En la tabla 63, se observa que los mejores contenidos de ácido cinámico, precursor del resto de ácidos analizados, pertenecen al tratamiento control en condiciones habituales (Yang et al., 2018). Sin embargo, y de forma general, para el resto de los ácidos, las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas presentaron valores superiores y estadísticamente significativos respecto al tratamiento control.

Por otro lado, en condiciones de salinidad y para el ácido vanílico, ácido 5-o-cafeoil-quínico y ácido ferúlico, excepto el ácido vanílico en el tratamiento con la cepa SCCPVE07 y el ácido 5-o-cafeoil-quínico en el tratamiento con la cepa CDVBN10, todos los valores obtenidos fueron superiores respecto al tratamiento control.

En el caso de la escarola los resultados obtenidos muestran una tendencia similar, mejores resultados en el control para aquellos ácidos precursores del resto, en este caso el ácido cafeico, y mejores valores y estadísticamente significativos para el resto de los tratamientos. Bajo condiciones de salinidad, hay que destacar que los tratamientos con las cepas PEPV40 y CDVBN10 presentaron valores muy superiores y estadísticamente significativos respecto al control, llegando a aumentar hasta un 248 % el contenido en ácido protocatecuico (derivado del ácido cafeico).

Además, si se analiza el contenido total de los ácidos fenólicos en los diferentes tratamientos (tabla 65) se observa como las mejores concentraciones obtenidas, para los dos cultivos y en ambas condiciones, se consiguen tras la inoculación con alguna de las cepas de estudio, excepto en el caso de la escarola en condiciones normales.

Tabla 65: Contenido total de los ácidos fenólicos en los diferentes tratamientos. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S.-100 mM NaCl).

	Cilantro		Escarola	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	18.8 mg/g	21.6 mg/g	52.1 mg/g	33.7 mg/g
PEPV40	20.6 mg/g	26.0 mg/g	43.2 mg/g	48.1 mg/g
CDVBN10	23.0 mg/g	19.4 mg/g	46.5 mg/g	49.5 mg/g
SCCPVE07	10.8 mg/g	24.8 mg/g	46.2 mg/g	30.9 mg/g

Dentro de los compuestos polifenólicos, en particular los flavonoles, se definen como una de las clases químicas más efectivas con efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, neuroprotectores y cardioprotectores (Nabavi et al., 2015). Los flavonoles son descritos por su alta presencia en frutas y vegetales (López-Lázaro, 2009).

En el caso de las plantas de cilantro se analizaron los derivados de uno de los flavonoles mayoritarios en este cultivo, la quercetina (Hussain et al., 2018). En concreto, se analizaron las concentraciones de quercetina-3-O-rutinósido (rutina), quercetina-3-O-glucurónido (miquelianina) y quercetina-3-O-glucósido (isoquercetina) (tabla 66).

Bajo condiciones habituales los mejores resultados de flavonoles totales se obtuvieron en aquellas plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07, con un 12 % más respecto al control. En concreto, con la misma cepa y para el flavonol miquelianina se obtuvo un 91 % más.

En condiciones de salinidad se obtuvieron unos incrementos superiores y estadísticamente significativos del 29 % en rutina, un 15 % en miquelianina y un 37 % en isoquercetina en aquellas plantas inoculadas con la cepa CDVBN10; un 24 % en miquelianina en plantas inoculadas con la cepa PEPV40 y finalmente, un 38 % en rutina, un 105 % en miquelianina y un 41 % en isoquercetina en aquellas plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07, todos ellos calculados respecto al tratamiento control.

En el caso de las plantas de escarola se analizaron los derivados de luteolina, en concreto luteolina glucurónido, derivado de luteolina glucurónido y luteolina glucósido (tabla 67), todos ellos descritos por pertenecer a uno de los grupos mayoritarios de flavonoles en *Cichorium endivia* (DuPont et al., 2000).

Bajo condiciones normales se obtuvieron unos incrementos estadísticamente significativos respecto al control del 16 % en luteolina-glucurónido en las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, y un 20 % en luteolina-glucurónido y un 21 % en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07.

En condiciones de salinidad los incrementos respecto al control fueron los siguientes: un 25 % en luteolina-glucósido, 45 % en luteolina-glucurónido y 49 % en derivado de luteolina-glucurónido en aquellas plantas inoculadas con la cepa PEPV40 y un 4 % en luteolina-glucurónido en aquellas plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07.

Respecto a la cantidad total de flavonoles en condiciones normales se obtuvieron los aumentos, respecto al control, del 14 % y 18 % para las plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 y SCCPVE07, respectivamente. Sin embargo, en condiciones de salinidad el mejor aumento se obtuvo en las plantas inoculadas con la cepa PEPV40, con un 43 % respecto al tratamiento control, seguido de un 4 % en las plantas inoculadas con la cepa SCCPVE07.

Tabla 66: Resultados del análisis de flavonoles de las plantas de cilantro en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	Quercetina-3-O- rutinosido (mg/g) Rutina		Quercetina-3-O-glucurónido (mg/g) Miquelianina		Quercetina-3-O-glucósido (mg/g) Isoquercetina		Flavonoles totales	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	7.15 ± 0.06 a	6.15 ± 0.02 a	2.71 ± 0.01 a	2.64 ± 0.06 a	0.30 ± 0.01 a	0.29 ± 0.01 a	10.15 mg/g	9.09 mg/g
PEPV40	3.73 ± 0.09 b	6.02 ± 0.02 b	1.15 ± 0.09 b	3.27 ± 0.02 b	0.21 ± 0.01 b	0.30 ± 0.01 a	5.09 mg/g	9.59 mg/g
CDVBN10	4.02 ± 0.01 c	7.94 ± 0.04 c	1.74 ± 0.03 c	3.03 ± 0.05 c	0.21 ± 0.01 b	0.40 ± 0.02 b	5.97 mg/g	11.37 mg/g
SCCPVE07	5.89 ± 0.01 d	8.46 ± 0.02 d	5.17 ± 0.01 d	5.42 ± 0.06 d	0.27 ± 0.01 a	0.41 ± 0.02 b	11.33 mg/g	14.29 mg/g

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Tabla 67: Resultados del análisis de flavonoles de las plantas de escarola en condiciones de invernadero. Se muestran los datos de las plantas regadas con agua (Condiciones normales C.N.) y solución salina - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl).

	Luteolina-glucósido (mg/g)		Luteolina-glucurónido (mg/g)		Derivado de Luteolina-glucurónido (mg/g)		Flavonoles totales	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	2.20 ± 0.08 a	2.12 ± 0.11 a	15.58 ± 0.10 a	13.60 ± 0.45 a	1.19 ± 0.03 a	0.97 ± 0.07 a	18.97 mg/g	16.69 mg/g
PEPV40	2.18 ± 0.01 a	2.64 ± 0.05 b	15.30 ± 0.09 a	19.76 ± 0.06 b	0.77 ± 0.03 b	1.45 ± 0.06 b	18.25 mg/g	23.85 mg/g
CDVBN10	2.30 ± 0.03 a	2.29 ± 0.06 a	18.05 ± 0.05 b	13.30 ± 0.01 a	1.25 ± 0.02 a	0.91 ± 0.02 a	21.58 mg/g	16.54 mg/g
SCCPVE07	2.64 ± 0.05 b	2.16 ± 0.07 a	18.86 ± 0.06 b	14.12 ± 0.04 b	0.80 ± 0.02 b	1.00 ± 0.04 a	22.30 mg/g	17.28 mg/g

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P=0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

En el análisis de los flavonoles, exceptuando la concentración de rutina en el cilantro, se observa que siempre se obtuvieron valores superiores y estadísticamente significativos en alguno de los tratamientos con las cepas seleccionadas.

En el caso del cultivo del cilantro, además cabe destacar que, al igual que en el análisis anterior, las concentraciones más altas de los tratamientos inoculados se observaron para los flavonoles presentes en los últimos pasos de la ruta de biosíntesis (rutina y miquelianina), ambos derivados de isoquercetina, el cual es precursor de ambos y presentó las concentraciones más bajas.

En el caso de la escarola y para todos los flavonoles analizados, los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con alguna de las cepas seleccionadas. Además, en el tratamiento con la cepa CDVBN10 se observó como las concentraciones más altas se obtuvieron en los flavonoles que derivan de luteolina por la misma ruta, luteolina-glucurónido y su derivado. En el caso con la cepa SCCPVE07 las mejores concentraciones se encuentran para los flavonoles que derivan de luteolina en los primeros pasos de la ruta, por un lado, luteolina-glucurónido y por otro luteolina-glucósido, en ambos casos los valores fueron superiores y estadísticamente significativos respecto al tratamiento control.

Estos resultados apoyan a los obtenidos en el análisis *in silico* realizado en el capítulo II, donde se observó que las cepas seleccionadas tienen un potencial interés para la biosíntesis de enzimas, como los osmolitos, que disminuyen los efectos del estrés salino (Golkar y Taghizadeh, 2018), y cuyos incrementos, junto a los de los compuestos fenólicos, se han descrito previamente en la bibliografía científica (Golkar y Taghizadeh, 2018; Kumar y Kumar-Sharma, 2018).

Aunque antes ya se ha estudiado el efecto en el contenido de compuestos fenólicos en plantas sometidas a estrés salino (Frary et al., 2010; Neocleous et al., 2014), los resultados de la presente Tesis Doctoral describen por primera vez una mejora en el contenido bajo situaciones de estrés salino tras la inoculación con bacterias pertenecientes a diferentes géneros y especies bacterianas.

Cabe destacar que dentro de la importancia de los compuestos analizados, el ácido 5-O-cafeoil-quínico ha sido descrito por su actividad antioxidante en alimentos como el café, y se define como uno de los mejores ácidos fenólicos para reducir y prevenir una amplia gama de enfermedades cardiovasculares (Jiang et al., 2016; Wongsa et al., 2019). Así pues, el aumento de hasta un 51 % bajo condiciones habituales y hasta un 82 % bajo condiciones de salinidad, respecto a los tratamientos control, aporta un interés extra a la inoculación con las cepas seleccionadas en la presente Tesis doctoral.

El flavonol rutina también ha sido mencionado por sus efectos positivos en enfermedades como cáncer de pulmón o diabetes (Rauf et al., 2017) o la luteolina descrita por su actividad antiinflamatoria y antioxidante (López-Lázaro, 2009). Para

ambos flavonoles también se ha detectado un aumento significativo de concentración en los tratamientos con las cepas seleccionadas respecto al tratamiento control.

Además, el citado aumento en la concentración de compuestos fenólicos en ambos cultivos suma un valor extra a la inoculación con las cepas de estudio, pues estos compuestos han sido ampliamente descritos de forma general por su función antioxidante y por sus amplios beneficios, no solo para la salud humana sino también para los cultivos vegetales (Martinez et al., 2016; Pérez-Vizcaíno & Fraga, 2018).

A parte de los efectos beneficiosos para los cultivos frente a diferentes tipos de estreses, también se ha detallado como algunos de los compuestos fenólicos, como el ácido cafeico, intervienen en la síntesis de lignina y regulan procesos como la expansión celular, el fototropismo, o el crecimiento vegetal (Riaz et al., 2018), algunos de ellos procesos importantes en la adaptación de los cultivos a los cambios de temperatura o la disponibilidad de nutrientes, ambos de elevada importancia en la situación de cambio climático actual.

En este sentido, y aunque los cultivos tienen sus propios mecanismos para aminorar los efectos del estrés salino, como son la liberación de hormonas y la biosíntesis de enzimas antioxidantes que regulan la absorción de iones (Läuchli y Grattan, 2007), la inoculación con bacterias del tipo PGPR supone, en algunos casos, un aumento en las concentraciones de compuestos fenólicos o mecanismos combativos como la acción antioxidante, los cuales desembocan en un mejor aspecto y desarrollo vegetal a pesar de la situación de estrés (García-Seco et al., 2015; Nawaz y Bano, 2019).

De forma general, en la bibliografía científica se describe el aumento en el contenido de ácidos fenólicos y flavonoles de los cultivos bajo diferentes condiciones. Sin embargo, son escasos los trabajos que analizan y detallan un aumento en las concentraciones tras la inoculación con bacterias PGPR. Por ejemplo, García-Seco et al., (2015) y Nawaz y Bano (2019) mostraron un aumento en la concentración de compuestos fenólicos tras la aplicación de diferentes cepas del género *Pseudomonas* en cultivos de mora y pepino, respectivamente. Por parte de cepas del género *Rhizobium*, Flores-Félix et al., (2018) describieron en fresa un aumento significativo de diferentes compuestos bioactivos tras la inoculación de una cepa perteneciente a la especie *Rhizobium laguerreae*. En cuanto al género *Bacillus*, especies como *B. subtilis* ha sido descrita por aumentar el contenido de compuestos bioactivos en cultivos de tomate bajo condiciones de estrés abiótico (Loganathan et al., 2014).

Sin embargo, en la bibliografía científica disponible no existe, hoy en día, ningún estudio que analice el aumento o variación en la concentración de compuestos fenólicos de cultivos de cilantro y escarola tras la inoculación con las especies seleccionadas bajo condiciones de crecimiento no estresantes y de salinidad.

Considerando los dos cultivos en conjunto podemos concluir que las cepas PEPV40, CDVBN10 y SCCPVE07, identificadas como *Rhizobium laguerreae*, *Pseudomonas brassicacearum* y *Bacillus halotolerans*, respectivamente, pueden ser unos candidatos potenciales para ser utilizados en la formulación de biofertilizantes de diferentes cultivos de interés agrícola, no sólo por sus efectos promotores en dichos cultivos, sino también por el incremento nutricional que aportan.



Capítulo V: Obtención y caracterización del mutante *knock-out* y la complementación correspondiente para el gen que codifica la N-carbamoil putrescina amidasa en *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10: Análisis y estudio de los efectos en la interacción y el desarrollo vegetal de plantas de colza (*Brassica napus* L).

Como se ha reflejado en la presente Tesis Doctoral el análisis del culturoma permite un estudio, aunque indudablemente sesgado, de la biodiversidad de aquellas cepas bacterianas obtenidas tras el proceso de aislamiento seleccionado. Sin embargo, con los avances en biología molecular y las técnicas denominadas “ómicas” es posible obtener previamente información general sobre la biodiversidad y poder así, seleccionar los medios de cultivo apropiados y específicos según los objetivos e intereses en el aislamiento (Kambouris et al., 2018).

En este sentido, las comunidades microbianas y microbiomas también son estudiados con el fin de obtener información de las diferentes especies presentes (Gilbert et al., 2010). En el análisis de las interacciones planta-microorganismo el conocimiento de las comunidades microbianas asociadas a cultivos vegetales son clave, tanto para la salud vegetal como para la productividad de los cultivos, por ello, su análisis y estudio está incrementando significativamente en los últimos años (Bulgarelli et al., 2013).

Dentro de la interacción planta-microorganismo, resulta esencial conocer aquellas especies bacterianas que han conseguido pasar de formar parte de las comunidades microbianas de la rizosfera o filosfera al microbiota vegetal. Por tanto, para un mayor conocimiento del rol de las bacterias PGPR en el microbiota vegetal se necesita identificar aquellas que forman parte de ese microbiota y, gracias a la secuenciación genómica y búsqueda de genes podemos conocer la maquinaria genética que permite tales acciones descritas anteriormente.

En este sentido, gracias a un estudio transcriptómico y, el posterior análisis de la sobreexpresión génica (artículo en preparación) realizado en el grupo de investigación, pudimos comprobar que la cepa bacteriana *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 sobre-expresa, en el momento de la colonización radicular de plantas de *B. napus* L., el gen *cpa*, el cual codifica la n-carbamoil putrescina amidasa, que interviene en la ruta de biosíntesis de la putrescina, una poliamina con gran importancia en la interacción planta-microorganismo. Así pues, mediante la tecnología de edición de genomas CRISPR/Cas9 se realizó un mutante *knock-out* (KO) para este gen. Para comprobar que los fenotipos mostrados por el mutante KO se deben exclusivamente a ese gen, se realizó la correspondiente complementación a través transformación de la cepa mutante KO con el plásmido pPHU231cpa el cual contiene el gen *cpa* y fue diseñado y obtenido en la presente Tesis Doctoral.

Las poliaminas (PAs) son un grupo de moléculas de naturaleza policatiónica, compuestas por al menos dos grupos amino, encontradas en plantas y bacterias (Majumdar et al., 2019). Dentro de la variedad existente, la molécula 1,4-diaminobutano, comúnmente conocida como putrescina, es de las más abundantes (Sekula et al., 2016).

En los últimos años, se ha comprobado que las PAs juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo vegetal, defensa contra patógenos, colonización radicular

bacteriana, así como la respuesta a diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos (Majumdar et al., 2019; Vilas et al., 2018).

Sin embargo, hasta la fecha no se ha analizado, ni en condiciones normales ni de estrés salino inducido, el efecto en la promoción del crecimiento vegetal y desarrollo de los primeros estadios de crecimiento de plantas de colza, que supone la reducción de la biosíntesis de putrescina producida por una cepa PGPR de la especie *Pseudomonas brassicacearum*.

1. Diseño y obtención del mutante *knock-out* CDVBN10Δcpa mediante tecnología CRISPR/Cas9.

El diseño y la obtención del mutante *knock-out* CDVBN10Δcpa fueron elaborados utilizando los plásmidos pCAS-R2KT, pSEVA-gRNAT-cpa (figura 40) y pSEVA-gRNAT-cpa-HR (figura 41). Estos dos últimos fueron diseñados y construidos en este estudio y todos ellos derivan de los plásmidos obtenidos en el trabajo llevado a cabo por Sun et al., (2018).

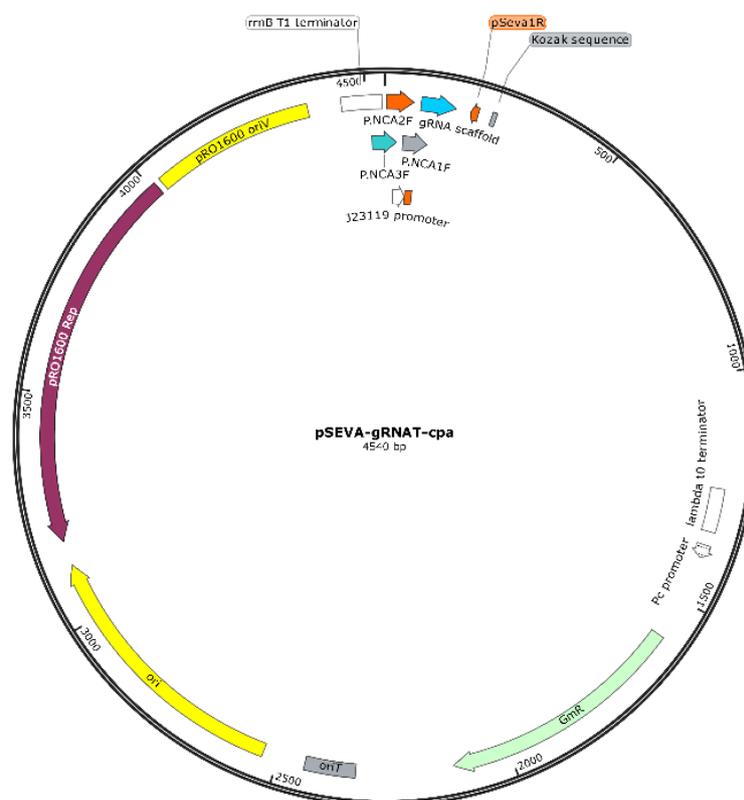


Figura 40: Diseño del plásmido pSEVA-gRNAT-cpa. Contiene los 20 ribonucleótidos (crRNA) al lado del motivo adyacente del protoespaciador (PAM) y la secuencia de ARN tracrRNA.

Así pues con los diferentes plásmidos se dispone de todos los elementos necesarios del sistema CRISPR, establecidos por Jinek et al., (2012), y que son la nucleasa Cas9 y las dos moléculas de ARN, crRNA (contiene la homología de las secuencias con el ADN que se quiere cortar) y tracrRNA (molécula de ARN común a todos los ensayos, se une a crRNA y a la nucleasa Cas9).

Sin embargo, con aras de facilitar la nomenclatura y en base a la unión de crRNA y tracrRNA, paso a llamarse “single chimeric RNA” o “single guide RNA” o “sgRNA” (Charpentier y Doudna, 2013).

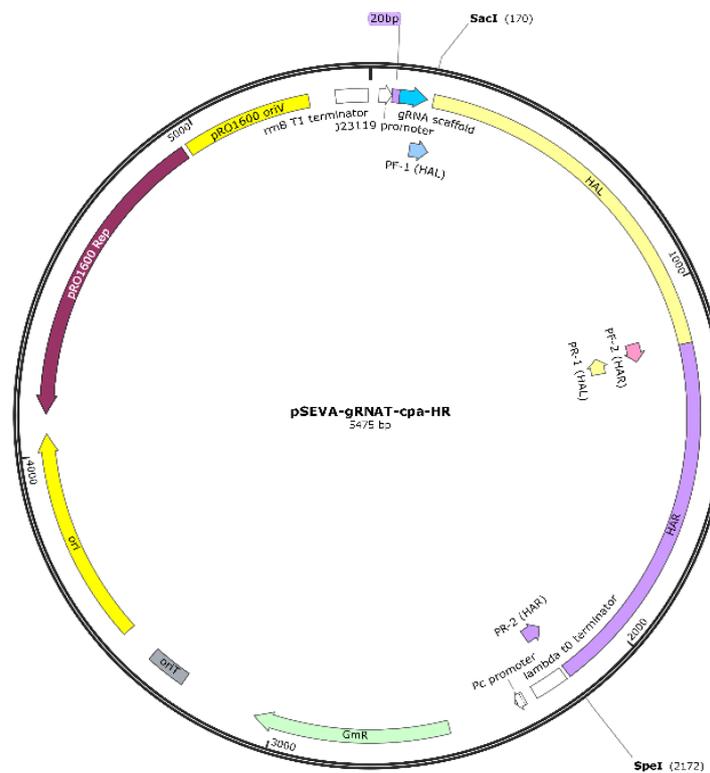


Figura 41: Plásmido pSEVA-gRNAT-cpa-HR. Deriva del plásmido pSEVA-gRNAT-cpa. Contiene los 20 ribonucleótidos (crRNA) al lado del motivo adyacente del protoespaciador (PAM), la secuencia sgRNA y los 1000 pares de bases aguas abajo (HAL) y aguas arriba (HAR) del gen *cpa*.

La comprobación de las colonias obtenidas, correspondientes a los posibles mutantes, fue realizada como se detalló en el apartado 5.7.3 de materiales y métodos.

Como se observa en las figuras 42 y 43, el número de pares de bases de CDVBN10Δcpa se comparó con el número de pares de bases de la cepa CDVBN10 en la amplificación realizada con los primers NCAKO-F y NCAKO-R, los cuales engloban los 1000 pares de bases *downstream* (HAR) y *upstream* (HAL) del gen *cpa*.

En el caso del mutante *knock-out* CDVBN10Δcpa, HAL y HAR son los únicos fragmentos que se amplifican (figura 43).

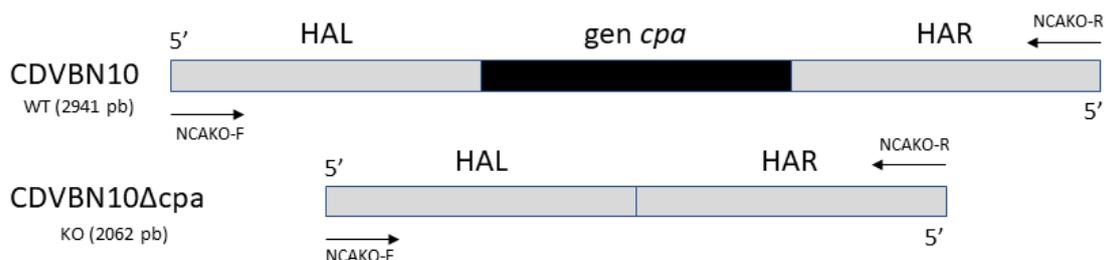


Figura 42: Esquema del fragmento amplificado con los primer NCAKO-F y NCAKO-R para la cepa CDVBN10 y el mutante *knock-out* CDVBN10Δcpa.

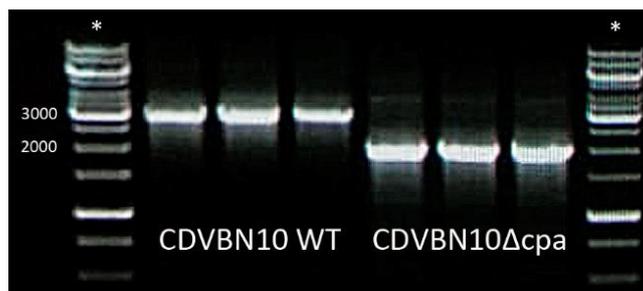


Figura 43: Gel de electroforesis donde se observa la diferencia en el tamaño de la zona amplificada entre colonias de la cepa CDVBN10WT y colonias de la cepa CDVBN10Δcpa. (*) representa el marcador usado de 1Kb.

Las bandas de ADN obtenidas en el gel tras la electroforesis fueron purificadas y secuenciadas, lo que permitió comprobar que el mutante *knock-out* era correcto y que el gen *cpa* había sido deletado, obteniéndose así la cepa CDVBN10Δcpa.

2. Diseño de la complementación y obtención del mutante CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa.

La confirmación de la transformación bacteriana con el plásmido pPHU231cpa se realizó como se indica en el apartado 5.7.3 de materiales y métodos. El producto de la electroforesis se observa en la figura 44; en este caso, la amplificación corresponde a los pares de bases del gen *cpa* más los pares de bases del plásmido adyacentes al gen e incluidos en el fragmento amplificado. La nomenclatura de la complementación obtenida fue CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa.

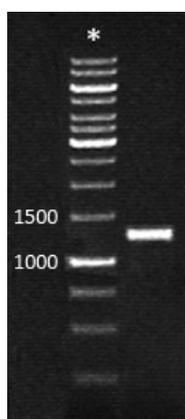


Figura 44: Gel de electroforesis donde se observa el tamaño de la banda amplificada con el primer universal M13. Este número corresponde a los pares de bases del gen *cpa* más las pares de bases de la secuencia del plásmido adyacentes al gen.

(*) representa el marcador usado de 1Kb.

3. Determinación de la producción de putrescina.

Una vez que el mutante *knock-out* y la respectiva complementación habían sido diseñados, construidos y comprobados, el siguiente paso fue determinar el efecto en la biosíntesis de putrescina. En la bibliografía son múltiples los artículos que describen y detallan la ruta de biosíntesis de PAs y la implicación de la *n-carbamoyl putrescina amidasa* en la producción final de la putrescina (figura 45). Por ello, se determinó la producción de putrescina en la cepa WT y en las cepas mutantes KO y complementada.

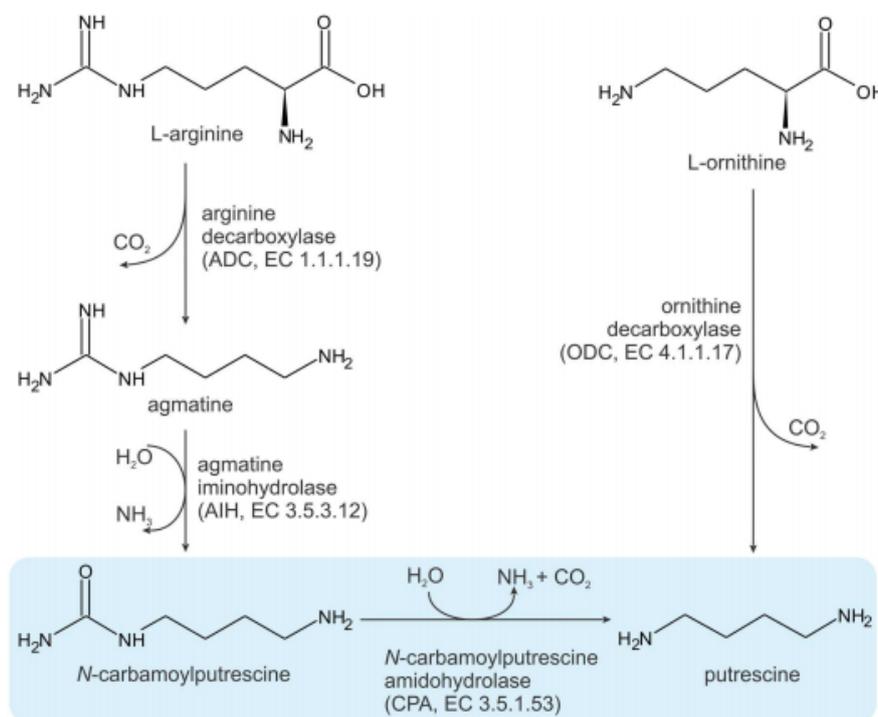


Figura 45: Ruta bacteriana de biosíntesis de putrescina. Se detalla en azul la implicación de la enzima n-carbamoyl putrescina amidasa (N-carbamoyl putrescine amidohydrolase). Adaptado de Sekula et al., (2016).

Los resultados (tabla 68) muestran una reducción significativa por parte de la cepa CDVBN10Δcpa y de nuevo un aumento al revertir el fenotipo con la cepa CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa.

Tabla 68: Concentración de putrescina analizada mediante cromatografía líquida (HPLC) de las cepas CDVBN10, CDVBN10Δcpa y CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa.

Tratamiento	µg/mL
CDVBN10	0.97 ± 0.12 a
CDVBN10Δcpa	0.23 ± 0.03 b
CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa	0.71 ± 0.15 a

Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Estos resultados concuerdan con los disponibles en la literatura científica, donde se demuestra que la ruta prioritaria de biosíntesis de putrescina en cepas del género *Pseudomonas* es la ruta ADC, partiendo de L-arginina (Cunin et al., 1986). Por otro lado, Nakada e Itoh, (2003) diseñaron y construyeron mutantes para los genes *aih* y *cpa* en *P. aeruginosa* donde mostraron una reducción similar a la obtenida en este apartado, además de la importancia de la expresión de estos genes en la biosíntesis de la putrescina.

Sin embargo, también se ha descrito que una modificación en la biosíntesis de poliaminas puede desencadenar en una modificación de la tasa de crecimiento

bacteriano. Lowe-Power et al., (2018) detectaron que el mutante de *Ralstonia solanacearum* afectado en la ruta de la biosíntesis de poliaminas (Δspe) difería en el crecimiento e infección de plantas de tomate comparándolo con la cepa *wild type*. Park et al., (2018) describieron que el mutante *knock-out* de *Pseudomonas chlororaphis* O6 *speAspeC* también veía afectado y disminuido su crecimiento y, por tanto, su potencial como agente de biocontrol. Ambos estudios muestran el papel esencial de las PAs en el crecimiento y desarrollo bacteriano.

Así pues, en nuestro caso se procedió a evaluar si también existía algún tipo de efecto y diferencia en la división celular y formación de biofilm bacterianos, mecanismo clave en la interacción planta-microorganismo (Romero y Kolter, 2011).

4. Análisis de la formación de biofilms de las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa.

En base a los resultados previos obtenidos y la búsqueda de las diferencias en la colonización de la cepa *wild type* y el mutante *knock-out* se realizó un análisis de la formación de biofilms de ambas cepas a las 16 y 24 horas, con el objetivo de comprobar si se detectaba algún cambio significativo.

Como se ve en la figura 46 la formación de biofilms fue diferente en la primera medida correspondiente a las 16 horas post inoculación. Sin embargo, a las 24 horas los valores se igualaron con un valor inferior respecto a la primera medición.

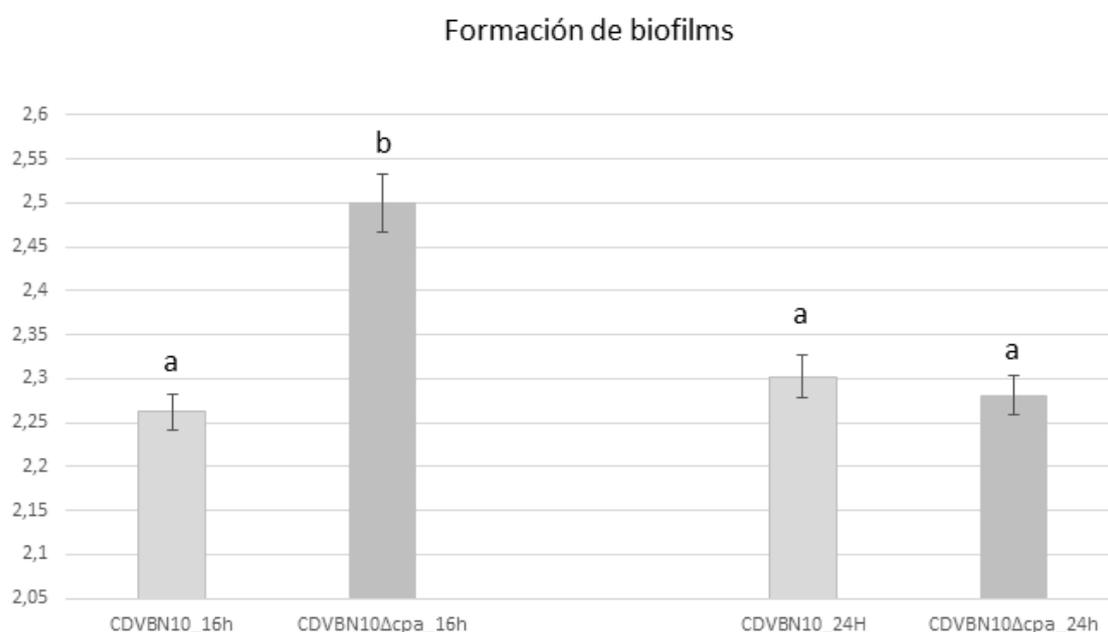


Figura 46: Resultados de las absorbancias medidas para las cepas correspondientes a las 16 y 24 horas de crecimiento a 28 °C en TY. Los valores son la media de 3 medidas tomadas por cada una de las cepas. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $p = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Esta tendencia, ya descrita en la bibliografía para otras especies bacterianas PGPR (Diez-Mendez et al., 2015) puede deberse a que la estructura formada por el

biofilm es tan grande que no consigue permanecer adherida a la placa multipocillo utilizada en el análisis y termina por caer, o que ya ha comenzado a disgregarse el biofilm debido a la velocidad de crecimiento de la cepa.

En la bibliografía encontramos que estudios realizados con otras poliaminas también presentaron efectos en la formación de biofilms. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, Qu y colaboradores (2016) describieron que diferentes dosis de norespermidina, otra poliamina, inhibían la formación del biofilms, presentando un destacado efecto bactericida. Similares resultados con la misma poliamina han sido también descritos en otras especies de géneros diferentes como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* (Böttcher et al., 2013; Ramón-Peréz et al., 2015).

En el caso de la putrescina, lo publicado hasta el momento concuerda con nuestros resultados. Liu et al., (2018) describieron como el mutante de *Pseudomonas fluorescens* Δ spuC, *knock-out* para una putrescina aminotransferasa, también forma una mayor cantidad de biofilms en comparación con la cepa *wild type*. Ding et al., (2014) describieron el efecto de la putrescina en la formación de biofilms, pero en este caso en aquellos agregados formados por *Shewanella oneidensis wild type* y el mutante *knock-out* para el gen *speF*, involucrado en la ruta de biosíntesis de la putrescina.

Sin embargo, debe destacarse que este efecto no es general para todas las poliaminas en todos los biofilms producidos por diferentes especies. Nesse et al., (2015) describieron que diferentes concentraciones de norespermidina y espermidina tienen efectos en los biofilms producidos por cepas de *Escherichia coli*, sin embargo, las mismas concentraciones de ambas poliaminas fueron incapaces de inhibir la formación de biofilms de cepas de la especie *Salmonella enterica*.

Según Si et al., (2014), la disminución en la formación de biofilms de cepas *wild type* frente a cepas con algún gen delecionado involucrado en la ruta de biosíntesis de las PAs, se debe a que las PAs sintetizadas tienen un efecto bactericida en los grupos C-O-C de los exopolisacáridos. Por tanto, esto puede explicar la reducción de la formación de biofilms de la cepa CDVBN10 y la diferencia significativa respecto a la cepa CDVBN10 Δ cpa obtenida en la presente tesis doctoral.

5. Análisis de las curvas de crecimiento de las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa.

Debido a las diferencias en la formación de biofilms a las 16 horas post inoculación, se realizó una curva de crecimiento con el fin de corroborar si esta diferencia se debía a algún tipo de cambio en la tasa de crecimiento bacteriana (figura 47).

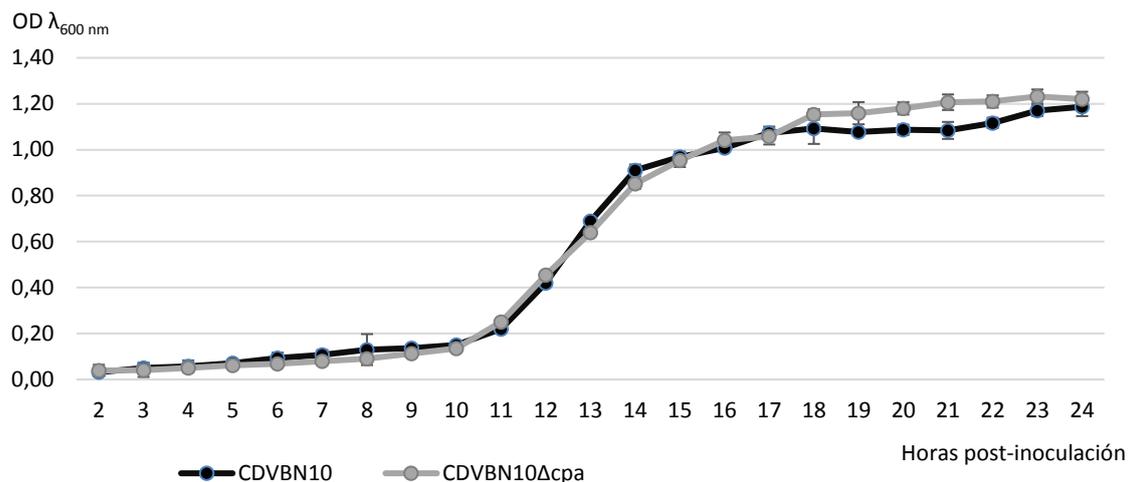


Figura 47: Curva de crecimiento bacteriano. Resultado de las absorbancias medidas para las cepas CDVBN10 y CDVBN10Δcpa. Cada valor representa la media de 3 medidas tomadas por cada una de las cepas. Las barras de error representan el error estándar.

Como se puede apreciar la diferencia en la formación de biofilm no se debe a una diferencia en la velocidad de división celular. Ambas cepas presentan un patrón similar de crecimiento alcanzando valores similares a las 16 y 24 horas, horas post-inoculación en las cuales se analizó la formación de biofilms.

6. Evaluación de la producción de sideróforos.

Debido a que en la bibliografía se ha descrito que la incorporación de diferentes poliaminas puede actuar como elicitador de la biosíntesis de sideróforos (Mcrose et al., 2018) y ya que se debía seguir caracterizando el mutante obtenido y los posibles efectos y resultados en los mecanismos PGPR, se analizó su producción (Figura 48) a través de la metodología descrita en el apartado 2.2 de materiales y métodos.

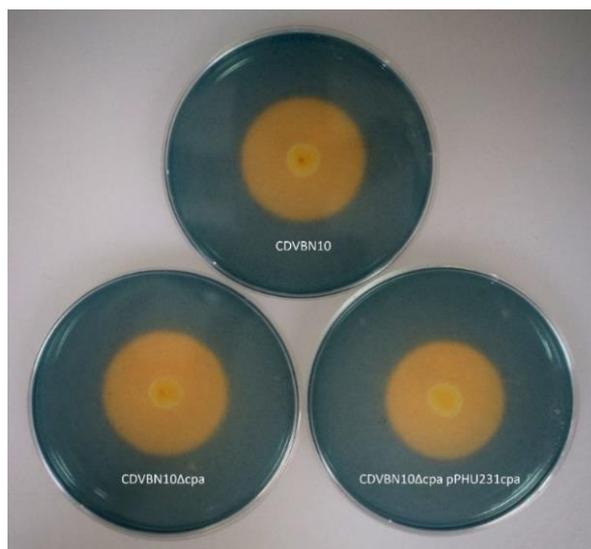


Figura 48: Análisis de la producción de sideróforos por parte de las cepas CDVBN10, CDVBN10Δcpa y CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa. Las placas que se muestran son un representante de las 3 placas por cepa que se realizaron.

Como se observa en la figura 48 las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa no muestran diferencia alguna en la producción de sideróforos, ya que el halo indicativo de producción es similar en las tres.

Sin embargo, Rüttschlin et al., (2018) describieron cómo el tipo de sideróforos producidos por *Shewanella algae* varía significativamente dependiendo del tipo de poliamina que esté disponible o sea añadida de forma exógena al medio de cultivo.

En nuestro caso la metodología realizada para detectar la producción de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987) no identifica el grupo de sideróforos producido. Así pues, se llevó a cabo el protocolo descrito por Pérez-Miranda, et al., (2007), cuya diferencia de color en el halo formado indica diferencia en el grupo de sideróforos producido. Los resultados indicaron que no existía diferencia ya que la tonalidad del halo formado por las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa fue la misma (figura 49).



Figura 49: Análisis del tipo de sideróforos producido por parte de las cepas CDVBN10 (wild type), CDVBN10 Δ cpa (KO) y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Las placas que se muestran son un representante de las 3 placas por cepa que se realizaron.

7. Análisis y evaluación de las deformaciones y redirecciones de los pelos radiculares.

Los pelos radiculares se describen como las proyecciones externas de las células de la epidermis de la raíz, cuyo incremento desemboca en una mejora de la absorción de nutrientes y agua, además de servir como anclaje al substrato (Bibikova y Gilroy, 2003). Los pelos radiculares son claves en la interacción planta-microorganismo, en los últimos años son múltiples los estudios que describen cambios en su estructura y morfología tras una inoculación bacteriana (Weber et al., 2017).

A día de hoy son muchos los trabajos científicos que describen los fenotipos radiculares observados en las interacciones simbióticas entre leguminosas y cepas bacterianas del género *Rhizobium* (Walker y Downie, 2000). En ellos se han descrito fenotipos tan diversos como el fenotipo HoT (*Hole-on-the-tip*) causado por la rotura celular en los ápices de los pelos radiculares debido a una hidrólisis enzimática (Mateos et al., 2001), el fenotipo Had (*root hair deformation*) que describe la presencia de deformaciones en los pelos (Walker y Downie, 2000) o el fenotipo RaT (*redirections-at-the-tip*) que describe el crecimiento de los pelos radiculares con marcadas redirecciones polares (Menéndez et al., 2019).

Además, en el capítulo anterior de la presente Tesis Doctoral, se ha descrito como la colonización y formación de biofilms en la superficie radicular de diferentes cultivos del tipo no-leguminosa han sido analizadas en los últimos años en múltiples investigaciones científicas (Bibikova y Gilroy, 2003). Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún estudio que describa como estas bacterias afectan al fenotipo de los pelos radicales de los cultivos que colonizan, ni el efecto de las poliaminas bacterianas en la estructura de los pelos radiculares de la planta hospedadora.

Así pues, en este estudio decidimos analizar el efecto de la cepa CDVBN10 en el fenotipo de los pelos radicales de plántulas de colza, así como el efecto de la delección del gen *cpa* y la adición exógena de putrescina. En nuestros ensayos, pudimos observar como las diferentes inoculaciones afectaron a la redirección de los pelos radiculares. En la figura 50 se presenta el resultado de las redirecciones radiculares (fenotipo *RaT*) obtenidas en los diferentes tratamientos realizados. Además, se incluyen los tratamientos donde diferentes concentraciones de putrescina exógena son añadidas al inoculo correspondiente al mutante *Knock-out*.

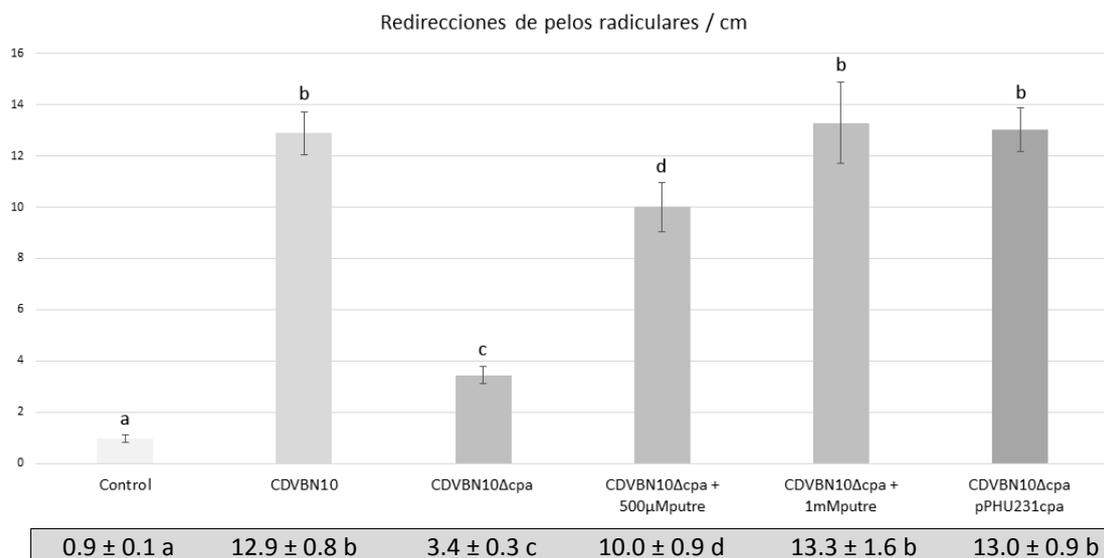


Figura 50: Recuento de las redirecciones en los pelos radicales de los tratamientos control, CDVBN10, CDVBN10Δcpa, CDVBN10Δcpa + 500 μM de putrescina exógena, CDVBN10Δcpa + 1mM de putrescina exógena y CDVBN10Δcpa-pPHU231cpa. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $p = 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

En la figura 50 observamos como los pelos radicales de las plantas de colza inoculadas con la cepa CDVBN10 presentan un número significativamente más elevado de redirecciones. Además, se observa fácilmente como en algunos pelos encontramos más de una (figura 51, C y D). Sin embargo, en aquellas raíces inoculadas con la cepa CDVBN10Δcpa el número de redirecciones disminuye drásticamente y las redirecciones observadas son significativamente menos pronunciadas que en el tratamiento anterior (figura 51, E y F).

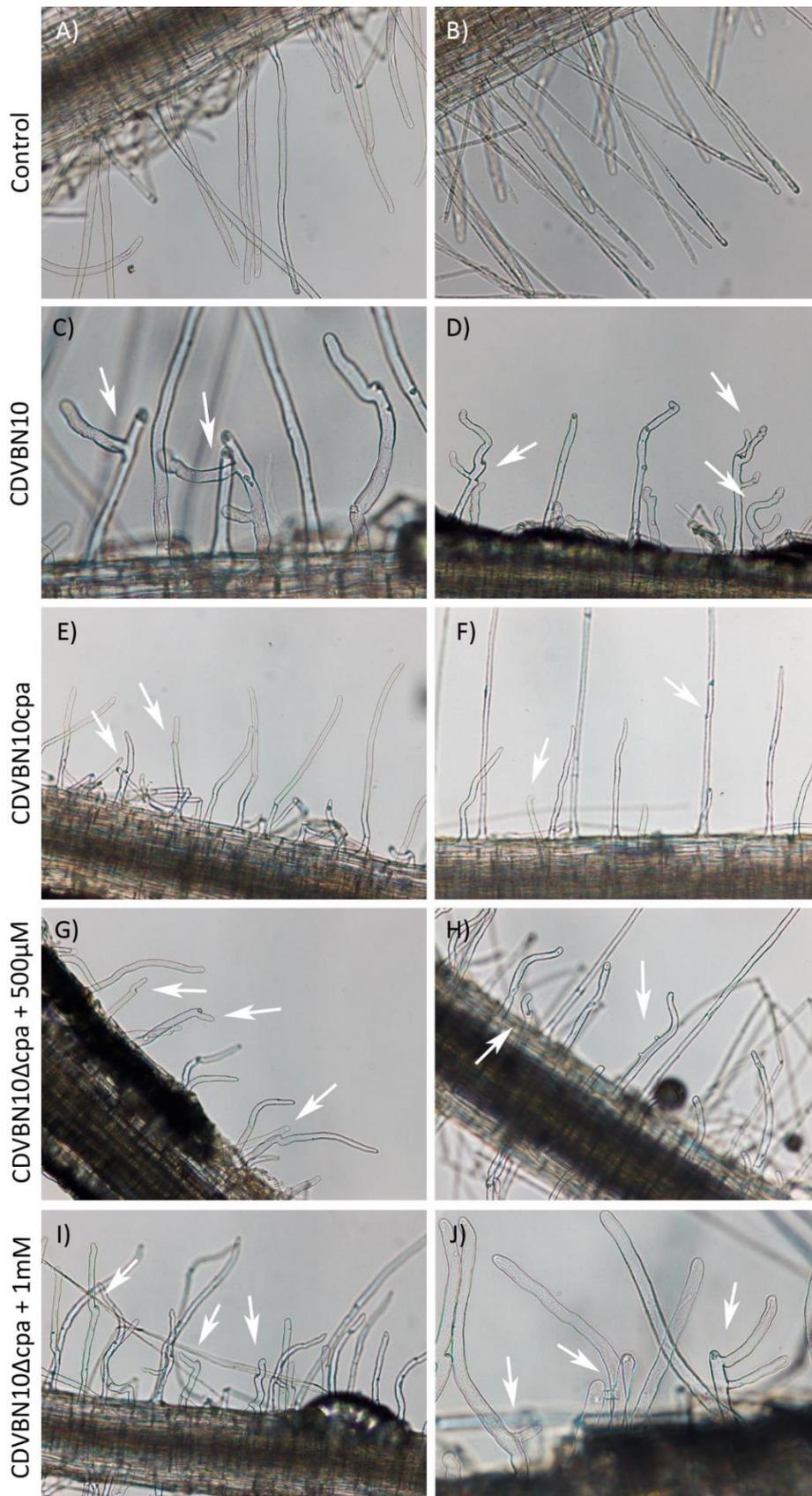


Figura 51: Detalle de las redirecciones en los pelos radiculares de los diferentes tratamientos control (A y B), CDVBN10 (C y D), CDVBN10 Δ cpa (E y F), CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M de putrescina exógena (G y H), CDVBN10 Δ cpa + 1mM de putrescina exógena (I y J).

A medida que la concentración de putrescina exógena añadida aumenta (figura 51, G-J), tanto el número como la forma observada de las redirecciones se ve modificada y de nuevo aparece el fenotipo *RaT*, similar al observado en el tratamiento con la cepa *wild type*. El número de redirecciones por centímetro de raíz de nuevo aumenta cuando las raíces de *B. napus* son inoculadas con la complementación CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa (figura 52).

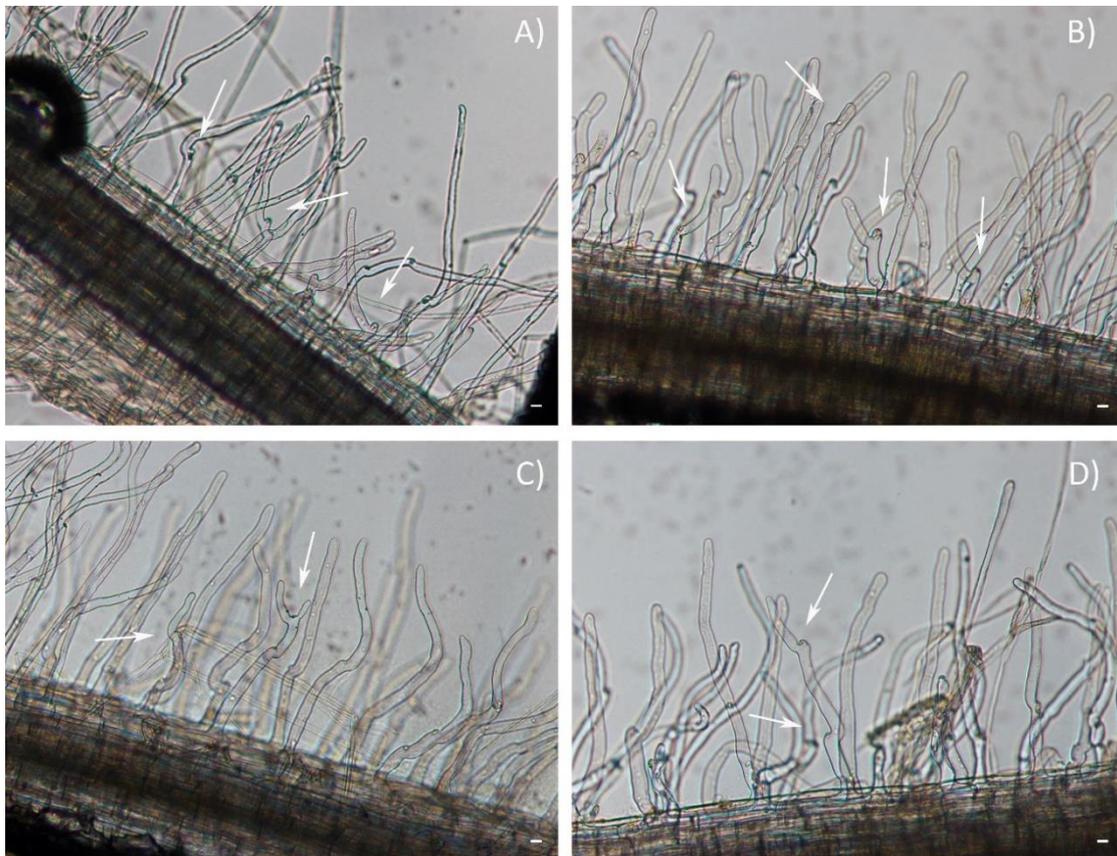


Figura 52: Detalle de las deformaciones en los pelos radiculares de plantas de *B. napus* inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. La escala corresponde a 200 μ m.

Aunque Wu et al., (2011) describieron cómo la adición de putrescina exógena mejora la colonización de raíces de *Citrus tangerina* por parte de la micorriza arbuscular *Glomus mosseae*, el efecto de la putrescina bacteriana en el número de redirecciones y el fenotipo de los pelos radiculares no había sido analizado hasta la fecha.

Qiang-Sheng et al., (2012) también estudiaron el efecto de la adición de putrescina exógena y observaron que el número de raíces secundarias de plantas de la especie *Poncirus trifolata* aumenta significativamente cuando al inóculo de la micorriza *Glomus mosseae* se le añade una concentración de putrescina de 0.05mM.

Sin embargo, estos resultados muestran y describen por primera vez el fenotipo *RaT* en pelos radiculares de plantas no leguminosas inoculadas con bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y las correspondientes diferencias en base a la biosíntesis de putrescina.

8. Estudio de la colonización de las cepas CDVBN10 y CDVBN10Δcpa mediante microscopia confocal y electrónica.

Una vez que se había observado y analizado el fenotipo de los pelos radiculares tras la inoculación con las diferentes cepas se decidió realizar un estudio con microscopia electrónica (figura 53) y confocal (figura 54) con el fin de comprobar si existían diferencias en la colonización radicular.

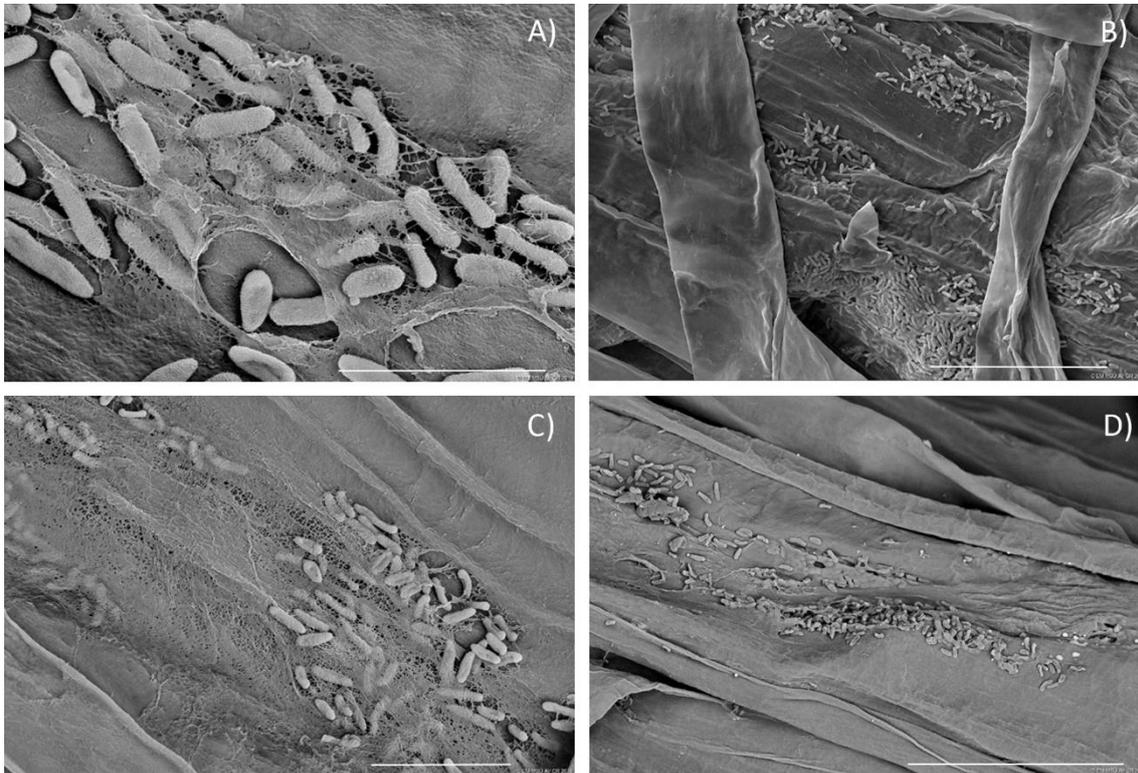


Figura 53: Fotografías de microscopia electrónica de raíces de colza a 7dpi que muestran la colonización bacteriana y formación de biofilms por parte de las cepas CDVBN10 (A y B) y CDVBN10Δcpa (C y D). La escala de A) corresponde a 3 μm, C) a 5 μm y B) y D) a 20 μm.

En la figura 53 se observa cómo no hay diferencias en la distribución y organización bacteriana de los dos tratamientos: en ambos las bacterias colonizan ampliamente la superficie radicular y la base de los pelos radiculares. Este patrón concuerda con el descrito previamente en raíces de *Arabidopsis thaliana*, también de la familia Brassicaceae (Achouak et al., 2004), inoculadas con otras cepas pertenecientes también a la especie *P. brassicacearum* o el descrito en raíces de tomate (Gamalero et al., 2004) o cebada (Hansen et al., 1997) inoculadas con cepas pertenecientes a la especie *Pseudomonas fluorescens*.

Desde los últimos 20 años, la combinación de técnicas microscópicas con los avances en biología molecular ha permitido avanzar ampliamente en el conocimiento de las interacciones microbianas con su hospedador. En concreto, la microscopia confocal junto a las células bacterianas marcadas con proteínas fluorescentes es hoy en día una herramienta muy útil en el estudio de las interacciones planta-microorganismo (Cardinale, 2014).

Para discernir si las cepas de estudio alcanzaban el interior de las raíces de colza y si existía alguna diferencia en el patrón de colonización, realizamos un ensayo de microscopía confocal a los 10 y 35 dpi, en las mismas condiciones, pero en el último caso realizando cortes transversales de las raíces.

Además, para un mayor contraste y poder visualizar mejor la estructura de las raíces, estas se tiñeron con Yoduro de Propidio, mientras que las bacterias correspondientes a las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa estaban conjugadas con el plásmido synGFP (Robledo et al., 2011), el cual contiene la secuencia que codifica una proteína verde fluorescente GFP.

Las fotografías realizadas a los 10 dpi muestran como el patrón de colonización de ambas cepas es similar. Se observa una colonización eficaz en toda la superficie radicular y pelos radiculares (figura 54, A y D) desde el extremo apical hasta la parte superior de la raíz. Se puede apreciar que en ambos tratamientos existen zonas con una gran acumulación bacteriana, sugiriendo que esos puntos pueden ser una posible vía hacia el interior radicular.

En las fotografías correspondientes a los 35 dpi se observa como las bacterias, de ambas cepas, han conseguido traspasar la exodermis y se encuentran ampliamente distribuidas en el córtex, llegando en algunas ocasiones al cilindro central (figura X, B, C, E y F). Además, se aprecia una infección intracelular de las raíces de colza en los primeros estadios de crecimiento por parte tanto de la cepa CDVBN10 como por parte de la cepa CDVBN10 Δ cpa.

En la literatura científica han sido descritos previamente patrones de colonización similares por parte de otras especies bacterianas del género *Pseudomonas* y su interés en el estudio de las interacciones planta-microorganismo. Maldonado-González et al., (2013) describen una colonización similar en raíces de plantas de olivo inoculadas con la cepa *Pseudomonas fluorescens* PICF7, la cual actúa como agente de biocontrol ante la cepa *P. savatanoi* NCPPB 3335. Prieto et al., (2011) muestran un patrón de colonización idéntico al descrito en la presente Tesis Doctoral, donde la cepa *Pseudomonas putida* PICP2 es capaz de colonizar y penetrar las raíces de plantas de olivo.

Sin embargo, los efectos de las PA, y en concreto de la putrescina, en la colonización radicular han sido poco estudiados hasta la fecha. Kuiper et al., (2001) demostraron que la putrescina exudada en las raíces de tomate tiene un efecto bacteriostático en la colonización bacteriana de *Pseudomonas spp.*, ya que un aumento en el consumo bacteriano de esta PA desemboca en una disminución de su crecimiento y por tanto de su habilidad para colonizar las raíces.

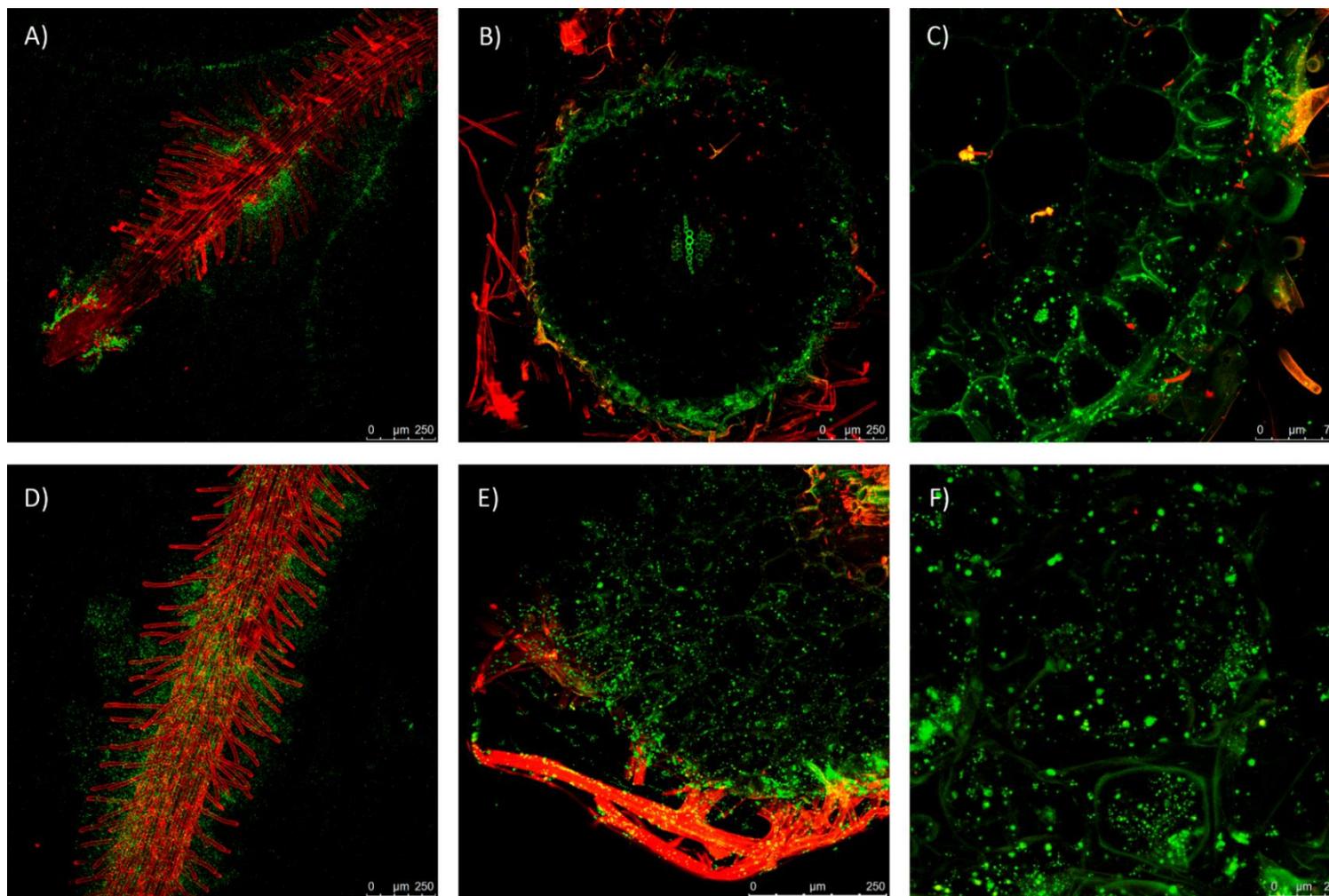


Figura 54: Fotografías de microscopía confocal en las que se muestran raíces de colza a los 10 dpi (A y D) y 35 dpi (B, C, E y F) inoculadas con las cepas CDVBN10_synGFP (A - C) y CDVBN10 Δ cpa_synGFP (D - F). Las raíces están teñidas con Yoduro de Propidio (rojo). A) y D) detalle de la superficie radicular. B), C), E) y F) cortes transversales de la raíz donde se observa tanto la colonización de los pelos radiculares como la colonización interior del córtex.

9. Caracterización de la actividad celulolítica.

Debido a la importancia de la celulosa y celulasas bacterianas descrita en la interacción planta-microorganismo (Mateos et al., 2001; Robledo et al., 2012) y en base a los resultados obtenidos en apartados anteriores, se realizó un ensayo de la actividad carboximetilcelulásica por parte de las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa (figura 55) utilizando la metodología descrita en el apartado 3.2 de materiales y métodos.

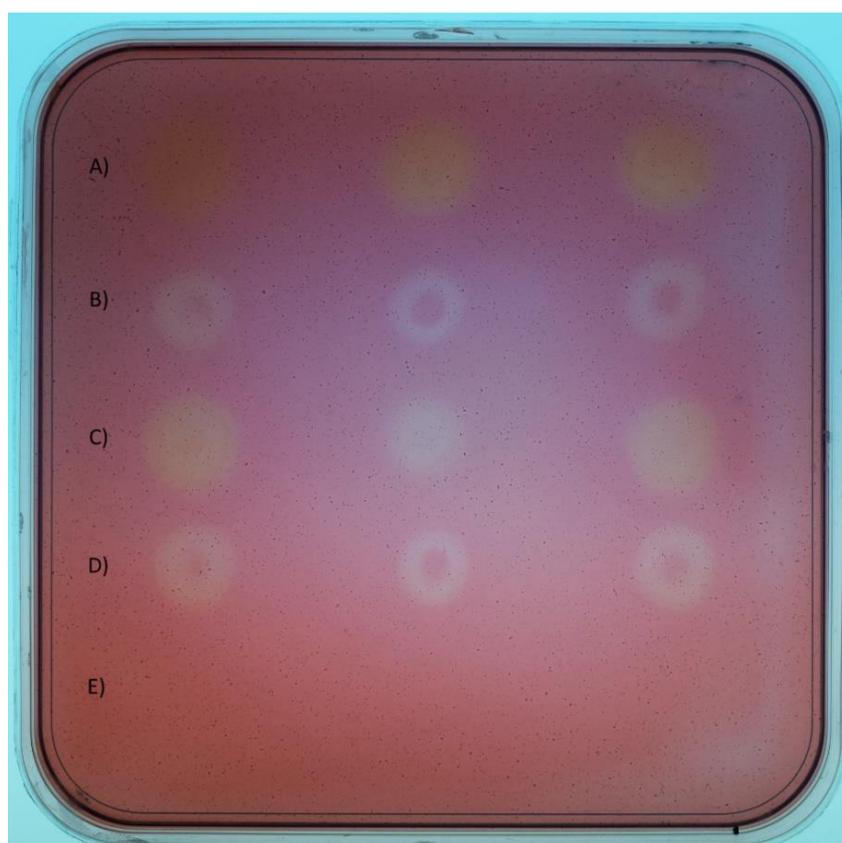


Figura 55: Ensayo de actividad carboximetilcelulásica de las cepas siguientes: A) CDVBN10, B) CDVBN10 Δ cpa, C) CDVBN10 + 500 μ M Put, D) CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M Put, E) 500 μ M Put. Las tres columnas corresponden a las tres replicas realizadas por cada tratamiento.

Los resultados cualitativos muestran que existe una gran actividad celulolítica por parte de ambas cepas, ya que se observa el halo hidrolítico alrededor de todas las colonias. Sin embargo, se aprecia que no existen diferencias entre la producción por parte de la cepa *wild type* y el mutante *knock-out*, además, la adición de putrescina exógena no altera la actividad en ningún caso. En la figura se incluye también una fila, en la que solo se añadió putrescina comercial exógena (Sigma®) y que no presentó actividad celulolítica (figura 55, E).

Estos resultados concuerdan con los disponibles en la literatura científica donde se ha detectado una producción de celulasas positiva por parte de especies del género *Pseudomonas*. A día de hoy, se ha descrito en especies como *P. fluorescens*, *P. coleopterorum*, *P. punonensis*, *P. frederiksbergensis*, *P. fuscovaginae*, *P. graminis*, *P.*

congelans, *P. lutea* y *P. brassicacearum*, entre otras (Bakare et al., 2005; Béguin y Auvert 1994; Menéndez et al., 2015; Pereira et al., 2016; Singh et al., 2015).

En base a lo establecido anteriormente y, aunque una sobreproducción de celulasas bacterianas se ha relacionado con un incremento en el número de redirecciones de los pelos radicales de plantas del tipo leguminosa inoculadas con diferentes cepas del género *Rhizobium* (Menéndez et al., 2019), en este caso el aumento de las redirecciones no se puede relacionar con un aumento de la actividad celulolítica, ni tampoco se puede afirmar que la diferencia en la biosíntesis de PAs, y en concreto de putrescina, tenga un efecto en la actividad celulolítica observada.

10. Análisis de la adhesión y cohesión bacterianas de las cepas CDVBN10 Y CDVBN10 Δ cpa.

La adhesión y cohesión bacterianas son los procesos involucrados en la unión celular. La unión celular a un sustrato (biótico o abiótico) se conoce como adhesión, mientras que la cohesión se refiere a la unión entre células, independientemente de la especie a la que pertenezcan (Fletcher, 2001).

Ambos procesos están influenciados tanto por factores intrínsecos como externos, entre los que se encuentra la hidrofobicidad de la superficie celular, la presencia o ausencia de fimbrias y flagelos, y la cantidad y calidad de la producción de exopolisacáridos (Donlan, 2002).

Además, la adhesión y cohesión bacterianas son un paso esencial en la formación de biofilms (Velmourougane et al., 2017), y por tanto lo son también en las interacciones planta-microorganismo.

En base a los resultados que habíamos obtenido hasta el momento, el siguiente paso fue comprobar si pudiera haber alguna diferencia en la adhesión y cohesión bacterianas entre la cepa CDVBN10 *wild type* y el mutante knock-out CDVBN10 Δ cpa. Para ello se siguió la metodología descrita en el apartado 3.4 de materiales y métodos.

Como se observa en la figura 56 (A), no existe ninguna diferencia entre los resultados obtenidos. Ambas cepas son capaces de adherirse a la superficie del matraz. Además, el color rojo de la adhesión nos indica que tanto la cepa *wild type* como el mutante *knock-out* producen algún exopolisacárido con enlaces β -1,3 o β -1,4, puesto que el colorante Rojo Congo comercial añadido al medio de cultivo es capaz de unirse a estos enlaces (Mateos et al., 1992; Wood et al., 1988), y por tanto mostrar esos anillos rojizos característicos en los matraces.

En la figura 56 (B) se observa que tras el periodo de crecimiento en agitación y posteriormente el reposo en estático, las bacterias de ambas cepas se han cohesionado fuertemente entre ellas formando biofilms, los cuales están completamente adheridos a la base de los matraces de ambos tratamientos.

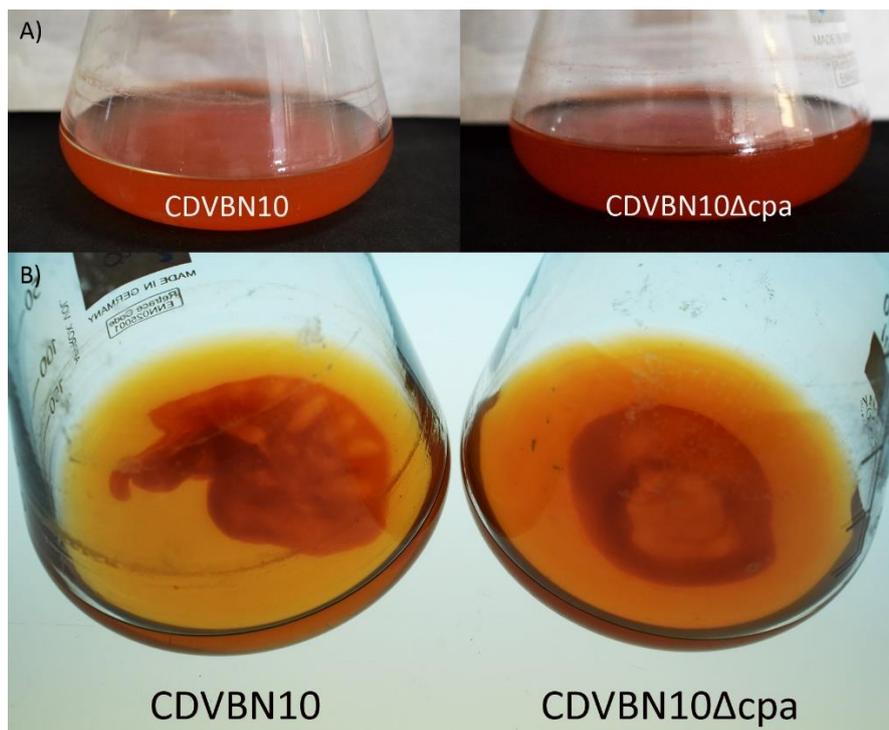


Figura 56: Resultados del ensayo de adhesión y cohesión bacteriana. A) Detalle de los anillos formados en el matraz debido a la adhesión bacteriana tras el crecimiento en agitación. B) Detalle de los biofilms adheridos a la base del matraz formados por ambas cepas. Los matraces son un representante significativo de las tres replicas realizadas por cada tratamiento.

11. Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L.

11.1 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. en los primeros estadios de desarrollo.

Durante los últimos años son múltiples las investigaciones científicas que destacan y reportan un aumento del desarrollo vegetal de los cultivos tras la inoculación de cepas con características PGPR más la adición exógena de diferentes concentraciones de poliaminas (Garg y Sharma, 2019; Naser et al., 2016). Por tanto, en el presente estudio se decidió comprobar si la adición de putrescina exógena además de modificar el fenotipo de los pelos radiculares también tendría efectos en el desarrollo vegetal en los primeros estadios como los descritos hasta el momento en otras especies vegetales.

Como se explica en el apartado 7.1 de materiales y métodos, semillas de colza desinfectadas en superficie fueron inoculadas con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa. Además, se incluyeron tratamientos a los que se añadieron diferentes concentraciones de putrescina. El análisis de la promoción del crecimiento vegetal en los primeros estadios del desarrollo se realizó a los 21 dpi (figura 57).

Como se observa en la figura 57, en las dos variables analizadas se aprecia un aumento en los valores a medida que la concentración de putrescina exógena añadida es mayor. En primer lugar, en el análisis de la longitud de la parte aérea la inoculación

con la cepa CDVBN10 *wild type* presentó los valores más altos, mientras que los valores del tratamiento control y el tratamiento con el mutante KO fueron similares.

En segundo lugar, la variable peso seco presentó el mismo patrón descrito que el descrito en el párrafo anterior, los valores más altos se corresponden a aquellas plantas de colza que fueron inoculadas con la cepa CDVBN10 *wild type* y, sin embargo, el tratamiento control y el tratamiento con el mutante KO presentaron valores similares tanto en el tratamiento sin putrescina como tras la adición de putrescina exógena en las dos concentraciones analizadas.

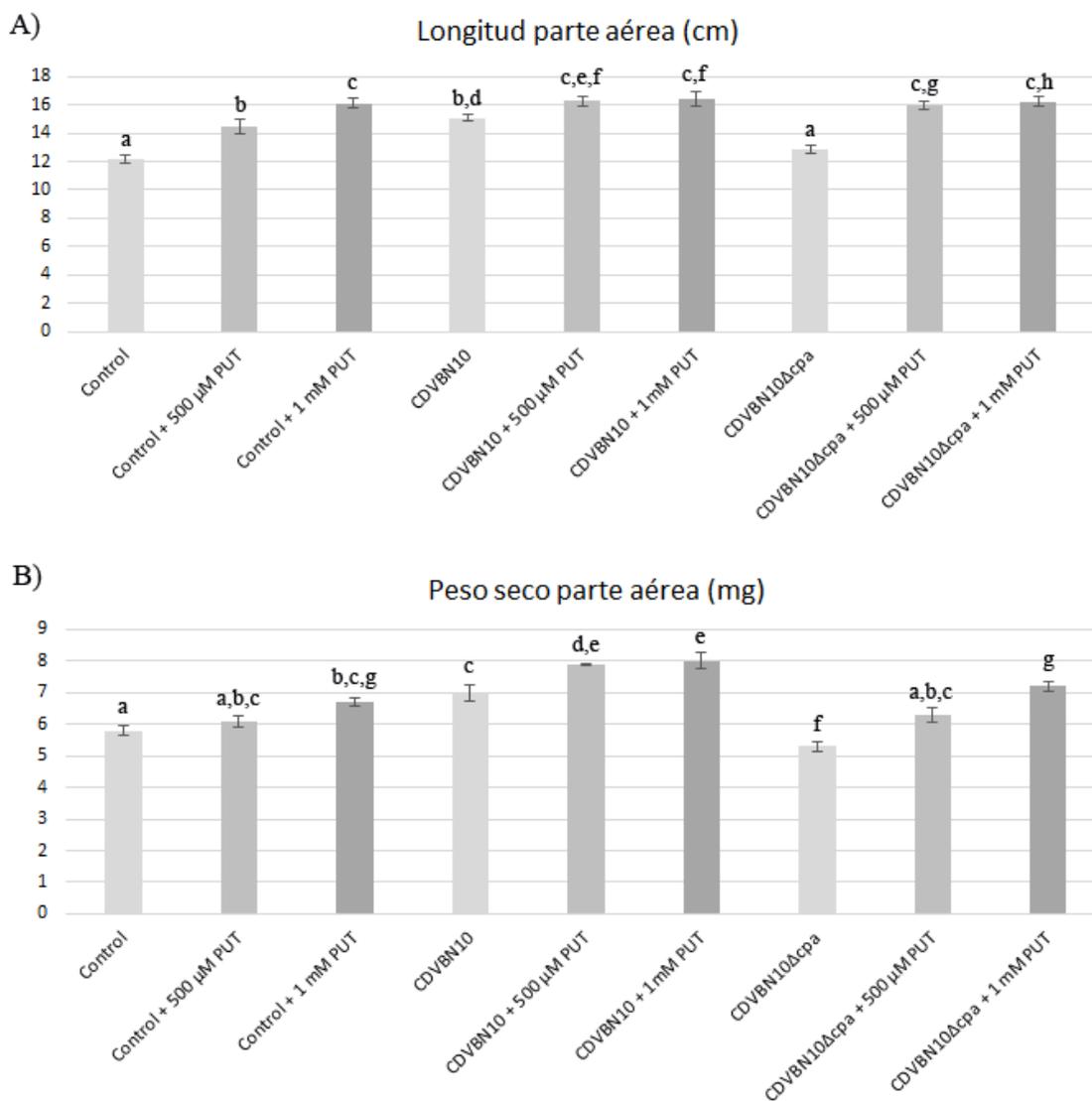


Figura 57: Representación de la longitud (A) y el peso seco (B) de la parte aérea de plantas de *Brassica napus* L. crecidas en condiciones de cámara iluminada y tras la inoculación con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa. Además, se incluyendo tratamientos con diferentes concntraciones de putrescina exógena añadida. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Este aumento concuerda y es similar a los descritos anteriormente. Naser et al., (2016) muestran como la adición de putrescina exógena, sola o combinada con diferentes bacterias PGPR del género *Bacillus* y *Paenibacillus*, promueve significativamente el desarrollo vegetal y el peso de los frutos de plantas de *Phoenix dactylera* en comparación con el tratamiento control. Hanafy-Ahmed et al., (2017) describen la concentración exacta de putrescina exógena añadida a cultivos de algodón con la cual se obtienen los mejores valores de crecimiento y desarrollo. Por su parte, Garg y Sharma, (2019) describen como la adición de putrescina exógena más la utilización de la micorriza arbuscular *Rhizophagus irregularis* como inóculo en plantas de *Cajanus cajan* aumenta el peso seco tanto de la parte aérea como de la raíz.

Debido a los resultados anteriores, el siguiente paso fue comprobar si la inoculación con las diferentes cepas obtenidas, y su correspondiente diferencia en la biosíntesis de putrescina, también tenía efectos en la promoción del crecimiento vegetal de cultivos de colza, ya que hasta el momento los estudios disponibles en la literatura científica solamente se habían centrado en la promoción de los cultivos tras tratamientos con diferentes bacterias PGPR y diferentes concentraciones de putrescina comercial añadida exógenamente (Naser et al., 2016; Vilas et al., 2018).

Como se explica en el apartado 7.3 de materiales y métodos y se observa en la figura 58, semillas de colza desinfectadas en superficie fueron inoculadas con las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. El análisis de la promoción del crecimiento vegetal en los primeros estadios del desarrollo se realizó a los 21 dpi (figuras 59 y 60).

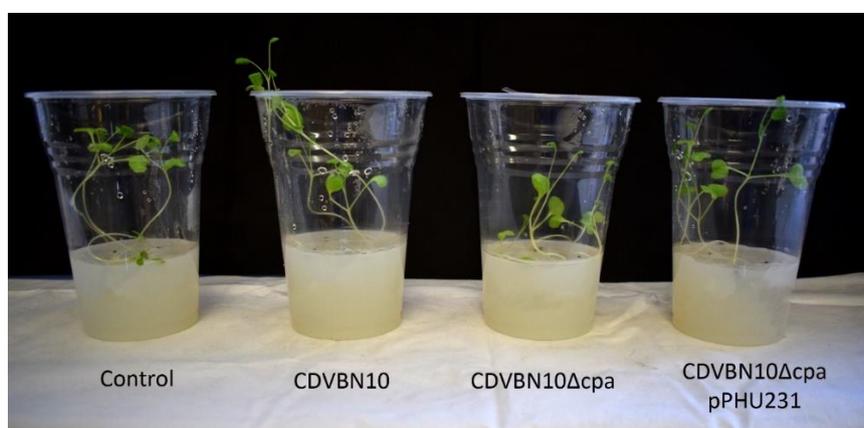


Figura 58: Comparación del fenotipo mostrado por plantas de colza a los 21 dpi bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestra una representación de los 4 tratamientos realizados. De izquierda a derecha: control negativo, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa y plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa.

La inoculación de las plantas con la cepa CDVBN10 *wild type* mostró un desarrollo vegetal significativamente mayor respecto al tratamiento control, tanto en la longitud como en el peso seco de la parte aérea (figura 59, A). Sin embargo, la inoculación con la cepa *knock-out* CDVBN10 Δ cpa presentó valores similares al tratamiento control y, por tanto, menores a los obtenidos en el tratamiento con la

cepa *wild type*, patrón similar en ambas variables. Por otro lado, el tratamiento con la complementación CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa mostró de nuevo valores superiores y significativos al tratamiento control en ambas variables.

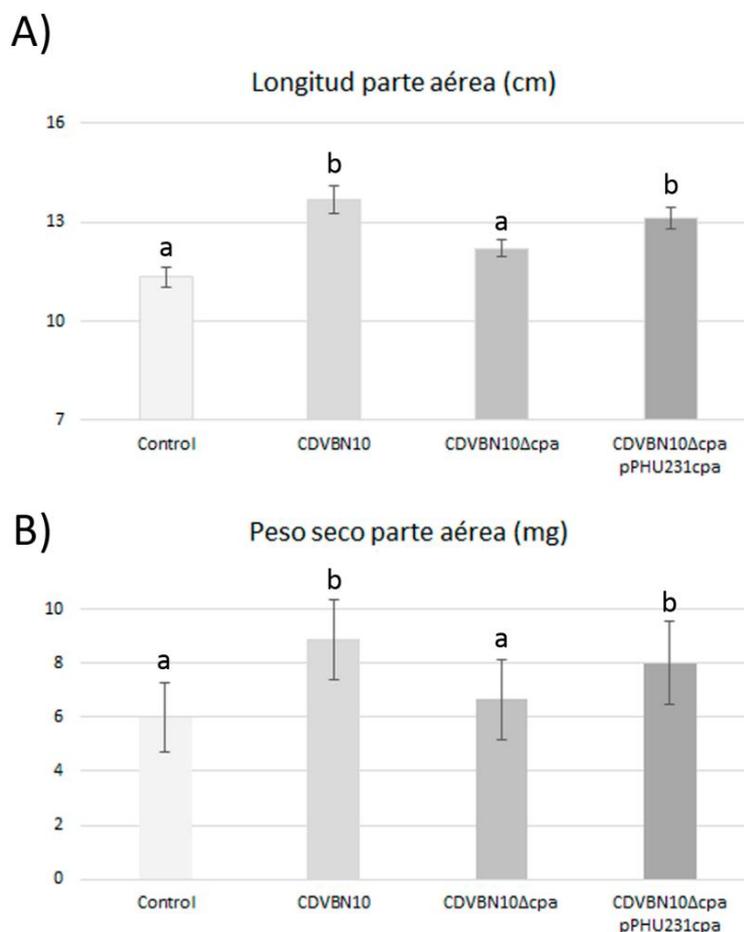


Figura 59: Representación de la longitud (A) y el peso seco (B) de la parte aérea de plantas de *Brassica napus* L. crecidas en condiciones de cámara iluminada y tras la inoculación con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Aunque hasta la fecha este tipo de estudios son muy escasos en la literatura científica, cabe destacar que resultados similares a los obtenidos en este apartado fueron obtenidos también por Nassar et al., (2003), los cuales describen y muestran la diferencia en la promoción del crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris*, tras la inoculación, por un lado, de una cepa de *Streptomyces griseoluteus* productora de PAs y por otro de un mutante deficiente en su biosíntesis. Sin embargo, no se clarifican ni detallan los genes deletados, ni tampoco las poliaminas que intervienen en el proceso.



Figura 60: Detalle de la comparación del fenotipo mostrado por plantas de colza a los 21 dpi bajo condiciones de cámara iluminada. Se muestra una representación significativa de los 4 tratamientos realizados. De izquierda a derecha: control negativo, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10, plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa y plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa.

Por tanto, en la presente Tesis Doctoral, y en concreto en este capítulo se describe por primera vez el rol de la putrescina bacteriana producida por una cepa perteneciente al género *Pseudomonas* y los efectos en el fenotipo presentado en plantas de colza tras la inoculación con la cepa *wild type* promotora del crecimiento vegetal y su comparación con el mutante *Knock-out* para el gen *cpa*, el cual interviene en la ruta de biosíntesis de putrescina (Jiménez-Gómez et al., en preparación).

11.2 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. en condiciones de estrés salino e invernadero.

Dentro de los múltiples problemas a los que el sistema agrícola actual se tiene que enfrentar se encuentra la salinidad en el terreno cultivable (Chhabra, 2017). Hoy en día, más del 6 % de la superficie disponible está afectada por problemas de estrés salino (Garg y Sharma, 2019).

La salinidad de los suelos se define por causar efectos adversos en las especies vegetales, provocando problemas como el estrés osmótico, la toxicidad específica de iones o el estrés oxidativo, los cuales desembocan en una disminución del crecimiento y desarrollo vegetal y, por tanto en un descenso de la productividad de los cultivos (Naser et al., 2016).

Estudios recientes han determinado que la aplicación de PAs exógena en las plantas disminuye los efectos negativos inducidos por el estrés salino (Do et al., 2014).

Sin embargo, no se han estudiado todavía los efectos en la promoción del crecimiento vegetal en base a la diferencia de biosíntesis de putrescina de una cepa promotora del crecimiento.

Como se explica en el apartado 7.4 de materiales y métodos para el ensayo de invernadero, las semillas de colza fueron inoculadas con las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Las plantas fueron divididas en dos tratamientos, aquellas sometidas a un estrés salino (regadas con una solución salina 200 mM NaCl) y aquellas crecidas en condiciones normales. En ambos tratamientos se incluyeron plantas control y plantas inoculadas con las tres cepas de forma independiente. El análisis de la promoción del crecimiento vegetal en los primeros estadios del desarrollo se realizó a los 45 dpi (figura 61).

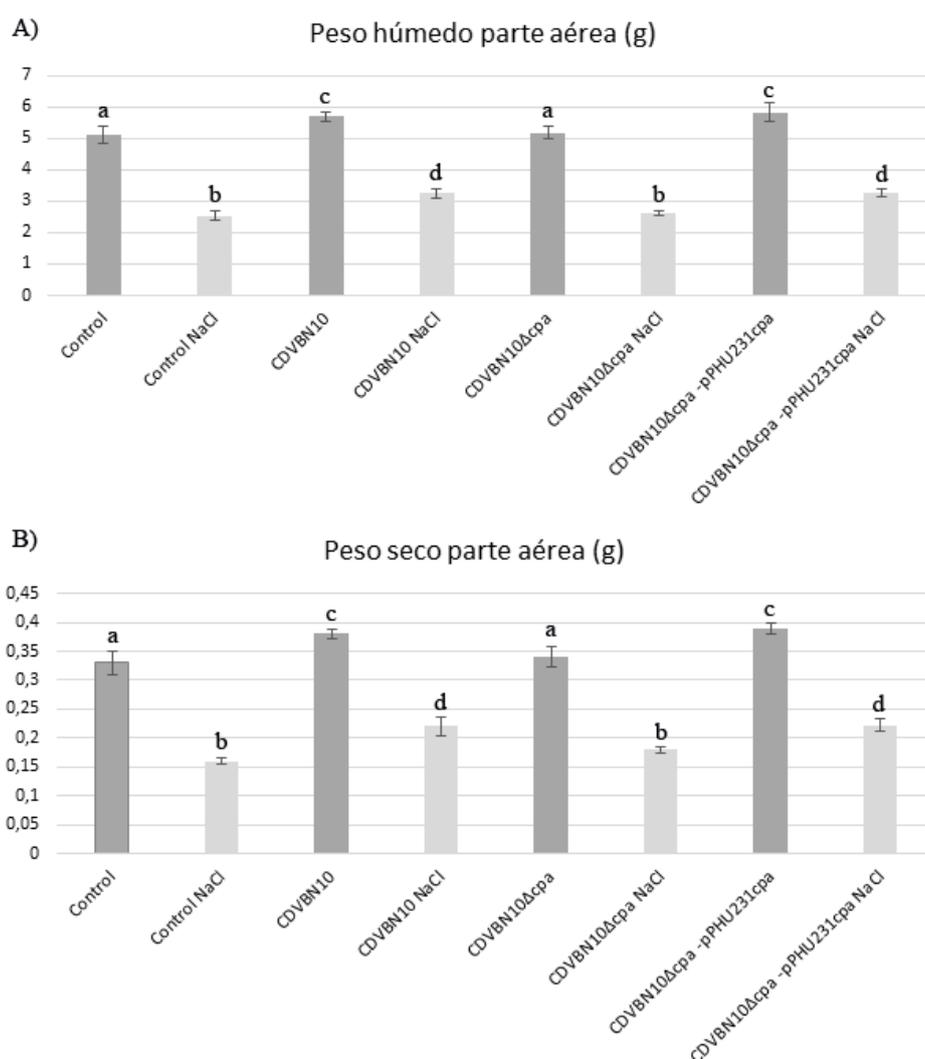


Figura 61: Representación de los valores de peso húmedo (A) y peso seco (B) de la parte aérea de plantas de *Brassica napus* L. crecidas en condiciones de invernadero (45 dpi) y tras la inoculación con la cepa *wild type* CDVBN10, el mutante *knock-out* CDVBN10 Δ cpa y la complementación CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Hoagland y medio Hoagland + 200 mM NaCl. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son

estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Los resultados muestran que la inoculación con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa aumentan los valores de peso húmedo y seco de la parte aérea respecto al tratamiento control, tanto en condiciones normales como en condiciones de salinidad. Sin embargo, los valores obtenidos tras la inoculación con el mutante *knock-out* CDVBN10 Δ cpa fueron similares a los del tratamiento control en ambas variables y en ambas condiciones de crecimiento.

Además, se realizó un análisis del contenido de clorofila en las hojas (tabla 69). En este análisis se observó como la inoculación con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa aumentó el contenido de clorofila, aunque de forma discreta, respecto al tratamiento control. Por otro lado, en condiciones de salinidad cabe destacar que en los tratamientos con las tres cepas se observó un aumento respecto al control, sin embargo, este aumento sólo fue estadísticamente significativo en los tratamientos con las cepas CDVBN10 y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa.

Tabla 69: Resultado de la inoculación de las cepas CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa y CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa en plántulas de *Brassica napus* L. bajo condiciones de invernadero tras 45 días de crecimiento. Se muestran los datos de las plantas regadas con medio Hoagland y medio Hoagland + 200 mM NaCl.

Tratamiento	Clorofila (Unidades SPAD)
Control	29.79 \pm 0.41 a
Control - 200 mM NaCl	28.31 \pm 0.88 a,c
CDVBN10	30.05 \pm 0.35 a
CDVBN10 - 200 mM NaCl	34.91 \pm 0.66 b
CDVBN10 Δ cpa	27.97 \pm 0.43 c
CDVBN10 Δ cpa - 200 mM NaCl	30.02 \pm 0.34 a
CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa	29.87 \pm 0.47 a
CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa - 200 mM NaCl	34.64 \pm 0.51 b

Los valores representan la media \pm el error estándar. Valores seguidos con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P= 0.05$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

En estudios anteriores se demuestra como la aplicación de PAs de manera exógena disminuye los síntomas vegetales bajo estrés salino (Jazo y Pottosin, 2018), gracias a una mejora en los índices K^+/Na^+ (Pottosin y Shabala, 2014), un incremento de la actividad antioxidante (Chai et al., 2010) o un incremento en la acumulación de osmolitos, como prolina o betaína (Sharma et al., 2013).

Además, se ha analizado, en una amplia variedad de cultivos (Pottosin y Shabala, 2014), como los niveles de PAs vegetales en la raíz o en la parte aérea, aumentan o disminuyen bajo condiciones de estrés salino, encontrándose así, una gran variedad de resultados para las tres PAs principales, putrescina, espermidina y espermina. Por tanto, no existe un patrón único en las especies vegetales, sino que factores como el tiempo de exposición, el metabolismo o la diferencia de tejido afecta

a su biosíntesis y vulnerabilidad frente al estrés salino, además de la respuesta adaptativa al estrés propia de cada especie vegetal (Shabala, 2000).

Así pues, estos resultados concuerdan con los descritos en la literatura científica, donde se describe que la putrescina es capaz de disminuir los efectos del estrés salino en múltiples especies vegetales (Alrasbi et al., 2010). Pero, sin embargo, es la primera vez que se describe la importancia de la biosíntesis de putrescina bacteriana y su efecto en los cultivos de colza bajo condiciones de estrés salino inducido.

11.3 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal de *B. napus* L. en condiciones de campo.

La colza (*Brassica napus* L.) es un cultivo económicamente importante en diferentes países y regiones de clima templado y subtropical, como puede ser Europa, Canadá, China o Australia (Neik, et al., 2017). Hoy en día, la colza es la segunda especie vegetal oleaginosa más cultivada después de la soja (Xiao et al., 2019). Además de ser importante para la producción de biocombustibles y lubricantes en la industria (Lu et al., 2019), es una fuente muy valiosa de alimento para los animales, y una fuente potencial de proteínas para la nutrición humana (Wanasundara, 2011).

En este sentido, el uso de bacterias promotoras del crecimiento y para el desarrollo vegetal de cultivos de colza entraría dentro de las iniciativas y nuevas políticas verdes que promueven la aplicación de este tipo de fertilizantes. Sin embargo, aunque múltiples estudios son realizados en condiciones de laboratorio y en ensayos de invernadero, aun son pocos los ensayos en campo que se han realizado con este tipo de cultivo (Lally et al., 2017).



El ensayo de campo de la presente tesis doctoral se realizó siguiendo los pasos establecidos en el apartado 7.5 de materiales y métodos. La recolección de las plantas se realizó a los 6 meses (figura 62), donde se tomaron datos del número de vainas, el peso seco en gramos de las semillas y el peso seco en gramos de la parte aérea (figura 63).

Figura 62: Resultados del ensayo de campo. A la izquierda se muestra en detalle un ejemplar representante del tratamiento control y a la derecha un ejemplar representante del tratamiento con la cepa CDVBN10. La escala representa 12 cm.

Como se observa, los resultados de la inoculación, en todas las variables analizadas fueron superiores al tratamiento control, además de estadísticamente significativos. El número de vainas aumentó en un 216.0 % respecto al control. En cuanto a los pesos secos, el aumento con el tratamiento de la cepa CDVBN10 superó significativamente los valores obtenidos en el control ya que los porcentajes llegaron a cifras del 174.3 % y 197.8 % en las semillas y en la parte aérea, respectivamente. Además, a simple vista las diferencias en el fenotipo de las plantas eran fácilmente apreciables (figura 63).

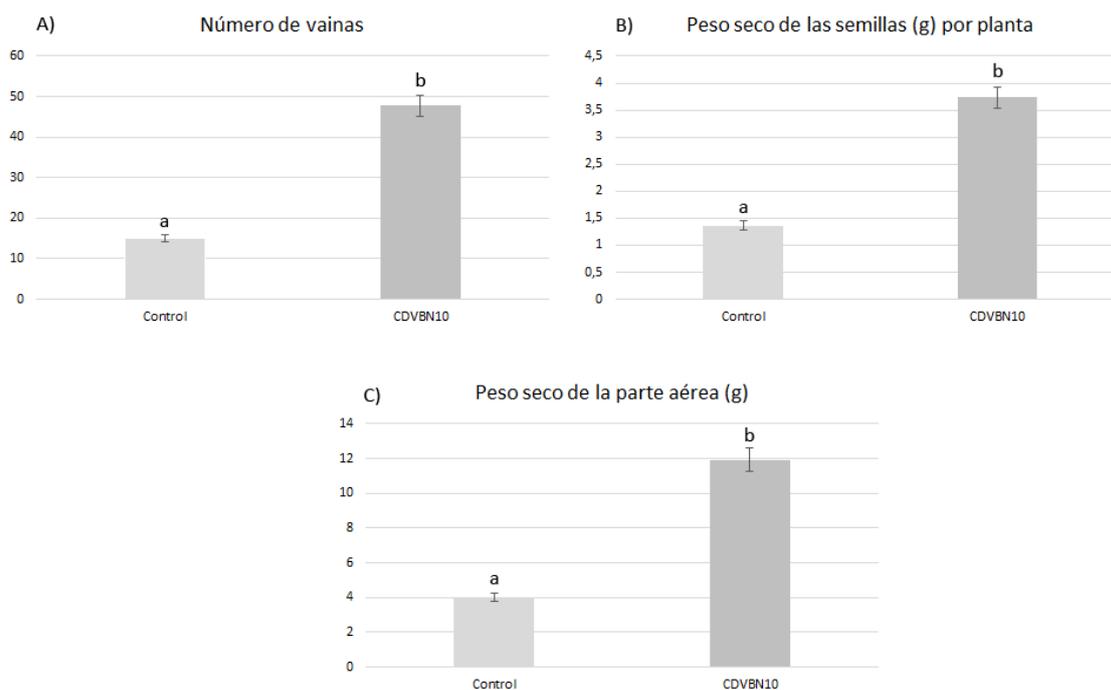
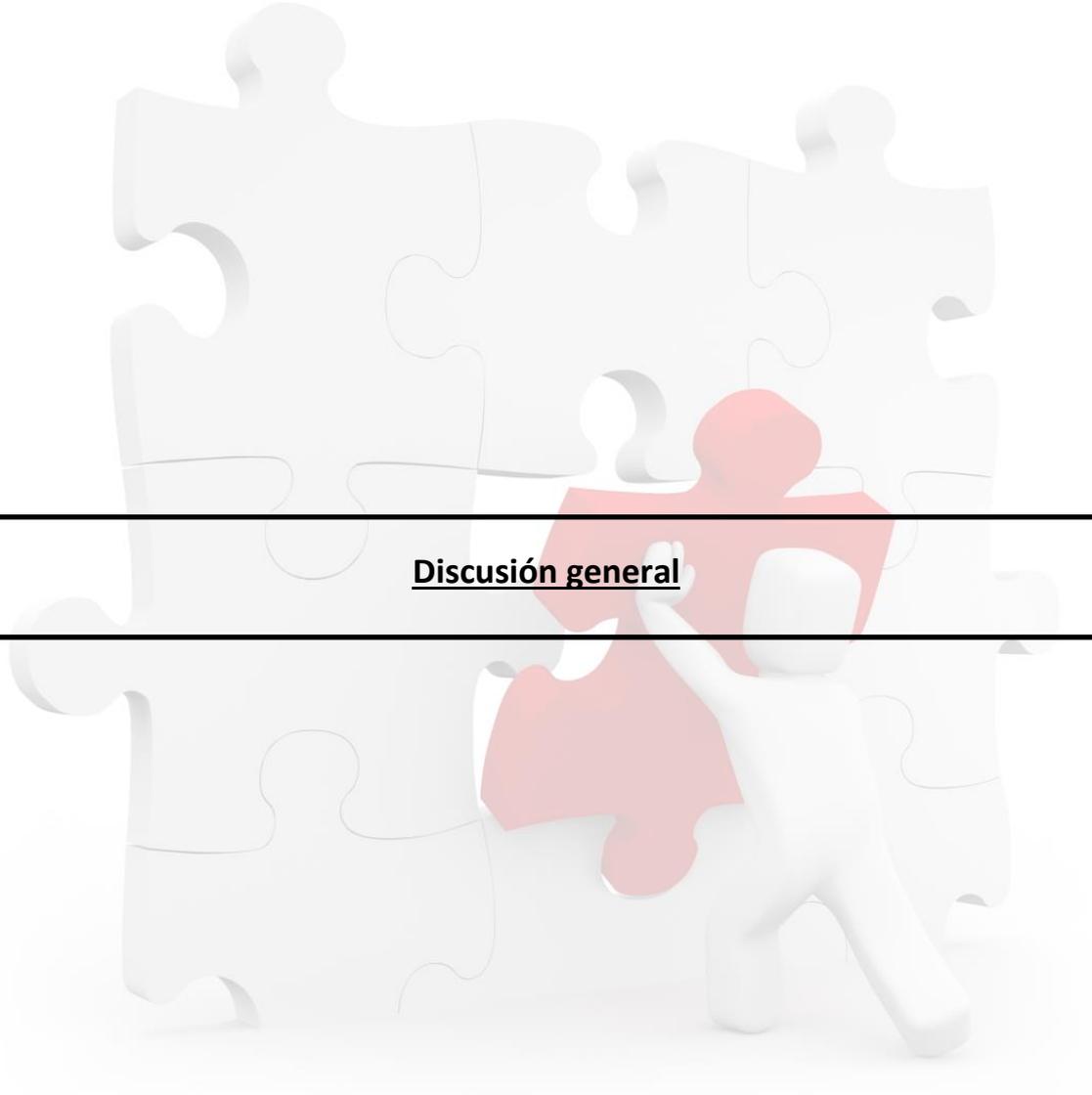


Figura 63: Resultados del ensayo de campo. Representación de los valores de número de vainas (A), peso seco de las semillas por planta (g) y peso seco de la parte aérea (C) de plantas correspondientes al tratamiento control (izquierda) y plantas inoculadas con la cepa CDVBN10 (derecha). Se representan los valores medios de las diferentes parcelas de muestreo. Las barras de error representan el error estándar. Barras de error con la misma letra indican que los valores no son estadísticamente significativos, $P = 0.01$ en base a Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

Los resultados anteriores superan y mejoran ampliamente los descritos en la literatura científica. Lally et al., (2017) también muestran como la aplicación en el campo de diferentes cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*, en concreto a la especie *P. fluorescens*, incrementan el peso seco de las semillas (25.1 %) y el peso seco de la parte aérea (22.4 %) de cultivos de colza. Sin embargo, los porcentajes de mejora respecto al tratamiento control son menores a los presentados en la presente Tesis Doctoral. Cabe destacar que en ese estudio Lally y colaboradores sólo encontraron diferencias significativas a los 9 meses de análisis, ya que a los 3 y 6 no hubo ninguna diferencia significativa entre los tratamientos con las cepas seleccionadas y el tratamiento control. Por otro lado, en este estudio ya se describen

resultados significativos a los 6 meses de análisis, tiempo al que se recogieron las muestras.

Aunque anteriormente se ha descrito la presencia de la especie *P. brassicacearum* en el microbioma de la planta y las semillas colza (Rybakova et al., 2017), además de su interacción en la promoción del crecimiento (Harvey et al., 2005), los resultados presentados en este capítulo muestran por primera vez un ensayo de campo de cultivos de colza tras la inoculación con esta especie de bacteria.



Discusión general

Hoy en día es habitual añadir fertilizantes químicos a los terrenos agrícolas con el fin de aportar a los cultivos una cantidad extra de nutrientes disponibles (Adesemoye et al., 2009). Sin embargo, desde hace décadas las políticas agrícolas de multitud de países están restringiendo y controlando su aplicación debido a los problemas causados en el medio ambiente, fruto de un uso indiscriminado y excesivo (Singh et al., 2015).

En este sentido, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) seguras para el medio ambiente y la salud humana supone una alternativa sostenible y eficaz, la cual ayuda a satisfacer la creciente demanda de alimentos y a disminuir la aplicación de fertilizantes químicos (Pérez-Montaña et al., 2014). Las bacterias PGPR son capaces de aumentar las producciones de los cultivos y mejorar su contenido nutricional a través de mecanismos directos y/o indirectos (Singh et al., 2015), pero cabe destacar que los endófitos, capaces de penetrar en los tejidos vegetales, establecen una relación más íntima con el hospedador y evitan la competición con otras especies presentes en la rizosfera (Wilson, 1995).

Así pues, es de relevante importancia el conocimiento de la biodiversidad bacteriana de los endófitos y su potencial interés en la interacción planta - microorganismo. En este sentido los estudios metagenómicos nos permiten conocer la variedad bacteriana existente y, por tanto, seleccionar y escoger los medios de cultivo o procesos de aislamiento adecuados y requeridos con el fin de obtener las especies deseadas (Tsurumaru et al., 2015).

Los análisis metagenómicos de ambos cultivos realizados en la presente Tesis Doctoral mostraron una alta diversidad bacteriana. Se han aislado 85 endófitos procedentes de los nódulos de *Phaseolus vulgaris*, y 112 endófitos de raíces de *Brassica napus*. Estos 197 aislados pertenecen a 30 géneros y 56 especies diferentes, mostrando, por tanto, una gran diversidad de bacterias asociadas a ambos cultivos.

Los géneros a los que pertenecen los aislados procedentes de nódulos de alubia habían sido descritos previamente en otras leguminosas (Carro et al., 2013; Kawaka et al., 2018). Sin embargo, está es la primera vez que se describe en el interior de plantas de colza géneros como *Neorhizobium*, *Microvirga*, *Herbaspirillum*, *Dermacoccus*, *Nocardioides*, *Isoptericola*, *Pseudoarthrobacter*, *Clavibacter* y *Shigella* (Jiménez-Gómez et al., en revisión).

Además, algunas de las secuencias obtenidas del gen ARNr 16S de algunos aislados mostraban valores de similitud bajos con respecto a las cepas tipo depositadas en bases de datos públicas, por lo que podrían ser especies nuevas, ello indica que tanto los nódulos de alubia como las raíces de colza son dos nichos interesantes para la descripción y aislamiento de nuevas especies. En consecuencia, en la presente Tesis Doctoral se ha descrito la especie *Microvirga brassicacearum* CDVBN77^T (Jiménez-Gómez et al., 2019).

Tras el aislamiento bacteriano y el análisis de la biodiversidad de ambos cultivos, se analizaron varios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, los cuales se han relacionado en la bibliografía científica con la capacidad de las bacterias para estimular el desarrollo vegetal y mejorar el contenido nutricional de los cultivos, entre los que cabe destacar la producción de sideróforos y celulosa, o la solubilización de fosfato (Arruda et al., 2013; Cornelis, 2010; Menéndez et al., 2019).

Los sideróforos juegan un papel esencial en la nutrición tanto de los microorganismos como de los cultivos, ya que permiten una mejor captación de hierro en condiciones limitantes de este elemento (Sajeed Ali y Vidhale, 2013), además de controlar a posibles competidores o fitopatógenos al disminuir la concentración de hierro disponible en el medio y por tanto reducir su crecimiento (Saha et al., 2016). Aunque las mejores producciones de sideróforos se han descrito en hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium* (Saha et al., 2016), en el presente estudio se detectó una producción positiva por parte de cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium*. Estos resultados concuerdan con anteriores estudios con cepas bacterianas de estos géneros, en los que se describe su potencial para producir sideróforos e interactuar con distintos cultivos (Galet et al., 2015; Ghasemi et al., 2018; Saïdi et al., 2014; Yu et al., 2017).

También es relevante mencionar que la celulosa bacteriana ha sido destacada por su papel en la colonización radicular, adhesión a las células vegetales y formación de biofilms (Robledo et al., 2012; Tan et al., 2016; Ude et al., 2006), ambos pasos esenciales para una interacción eficaz con la planta. Más de dos tercios de los aislados presentaron una producción positiva de celulosa, lo que les confiere cierta ventaja para iniciar una colonización eficaz. Los mejores resultados de producción de celulosa observados pertenecen a cepas del género *Rhizobium*. Estos resultados son similares a los ya descritos en otras cepas de rizobia (Flores-Félix et al., 2013; García-Fraile et al., 2012; Robledo et al., 2012). Además, esta es la primera vez que se detecta una producción de celulosa positiva en especies como *Clavibacter capsici* o *Bacillus halotolerans*, aunque si se ha descrito en otras especies pertenecientes a los mismos géneros (Haque et al., 2015; Jahr et al., 2000).

La solubilización de fosfato es ampliamente estudiada en la interacción planta-microorganismo debido a la importancia de este elemento en la nutrición vegetal y, los problemas asociados a su déficit (Anand et al., 2016). En el presente estudio aquellas cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron las que presentaron una solubilización destacada, lo que concuerda con los estudios realizados por Pereira y Castro (2014) y Arruda et al., (2013) en los *screenings* de aislados del interior de plantas de maíz. Los resultados obtenidos en cepas del género *Bacillus* también concuerdan con lo descrito en la bibliografía científica para especies como *B. aryabhatai* (Lee et al., 2012) o *B. megaterium* (Tao et al., 2008).

Otro aspecto analizado fue la producción de enzimas degradadoras de diferentes componentes de la pared celular vegetal, como celulasas, pectinasas o xilanasas, descritas previamente por estar involucradas en los procesos de colonización e infección bacteriana de cultivos de interés (de Vasconcellos y Cardoso, 2009; Jung et al., 2007; Mostajeran et al., 2007; Reetha et al., 2014; Robledo et al., 2008).

En cuanto a la producción de celulasas, se detectaron cepas con alta actividad celulolítica pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Massilia* y *Microbacterium*. Estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía hasta el momento en los géneros *Flavobacterium* (Lee et al., 2006), *Rhizobium* (Robledo et al., 2008), *Microbacterium* (Li et al., 2019) o *Pseudomonas* (Menéndez et al., 2015). En el presente estudio se observó además una producción positiva de celulasas por parte de cepas del género *Bacillus*, las cuales son similares a las altas producciones descritas previamente en otras especies del mismo género (Gaur y Tiwari, 2015; Narkthewan y Makkapan, 2019). Estudios previos publicados demostraron como la producción de celulasas por parte de cepas del género *Rhizobium* es un proceso clave en la simbiosis planta – microorganismo, ya que es un mecanismo eficaz y esencial de entrada en el hospedador (Robledo et al., 2008). Así pues, el análisis de la producción de ese tipo de enzimas permite predecir la posible entrada hacia el interior radicular.

Por otro lado, la mayor actividad pectinolítica se obtuvo en cepas pertenecientes a las especies *Bacillus aryabhatai*, *B. paralicheniformis* y *Pseudomonas brassicacearum*, resultados que concuerdan con los descritos para otras especies de los mismos géneros (Kaur y Gupta, 2017; Sohail et al., 2016). Aunque una producción de pectinasas positiva se ha descrito en especies como *B. paralicheniformis* (Rahman et al., 2019) y *Pseudomonas brassicacearum* (Duan et al., 2012), esta es la primera vez hasta la fecha que se describe una producción positiva en una cepa de la especie *B. aryabhatai*. Mostajeran et al., (2007) describieron como la producción de pectinasas por parte de diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* permite y aumenta la colonización de raíces de trigo de diferentes cultivares, además de su desarrollo y crecimiento vegetal.

La producción de xilanasas detectada en el presente estudio concuerda y amplía el número de especies con una producción positiva. En primer lugar, la cepa *Paenibacillus xylanexedens* MACPVE10 presentó una producción positiva, la cual ya había sido descrita previamente en otra cepa del mismo género por degradar xilano (Nelson et al., 2009). Además, se describe por primera vez la producción de xilanasas por parte de la especie *Bacillus safensis*, aunque sí que se había descrito una elevada producción en otras especies del mismo género como *B. subtilis* (Marimuthu et al., 2019) o *B. pumilus* (Silano et al., 2019). Yang y colaboradores (2011) demostraron como la producción bacteriana y fúngica de celulasas y xilanasas es esencial para la degradación del material vegetal y, por tanto, importante en la interacción planta – microorganismo.

El estudio de mecanismos PGP directos e indirectos, así como la evaluación de la producción de enzimas degradadoras de componentes de la pared celular vegetal permitió la selección de aquellas cepas con un mayor potencial *in vitro*. Además, gracias al análisis *in silico* de sus genomas se pudo profundizar en los mecanismos involucrados en la interacción con los cultivos vegetales. En este sentido, y en base a los resultados disponibles en la bibliografía científica, se seleccionaron las cepas MACPV40 perteneciente al género *Rhizobium*, CDVBN10 perteneciente al género *Pseudomonas* y SCCPVE07 perteneciente al género *Bacillus*. Además, debido a la seguridad para el medio ambiente y la salud humana descrita en cepas del género *Rhizobium*, se incluyó, la cepa PEPV40, aislada previamente en el grupo de investigación y que también ha sido protagonista de esta Tesis Doctoral.

Gracias al análisis del genoma se observó cómo las 4 cepas analizadas poseen genes involucrados en las diferentes rutas de biosíntesis del ácido indolacético, una fitohormona involucrada en el desarrollo y crecimiento vegetal (Yu et al., 2016), o disponen de genes relacionados con el metabolismo y transporte de una amplia variedad de sideróforos, así como de genes involucrados en la captación y solubilización de fosfato. Además, se detectaron genes involucrados en la biosíntesis de osmolitos, como glicina-betaína o prolina, u otras enzimas relacionadas con la disminución de los efectos negativos causados por diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos. Los resultados obtenidos concuerdan y amplían los publicados en otras especies promotoras del crecimiento vegetal de los mismos géneros bacterianos (Grichko y Glick, 2000; Kwak et al., 2015).

Del mismo modo, también se realizó una búsqueda de aquellos genes de interés implicados en la colonización e infección radicular como los conformantes del operón *celABC* (Robledo et al., 2012) o el operón *epsA-O* (Gerwig et al., 2014). De forma paralela se analizaron los genes implicados en la producción y formación de biofilms, matrices extracelulares implicadas en la colonización radicular (Velmourougane et al., 2017). En los 4 genomas se localizaron diferentes genes involucrados tanto en la síntesis de polisacáridos como en la colonización radicular.

La comparación de genomas permitió la localización de genes involucrados en los mecanismos observados de manera *in vitro* y, de forma adicional, la ampliación en el análisis con la producción de fitohormonas u otros compuestos de interés en la interacción planta - microorganismo. Los análisis *in silico* realizados permiten predecir la idoneidad de las cepas bacterianas como biofertilizantes mediante el estudio de las rutas metabólicas, además de permitir realizar un diseño en base a los requerimientos nutricionales o sustratos necesarios para la síntesis de ciertos compuestos de interés (Crovadore et al., 2016).

En base al potencial de promoción de crecimiento vegetal inferido del análisis *in silico* de los genomas de estas cepas, se seleccionaron finalmente las cepas PEPV40,

CDVBN10 y SCCPVE07, pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* para evaluar y analizar los efectos en el desarrollo vegetal y contenido nutricional de cultivos de interés alimentario y bioenergético.

Desde las últimas décadas se ha analizado el efecto en la promoción vegetal y contenido nutricional de diferentes cepas del género *Rhizobium* tanto en plantas leguminosas como en otros cultivos hortícolas de interés agroalimentario. Por tanto, en primer lugar, se evaluó y estudio el potencial como biofertilizante de la cepa PEPV40 en cultivos de espinaca (Jiménez-Gómez et al., 2018), cultivo hortícola más vendido en España para su procesado o congelación.

De forma general, se observó una promoción del crecimiento en los primeros estadios vegetales, así como un aumento significativo en condiciones de invernadero, mejorando no sólo su desarrollo sino también la calidad nutricional y contenido de clorofila en las hojas de espinaca inoculadas con la cepa PEPV40 respecto a las hojas del tratamiento control. Además, mediante un estudio de microscopia de fluorescencia se pudo observar una colonización bacteriana significativa de las raíces, la cual aumentó respecto al tiempo. Estos resultados concuerdan y son similares a los obtenidos con anterioridad en otras cepas del género *Rhizobium* como son la PEPV16 y E15, las cuales han sido también descritas por aumentar el peso seco y mejorar el contenido de potasio, fósforo y nitrógeno de cultivos de lechuga, y rúcula, respectivamente (de Souza et al., 2016; Flores-Félix et al., 2013).

Una vez observado el potencial de una de las cepas escogidas en el presente estudio, se continuó con el estudio de la interacción entre las tres cepas seleccionadas y cultivos de interés agroalimentario sometidos a estrés salino, puesto que la salinidad de los suelos es uno de los retos inminentes a los que la agricultura actual tiene que hacer frente buscando nuevas soluciones. La salinidad de los terrenos agrícolas desemboca en una disminución del crecimiento vegetal y por tanto un descenso de las producciones (Machado y Serralheiro, 2017). Una de las alternativas propuestas es la aplicación como biofertilizantes de cepas que además de promover el desarrollo vegetal y mejorar los contenidos nutricionales sean capaces de minimizar los efectos de los cultivos bajo las condiciones de estrés (Kumari et al., 2009).

Dentro de la amplia lista de cultivos sensibles a la salinidad de los suelos se encuentran la escarola y el cilantro, ambos son cultivos de interés agroalimentario, cuyas ventas en los últimos años han aumentado significativamente (Pacheco et al., 2016; Papetti et al., 2008). Además, son cultivos con grandes cantidades de compuestos fenólicos en su composición, compuestos cuyos efectos positivos frente a enfermedades como el *parkinson* o el cáncer han sido descritos previamente en la bibliografía científica (Cao et al., 2019; Fikry et al., 2019; Pittalá et al., 2018). En este sentido, se analizó la interacción de las cepas seleccionadas en estos cultivos, los cuales fueron sometidos a estrés salino.

En primer lugar, el análisis de la colonización radicular mostró de forma general una colonización eficaz, en ambos cultivos, que aumenta con el transcurso del tiempo, observándose un incremento de bacterias adheridas en la superficie radicular y un aumento de biofilms a lo largo de la raíz, pelos radiculares y zonas de emergencia de raíces laterales. Estos patrones de colonización coinciden con los descritos en la bibliografía para distintas especies de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* en otros cultivos de interés agroalimentario (Liu et al., 2006; Mitra et al., 2016). Además, la evolución de la colonización respecto a los días tras la inoculación bacteriana ha sido también descrita en cultivos como mandarinos o bananos (Posada et al., 2018; Thokchom et al., 2017).

Así pues, una vez analizada la colonización positiva en los primeros estadios del desarrollo, se evaluó la promoción vegetal de los dos cultivos bajo condiciones normales y de estrés salino inducido. De forma general, los tratamientos inoculados con las bacterias seleccionadas presentaron, en ambas condiciones de crecimiento, una mejora en la longitud y el peso seco de la parte aérea. Esta es la primera vez que se evalúa el efecto de diferentes bacterias PGPR en los primeros estadios de desarrollo de plantas de escarola y cilantro tanto en condiciones normales como de estrés salino. Aunque algunas cepas de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* han sido evaluadas en plantas de cilantro en condiciones normales (Warwate et al., 2017), los resultados son significativamente inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Por otra parte, no hay estudios hasta la fecha que analicen el efecto de cepas PGPR en cultivos de escarola.

Con estos resultados se procedió a un ensayo de invernadero, de nuevo bajo condiciones normales y de estrés salino. Se observó como las inoculaciones independientes de las cepas seleccionadas aumentaban los parámetros de las variables analizadas, como el peso seco de la parte aérea, el número de hojas o el contenido de clorofila.

Hasta la fecha son escasas las investigaciones científicas que han analizado el efecto de bacterias PGPR sobre cilantro. Mishra et al., (2017) evaluaron parámetros de desarrollo vegetal de plantas de cilantro bajo la inoculación independiente de especies diferentes a las del presente estudio pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Sin embargo, aquí se analiza además la interacción por primera vez de una cepa perteneciente al género *Rhizobium*.

En cuanto a cultivos de escarola, cabe recalcar que no existe hoy en día ninguna investigación publicada que analice el efecto de bacterias PGPR en el desarrollo vegetal. Las únicas investigaciones y estudios con bacterias PGPR han sido realizadas en plantas de radicchio (*Cichorium intybus*) del mismo género.

En base al interés nutricional que presentan la escarola y el cilantro se analizaron los elementos nutricionales y compuestos fenólicos de sus hojas, la parte comestible de

ambos cultivos, tras la inoculación con las bacterias seleccionadas. Este análisis no ha sido realizado tampoco hasta la fecha en ningún de los dos cultivos.

De forma general, se describe un aumento en las concentraciones y en ambas condiciones de todos los elementos analizados respecto al control. Aumentos similares ya han sido descritos previamente en la bibliografía científica en estudios con cepas pertenecientes a los mismos géneros en otros cultivos agrícolas como la lechuga (Flores-Félix et al., 2013), la rúcula (de Souza et al., 2016), el repollo (Turan et al., 2014) o la batata (Dawwam et al., 2013).

Además de las repercusiones en múltiples enfermedades humanas, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios vegetales con capacidad para disminuir los efectos negativos de los cultivos bajo diferentes tipos de estreses (Riaz et al., 2018). Generalmente, se observó un incremento tanto de los ácidos fenólicos como de los flavonoles analizados en aquellos tratamientos con las cepas seleccionadas. Cabe destacar la diferencia entre las condiciones de crecimiento, ya que en condiciones normales el aumento respecto al control es menor que en las condiciones de salinidad. Sin embargo, se ha observado como en el tratamiento control las concentraciones son mayores en aquellos precursores de los otros ácidos o flavonoles, como lo son el ácido cinámico (Yang et al., 2018) o el ácido cafeico (Cao et al., 2019).

Cabe destacar la escasez de investigaciones científicas que analizan estos compuestos en cultivos hortícolas tras la inoculación con bacterias PGPR. Hoy en día no existen estudios que analicen el aumento de los compuestos fenólicos de cultivos de cilantro y escarola tras la inoculación con bacterias. Sin embargo, los incrementos observados en el presente estudio concuerdan y son similares a los descritos en otros cultivos como el tomate (Loganathan et al., 2014), la fresa (Flores-Félix et al., 2018) o el pepino (Nawaz y Bano 2019) tras la inoculación con especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*, respectivamente.

Por otro lado, y debido al gran problema con la salinización de suelos agrícolas, que origina importantes detrimentos de su fertilidad, una parte de este estudio se centró en profundizar en el conocimiento de los mecanismos por los que determinadas bacterias incrementan la resistencia de las plantas al estrés salino. Dentro de las sustancias o compuestos involucrados en la disminución de los efectos del estrés salino en plantas se encuentran las poliaminas. En los últimos años se ha descrito su papel esencial en el crecimiento y desarrollo vegetal, defensa contra patógenos y colonización radicular bacteriana (Majumdar et al., 2019; Vilas et al., 2018). Dentro de la amplia variedad existente se destaca la putrescina, precursora de espermidina y espermina, siendo estas tres moléculas las principales poliaminas sintetizadas por las plantas (Sekula et al., 2016).

El análisis del genoma de *P. brassicacearum* CDVBN10 mostró la presencia de los genes relacionados con la biosíntesis de poliaminas. Por tanto, en la presente Tesis Doctoral se evaluaron por primera vez los efectos de la reducción de la biosíntesis de putrescina bacteriana por parte de la cepa CDVBN10 en la promoción del crecimiento vegetal y desarrollo de los primeros estadios de crecimiento de plantas de colza. Para ello, se utilizó la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9, a través de la cual se deletó el gen *cpa* involucrado en la ruta de biosíntesis de putrescina bacteriana (Cunin et al., 1986).

Se ha comprobado de esta forma como la reducción en la producción de putrescina por parte del mutante *knock-out* CDVBN10 Δ *cpa* tiene efectos en la interacción planta-microorganismo. La comparación en los primeros estadios reveló por primera vez como el mutante KO disminuye el fenotipo *RaT* observado en los pelos radiculares y como la formación de biofilms aumenta a las primeras horas de análisis, igualándose a la producción por parte de la cepa *wild type* a las 24 horas.

Estudios anteriores señalan diferencias en la producción y el tipo de sideróforos sintetizados por diferentes especies de bacterias al encontrarse en el medio diferentes concentraciones y tipos de poliaminas (Rütschlin et al., 2018). En este caso, no se detectaron diferencias y, la producción de sideróforos observada fue igual en todos los casos. Tampoco se detectaron diferencias en la actividad celulolítica o colonización radicular.

Los resultados en los primeros estadios de desarrollo vegetal mostraron como el tratamiento con la cepa KO presentó valores inferiores al tratamiento con la cepa *wild type* y similares al tratamiento control, en cuanto a variables como la longitud y el peso seco de la parte aérea. Sin embargo, la adición de putrescina comercial añadida de forma exógena reveló un aumento en los valores de las variables analizadas. Estos aumentos concuerdan con los publicados anteriormente donde la adición de putrescina exógena desemboca en un mayor desarrollo vegetal de los cultivos de *Phoenix dactylera* o *Cajanus cajan* (Garg y Sharma, 2019; Naser et al., 2016).

Con el fin de corroborar el efecto provocado por la delección del gen *cpa*, se llevó a cabo la correspondiente complementación a través del plásmido pPHU231, descrito en la bibliografía para la realización de complementaciones con fines similares al de la presente Tesis Doctoral (Paço et al., 2016). El posterior análisis de la promoción del crecimiento de plantas de colza en los primeros estadios reveló una reversión del fenotipo, obteniéndose de nuevo valores similares entre el tratamiento con la cepa *wild type* y la cepa CDVBN10 Δ *cpa*-pPHU231*cpa*.

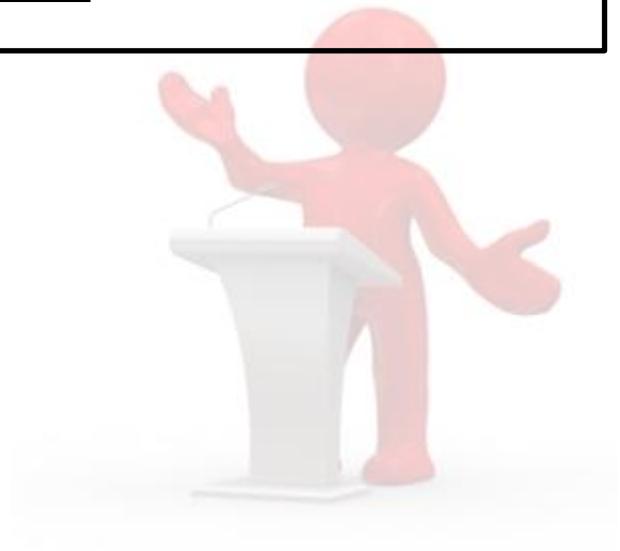
Bajo condiciones de salinidad y en condiciones de invernadero se observaron valores similares entre los tratamientos con las cepas CDVBN10 y la respectiva complementación CDVBN10 Δ *cpa*-pPHU231*cpa*, los cuales fueron significativamente

superiores a los obtenidos para el tratamiento control y el tratamiento con la cepa KO CDVBN10Δcpa. En este sentido se corrobora el efecto de la putrescina en condiciones de estrés salino, descrito previamente en otros cultivos como el arroz (Do et al., 2014), pero por primera vez se evalúa y analiza el efecto de la diferencia de concentración de putrescina bacteriana en el crecimiento y desarrollo de plantas de colza.

Tras los resultados anteriores se realizó un ensayo de campo, en el cual se observó un aumento, respecto al control, de todas las variables analizadas. Estos resultados concuerdan y mejoran a los descritos previamente por otras cepas del género *Pseudomonas*. Lally et al., (2017) muestra como la aplicación de la especie *P. fluorescens*, incrementa el peso seco de las semillas y el peso seco de la parte aérea de cultivos de colza a los 9 meses tras la inoculación. Sin embargo, los porcentajes de aumento obtenidos en la presente Tesis Doctoral y, a los 6 meses de análisis, son significativamente superiores.

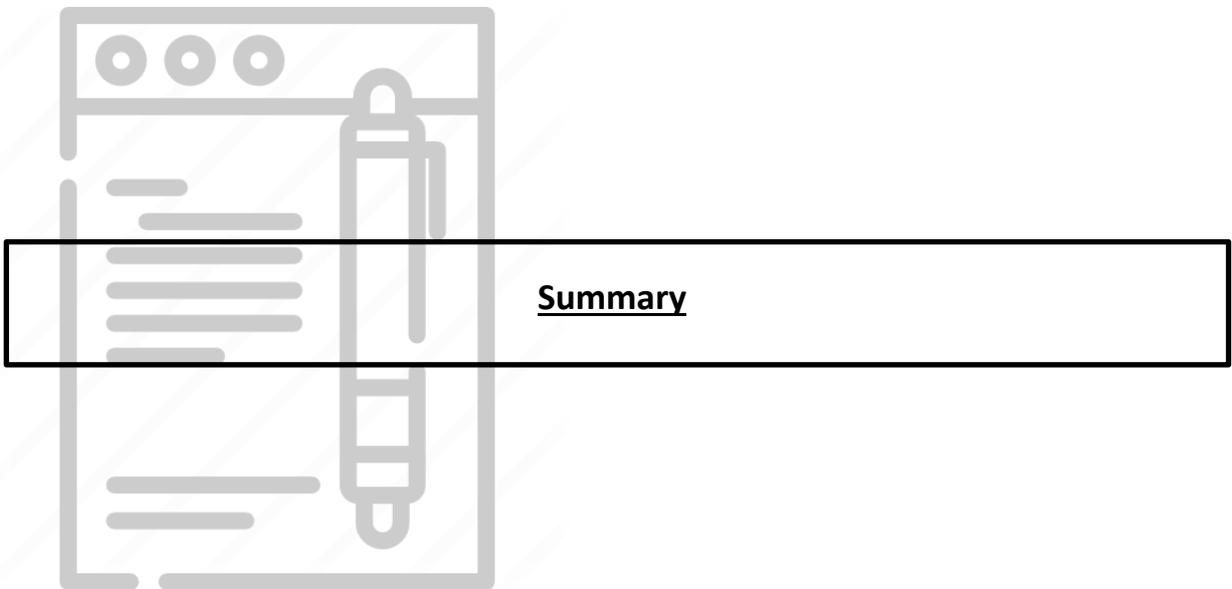
Finalmente, y aunque ya se ha descrito la presencia de la especie *P. brassicacearum* en el microbioma de la planta y las semillas colza (Rybakova et al., 2017), además de su interacción en la promoción del crecimiento (Harvey et al., 2005), esta es la primera vez que se describe y analiza el fenotipo de cultivos de colza tras la inoculación con esta especie en un ensayo de campo.

Conclusiones



En base a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La biodiversidad bacteriana existente en los nódulos de *Phaseolus vulgaris* y en las raíces de *Brassica napus* es más alta de lo esperada, ya que se han aislado 20 y 36 especies distintas, respectivamente, y algunas de ellas no han sido descritas previamente en la bibliografía científica como endófitas de nódulos de alubia o raíces de colza. Además, varias pueden constituir nuevas especies. Por tanto, estos nichos manifiestan una potencial fuente de aislamiento de nuevas especies bacterianas como demuestra la descripción de *Microvirga brassicacearum*.
2. La cepa *R. laguerreae* PEPV40 se erige como un excelente candidato para diseñar un eficiente biofertilizante bacteriano dirigido a los cultivos de espinaca y escarola.
3. La cepa *B. halotolerans* SCCPVE07 es una candidata adecuada para ser aplicada como biofertilizante para cultivos de cilantro, debido a su potencial para colonizar las raíces, promocionar el desarrollo vegetal y mejorar la calidad nutricional del cultivo, tanto en condiciones ordinarias como de estrés salino.
4. La cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 ha demostrado un potencial biotecnológico positivo interaccionando con plantas de colza, por lo que puede erigirse como un prometedor biofertilizante para este cultivo.
5. El análisis del genoma de las cepas *R. laguerreae* PEPV40, *B. halotolerans* SCCPVE07 y *P. brassicacearum* CDVBN10 mostró la existencia de maquinaria genética potencialmente implicada en la promoción del crecimiento vegetal de las plantas, probándose subsecuentemente la capacidad de estas tres cepas para promocionar diversos cultivos, lo cual pone de manifiesto la utilidad de la secuenciación y análisis de genomas para la selección de cepas con potencial biotecnológico para el diseño de biofertilizantes.
6. La putrescina bacteriana sintetizada por *P. brassicacearum* CDVBN10 cumple un papel esencial en la interacción de la bacteria con las plantas de colza, induciendo la promoción del crecimiento de la planta y la resistencia a estrés salino.



**This summary contains the most significant results obtained from the study.*

1. Introduction

Nowadays, the search for microorganisms capable to improve soil fertility and enhance plant nutrition and development is one of the research priorities according to new green policies. This is due to the negative environmental impacts from the massive use of fertilizers, which are currently essential components of modern agriculture system (Adesemoye et al., 2009; Singh et al., 2015).

One potential way to decrease the negative impacts resulting from continued use of chemical fertilizers is the inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). These bacteria exert beneficial effects on plant growth and development by direct and indirect mechanisms (García-Fraile et al., 2017). However, bacterial endophytes are defined as one kind of PGPR which live and colonize the internal plant tissues (Celador-Lera et al., 2018). In this sense, endophytes may have a relevant advantage, living within a plant's tissues represents an opportunity to always be in contact with the plant's cells and therefore, to more readily wield a direct beneficial effect (Santoyo et al., 2016).

2. Objective

In this sense, the general objective of this study is the evaluation and characterization of endophytic microorganisms of two crops of agronomic interest, *Phaseolus vulgaris* and *Brassica napus*, analysing the potential of isolated strains to promote plant growth and improve the nutritional content of various crops with horticultural.

3. Results and discussion

Rhizobium is one of the most studied bacterial genera due to its capacity to fix nitrogen in symbiosis with legume plants. But moreover, bacteria belonging to this genus are one of the best options for biofertilizer designs since they lack human health and environmental safety threats. Besides, in the last decades its role as PGPR in non-legume plants has been also widely reported (Flores-Félix et al., 2018; García-Fraile et al., 2012; Jiménez-Gómez et al., 2016).

Apart from *Rhizobium*, in the last decades other bacterial genera have been described as efficient PGPR and endophytic strains, such as *Pseudomonas*, *Azotobacter* or *Bacillus*, not only for legume plants but also for other crops important and economically interesting (Govindasamy et al., 2010; Lally et al., 2017; Lavakush et al., 2014).

In this sense, in this study we selected *Phaseolus vulgaris* plants as a potential *Rhizobium* strains niche and *Brassica napus* plants due to its agri-food and bioenergetic

importance in Castile and Leon (Martínez-Romero, 2003; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2017).

Firstly, we have performed a metagenomic analysis of *Phaseolus vulgaris* nodules and, on the other hand, a metagenomic analysis of *Brassica napus* roots in order to obtain information about the general bacterial diversity and its potential interest.

According to the diversity of genera in nodule samples, more than two thirds are represented by the rhizobial genera *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* and *Rhizobium*, followed by *Methylothera*, *Streptomyces* and *Sphingomonas*. The amplicon sequencing of rapeseed samples showed that *Pseudomonas* is the most abundant genus, followed by *Rhizobium*, *Bacillus* and *Flavobacterium*.

In order to isolate the potential strains, a culturomic study was the next step. We isolated 85 bacterial strains from surfaced-sterilized nodules and 112 bacterial strains from surfaced-sterilized rapeseed plant roots. In order to classify the bacterial biodiversity obtained, we divided the isolates in 125 different 879F-RAPD groups. The rRNA 16S sequence of one from each group was amplified, sequenced and compared with the sequences deposited in public databases.

In the first case, the 55 % of isolates belonged to the phylum proteobacteria (*Rhizobium*, 9 different species) and the 45 % to the phylum Firmicutes (*Bacillus*, *Domibacillus* and *Paenibacillus*, 11 different species). We found that at least 20 different bacterial species cohabit in *P. vulgaris* nodules, although the majority belonged to genus *Rhizobium*. This result is appropriate based on the isolation pattern selected and the culture media used for the process. These data are consistent with other published studies which also analyse the bacterial diversity inside bean nodules (Díaz-Alcántara et al., 2014; Mwenda et al., 2018).

On the other hand, the isolates from *B. napus* roots belonged to the phyla, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. *Pseudomonas* was again the genus with highest representation among isolates. Strains from the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Acidovorax*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Devosia* and *Flavobacterium* had already been identified as rapeseed endophytes (Croes et al., 2013; Germida et al., 1998; Granér et al., 2003). However, to the best of our knowledge, this is the first report of the association of bacteria from genera *Neorhizobium*, *Microvirga*, *Herbaspirillum*, *Dermacoccus*, *Nocardioides*, *Isoptericola*, *Pseudoarthrobacter*, *Clavibacter* and *Shigella* with *B. napus* roots.

Several PGP *in vitro* mechanisms were evaluated according to the main objective of the present study. We tested the capability of our isolates to produce siderophores; this trait has been described as an efficient mechanism to inhibit the growth of other bacteria or fungi, by depriving them of iron or to protect from the action of antibiotics

secreted by other competing microorganisms (Berendsen et al., 2012; Wencewicz et al., 2013; Wencewicz and Miller, 2013), giving to the siderophore producing strains a competitive advantage over other microbial strains when applied as soil biofertilizers. Phosphate solubilization has been also analysed due to the importance of this element in plant nutrition and the problems caused by its deficit (Anand et al., 2016). Finally, we tested the capability of the isolates to synthesize cellulose, according to its described effects on root colonization and biofilm formation over the root surface (Mateos et al., 1992; Ude et al., 2006), which gives the biofertilizers an enhanced probability to colonize the crops.

As results of these analyses, we found that 38.6 % of isolates produce siderophores, but the biggest halos were produced by strains belonging to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Rhizobium*. The 66.5 % of isolates showed a positive and significant phosphate solubilization capability, being most of these phosphate solubilizing bacteria classified within the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*. The production of cellulose was positive in 77.2 % of the strains, in this case most producers belong to the genera *Rhizobium* and *Bacillus*.

The interaction between plant and microbes is also influenced by the production of bacterial enzymes involved in the lysis and degradation of plant cell wall components such as cellulose, pectin and xylan since plant cell wall is formed by these kind of polymers (de Vasconcellos & Cardoso, 2009; Jung et al., 2007; Reetha et al., 2014). Therefore, the production of cellulases, pectinases and xylanases were analysed.

The best cellulases production was found in *Bacillus* and *Rhizobium* species, although a total of 65 % and 68 % of the isolates from nodules and roots presented a clear production of these enzymes, respectively. Conversely, *Pseudomonas* strains showed the highest pectinase and xylanases production capability, but overall the positive percentage in these two evaluations were similar or lower, 60 % and 46 % in pectinase production and 70 % and 38 % in xylanases production.

According to the results obtained in *in vitro* analysis of PGP traits, four strains belonging to the genera *Pseudomonas* (1), *Bacillus* (1) and *Rhizobium* (2) were selected to sequence and mine their genomes, with the objective of finding different genes related to a positive bacterial - plant interaction. In general, the genomes showed not only plant growth promoting mechanisms, but also genetic machinery to produce secondary metabolites and to synthesize hydrolytic enzymes such as quercetin 2,3-dioxygenase, phenolic acid decarboxylase and alcohol dehydrogenase GbsB, essential for the utilization of choline and choline ABC transport system. Among the secondary metabolites, the genomes of these four strains encode genes related to the biosynthesis of osmolytes and phenolics compounds, both described as important substances in protecting plants against saline stress (Mandal et al., 2010).

Finally, the strains *Bacillus halotolerans* SCCPVE07, *Rhizobium laguerreae* PEPV40 and *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10 were selected to deep in the study of their capability to promote plant growth and be potentially included in biofertilizer designs.

Based on the reported benefits of *Rhizobium* strains on different horticultural crops related to their plant development and nutritional content, the interaction between the strain *R. laguerreae* PEPV40 and spinach crops was evaluated. Spinach is one of the vegetables included in the Mediterranean diet, stands out for its nutritional value, as it contains vitamins, amino acids, and minerals (Yoon et al., 2017). Although the effect on the growth of spinach after being inoculated with some strains of *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Pseudomonas* has been previously analysed, no data are available on the effects of *Rhizobium* strains on its growth and quality (Çakmakçı et al., 2007). Thus, in this study we analysed the plant growth promoting potential of *Rhizobium laguerreae* PEPV40 in spinach plants.

It was observed by fluorescence microscopy that GFP-tagged PEPV40 attached to the root surfaces of spinach seedlings inoculated with the strain increased over time, revealing the typical microcolonies of biofilm initiation. In addition, in a growth chamber experiment significant increases were observed in both the shoot and root length of spinach seedlings after 3 days of inoculation with *R. laguerreae* PEPV40. Moreover, this increase in length continued to reach over 90 % on day 5 and over 20 % on day 7.

Under greenhouse conditions, the results of the analysis of these vegetative parameters showed that plants inoculated with *R. laguerreae* PEPV40 had a significantly higher number of leaves, as well as a larger leaf size and dry and fresh shoot weights than those of the non-inoculated control (figure 64). Furthermore, inoculated plants had also significantly higher chlorophyll, nitrogen and caffeic acid contents. These results confirm the presence of positives effects on spinach plants at the early stages of development after being inoculated with *R. laguerreae* PEPV40, suggesting that this strain may have probiotic potential (Jiménez-Gómez et al., 2018).

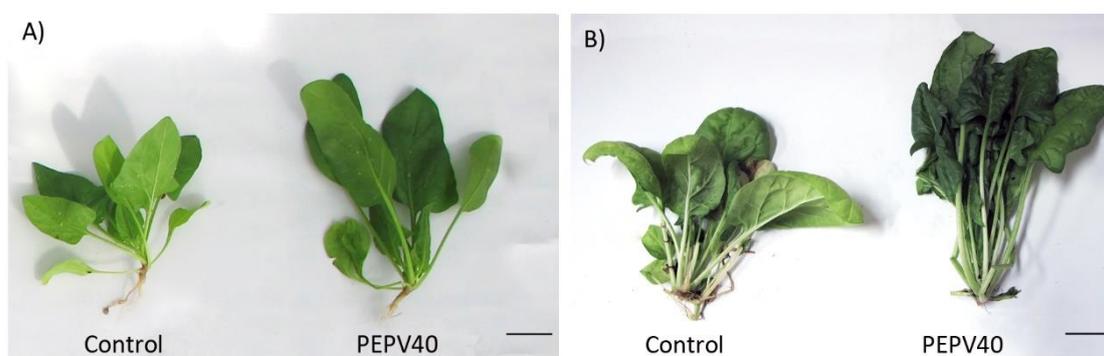


Figure 64: Spinach growth promotion in greenhouse experiments. (A) Baby spinach. (B) Adult spinach. Bar 270 mm. Modified from Jiménez-Gómez et al., 2018.

On the other hand, one of the major problems for agriculture over the world is soil salinity; every year about 1-2 % of farming soils in the arid and semi-arid zones turns to useless agricultural land because of salts accumulation (Rasool et al., 2013). Salinity limits growth and plant development causing serious biochemical and physiological damages in crops (Etesami and Beattie, 2018). Two of the most sensitive crops to soil salinity are coriander and escarole.

Coriander (*Coriandrum sativum* L.) is currently one of the most economically important aromatic crops (Pacheco et al., 2016). Apart from its uses in folk medicine, pharmacy and food industries, coriander is an herb used throughout the world as spice (Silva and Domingues, 2017). The presence of phenolics compounds in coriander plant are associated to a significant antioxidant activity. In addition to food preservation, the importance of the antioxidant content and its beneficial effect on many chronic diseases have been investigated in many scientific studies according to the essential oil content (Kamali et al., 2018).

Escarole (*Cichorium endivia*) is a horticultural crop widely demanded in recent years due to its high-water content (94 %). Its high content of vitamins and minerals, and its low caloric value make this vegetable frequently consumed (Papetti et al., 2008). In addition, it is worth highlighting the high content of phenolics compounds in this plant (Llorach et al., 2008).

For all this, one of the aims of this study was to analyse the effects of the three selected bacterial strains on the plant growth development in coriander and escarole under normal and saline conditions. Moreover, we also studied the effect of the inoculations on the phenolic composition and mineral content of these plants.

First, bacterial colonization was evaluated with a root immunolocalization experiment in the case of *B. halotolerans* SCCPVE07 strain and with fluorescence microscopy in the case of *R. laguerreae* PEPV40 and *P. brassicacearum* CDVBN10 strains, using GFP tagged transconjugants. Generally, it was observed an effective colonization with strains attached to the root surfaces of both coriander and escarole seedlings inoculated, this colonization increased gradually over time. This experiment revealed that the three strains colonize the root surfaces, occupying intercellular spaces in cortical cells and the base of lateral roots emergences and form typical microcolonies of biofilm initiation.

The following step was to evaluate the plant growth promotion in the early stages of plant development, under both normal and salinity stress conditions. In coriander plants grown under normal conditions, an increase in the length of the aerial part was observed in plants inoculated with the three strains. However, the best values were observed with strains *P. brassicacearum* CDVBN10 and *B. halotolerans* SCCPVE07, which showed an increase in the length of the aerial part of the inoculated plants

of 14 % and 21 %, respectively, compared to control plants. Under saline conditions the results were similar, the best values in the length of the aerial part were obtained after the inoculation with *R. laguerreae* PEPV40 and *B. halotolerans* SCCPVE07, by 18 % and 17 %, respectively.

Under normal conditions the escarole plants inoculated with the strain *P. brassicacearum* CDVBN10 showed statistically significant higher values than the control plants (20 % in aerial part length and 14 % in dry weight of the aerial part in comparison with the control treatment). On the other hand, under salinity conditions the highest values and statistically significant were obtained with the strains *R. laguerreae* PEPV40 and *B. halotolerans* SCCPVE07 in wet (11 % and 25 %, respectively) and dry (13 % in both cases) aerial part weights.

Due to the interesting previous results, an experiment under greenhouse conditions was carried out. This study showed that the bacterial inoculants promote the growth of coriander and escarole plants, as inoculations led to an increase in several plant growth parameters (In coriander plants: chlorophyll content and length, wet and dry aerial part weights; in escarole plants: leaf numbers and wet and dry aerial part weights). Coriander plants inoculated with the strain *P. brassicacearum* CDVBN10 were those which presented statistically significant values under normal conditions, enhancing the dry weight yield of the aerial part up to 17 % in comparison with the control treatment. However, the best chlorophyll content was obtained in the plants inoculated with the strain *R. laguerreae* PEPV40. Under conditions of saline stress, the best values were obtained in the plants inoculated with the strain *B. halotolerans* SCCPVE07, reaching to improve the yield in the dry weight of the aerial part up to 25 % and the chlorophyll content by 34 %, both data regarding the control.

In the case of escarole plants, the treatment with the strain PEPV40 presented the best values under normal conditions. The dry weight of the aerial part was improved by 18 % and the number of leaves by 14 %. Under saline stress conditions the best values were as follows: the number of leaves was improved by 16 % in the plants inoculated with the strain *P. brassicacearum* CDVBN10 and the wet weight and dry weight of the aerial part increased up to 76 % in the inoculated plants with strain *B. halotolerans* SCCPVE07.

Next, we evaluated the nutritional plant content. In a general way, the inoculations enhanced statistically significant potassium, carbon, nitrogen, phosphorus, iron and magnesium not only in normal conditions but also under salinity stress. Besides, significant improvements in phenolic compounds contents were also observed (tables 1 and 2). Among phenolic compounds, flavonoids and phenolic acids have been related to a decreased risk in many chronic diseases (Flores-Félix et al., 2018).

Table 70: Phenolic acids of coriander plants in greenhouse conditions. Data from plants irrigated with water (C.N) and saline solution - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl) are shown.

	Vanillic acid (mg/g)		5-O-caffeoyl quinic acid (mg/g)		Cinnamic acid (mg/g)		Ferulic acid (mg/g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	14.31 ± 0.27 a	14.55 ± 0.27 a	3.00 ± 0.05 a	5.52 ± 0.03 a	0.61 ± 0.02 a	0.75 ± 0.01 a	0.86 ± 0.03 a	0.73 ± 0.03 a
PEPV40	16.62 ± 0.06 b	18.59 ± 0.31 b	2.35 ± 0.09 b	5.96 ± 0.01 b	0.57 ± 0.03 a	0.72 ± 0.01 a	0.87 ± 0.01 a	0.76 ± 0.02 a,b
CDVBN10	17.37 ± 0.08 c	14.76 ± 0.47 a	4.53 ± 0.02 c	3.37 ± 0.08 c	0.39 ± 0.01 b	0.68 ± 0.05 a	0.68 ± 0.02 b	0.80 ± 0.02 b
SCCPVE07	6.01 ± 0.01 d	12.90 ± 0.11 c	3.69 ± 0.03 d	10.23 ± 0.03 d	0.48 ± 0.01 c	0.91 ± 0.01 b	0.62 ± 0.02 b	0.77 ± 0.02 a,b

The values represent the mean ± the standard error.

Values followed with the same letter indicate that the values are not statistically significant, P = 0.05 based on Fisher's Protected LSD (Least significant differences).

Table 71: Phenolic acids of escarole plants in greenhouse conditions. Data from plants irrigated with water (C.N) and saline solution - 100 mM NaCl (S.S. - 100 mM NaCl) are shown.

	Caffeic acid (mg/g)		Protocatechuic acid (mg/g)		Tartaric acid (mg/g)		Cichoric acid (mg/g)	
	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl	C.N	S.S. - 100 mM NaCl
Control	0.64 ± 0.01 a	0.48 ± 0.01 a	8.39 ± 0.04 a	3.76 ± 0.14 a	6.10 ± 0.02 a	4.91 ± 0.15 a	37.05 ± 0.09 a	24.56 ± 0.78 a
PEPV40	0.53 ± 0.02 b	0.67 ± 0.01 b	13.29 ± 0.04 b	6.42 ± 0.04 b	4.52 ± 0.01 b	6.44 ± 0.04 b	24.83 ± 0.13 b	34.51 ± 0.02 b
CDVBN10	0.60 ± 0.01 c	0.58 ± 0.01 c	4.29 ± 0.06 c	13.09 ± 0.01 c	6.25 ± 0.03 a	5.15 ± 0.03 c	35.39 ± 0.07 c	30.71 ± 0.16 c
SCCPVE07	0.58 ± 0.01 c	0.44 ± 0.01 d	14.04 ± 0.08 d	3.11 ± 0.04 d	5.85 ± 0.04 c	3.94 ± 0.01 d	25.76 ± 0.05 d	23.38 ± 0.04 d

The values represent the mean ± the standard error.

Values followed with the same letter indicate that the values are not statistically significant, P = 0.05 based on Fisher's Protected LSD (Least significant differences).

The contents of 5-O-caffeoylquinic acid, cinnamic acid, vanillic acid, ferulic acid, Q-3-O-rutinoside, Q-3-O-glucoside and Q-3-O-glucuronide were significantly enhanced in coriander plants, and the contents of caffeic acid, tartaric acid, chicoric acid, luteolin-glucoside, luteolin-glucuronide and a derivate of luteolin-glucuronide were significantly enhanced in escarole plants.

According to the genome mining, these results suggest that these bacterial strains can influence the plant nutritional components through the production of enzymes involved in their biosynthetic pathways of those compounds. Therefore, the microbial modification of plant phenolic compounds is an important aspect in the establishment of an effective plant-microbe interaction.

Finally, an objective of this thesis was to build on existing knowledge in PGP bacterial-plant interactions under salinity stress. Thus, and after the analysis of the genome sequence of strain CDVBN10 and a deep revision of the available literature, we focused on polyamines. Plant polyamines are acknowledged regulators of plant growth, development and stress responses, they can act as reactive oxygen species (ROS) scavengers and activators of key antioxidant enzymes (Pottosin and Shabala, 2014). Strain CDVBN10 has also a metabolic route to synthesize polyamines.

One of the genes involved in the biosynthesis of polyamines is that encoding the n-carbamoyl putrescine amidase (*cpa* gene). This *cpa* gene is specifically involved in putrescine biosynthesis (Sekula et al., 2016) and all the other polyamines synthesized by *P. brassicacearum* CDVBN10 derive from the synthesis of putrescine. Therefore, we hypothesised that the interruption of this gene could have some effect in the capability of *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neurantiaca* CDVBN10 to promote the resistance of the plants to stress salinity.

Thus, *cpa* gene was deleted in this strain by CRISPR/Cas9 genome editing, following the methodology previously described for *Pseudomonas* strains (Sun et al., 2018), to obtain the knock-out (KO) CDVBN10 Δ *cpa* strain. Subsequently, we evaluated the effect of this mutation in the interaction of the bacterium with rapeseed plants.

We found no differences between the WT and the KO strains in bacterial adhesion and cohesion, nor root colonization (figure 65). However, biofilm productions were different between strains at 16 hours post inoculation, the biofilm produced by KO strain was significantly higher than the produced by WT. Nevertheless, similar values were achieved at 24 hours.

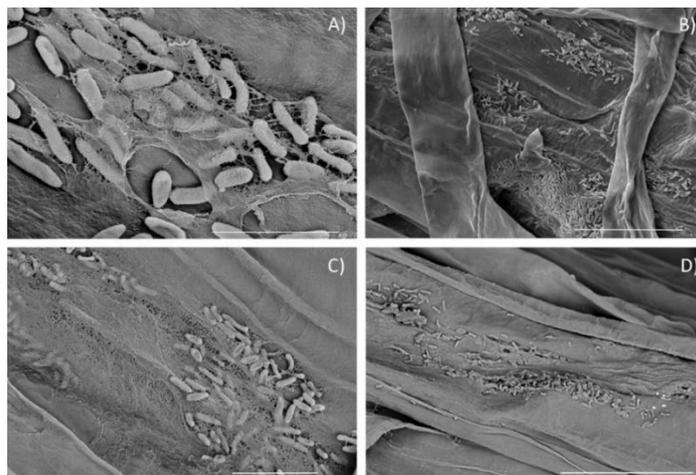


Figure 65: Electron microscopy photographs of rape roots at 7 dpi showing bacterial colonization and biofilm formation by strains CDVBN10 (A and B) and CDVBN10 Δ cpa (C and D). Bar A) corresponds to 3 μ m, C) to 5 μ m and B) and D) to 20 μ m.

In relation with rapeseed plants promotion, the experiments carried out showed how the reduction in putrescine production (KO strain) also reduces the phenotype *Rat* (Redirections at the tip) in root hairs, in comparison with wild type WT. However, the phenotype is recovered when exogenous putrescine is added, with a higher number of redirections when higher amount of putrescine is put into the system (figure 66).

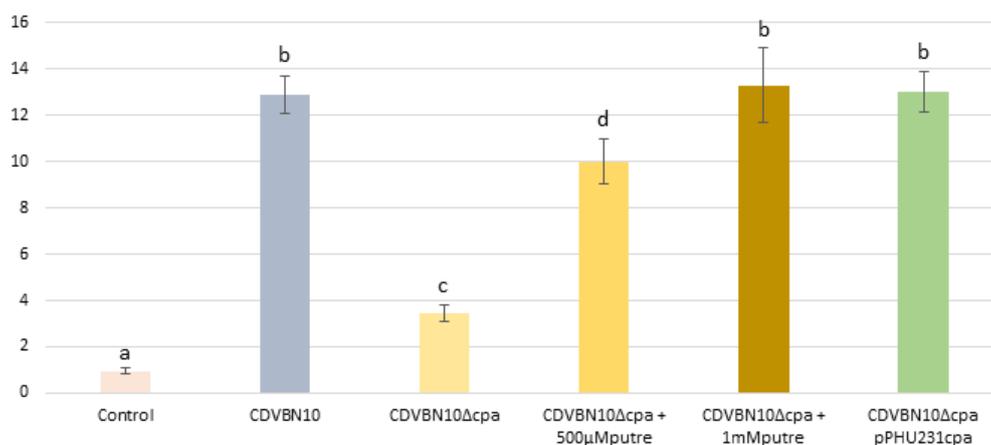


Figure 66: Phenotypes displayed by *B. napus* roots hairs after inoculation with CDVBN10, CDVBN10 Δ cpa, CDVBN10 Δ cpa + 500 μ M of exogenous putrescine, CDVBN10 Δ cpa + 1mM of exogenous putrescine and CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa. Error bars with the same letter indicate that the values are not statistically significant, $p = 0.05$ based on Fisher's Protectec LSD (Least significant differences).

The following step was to evaluate the plant growth promotion in the early stages of plant development. The inoculation with the *P. brassicacearum* CDVBN10 WT strain showed a significantly higher plant development with respect to the control treatment, both in length and dry weight of the aerial part. On the other hand, the inoculation with the KO strain CDVBN10 Δ cpa presented similar values to the control

treatment and, therefore, lower than those obtained in the treatment with the WT strain.

The complementation with the plasmid pPHU231 was designed in order to check that the phenotype observed is due to the reduction in putrescine production. The methodology described by Paço et al., (2016) was followed and the CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa was obtained.

The treatment with the CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa complemented strain again showed similar values to the CDVBN10 wild type strain.

Under salinity and greenhouse conditions, the results showed that the inoculation with the strains CDVBN10 and CDVBN10 Δ cpa-pPHU231cpa increase the wet and dry weight values of the aerial part, both in normal conditions and in salinity conditions. However, the values obtained after inoculation with the KO mutant CDVBN10 Δ cpa are like those of the control treatment in both growth conditions.

Although putrescine exogenous addition had been previously evaluated in other kind of crops (Garg and Sharma, 2019; Naser et al., 2016), this is the first study where the effects of a reduction in bacterial putrescine productions on rapeseed crops are evaluated.

Finally based on the rapeseed growth promotion from WT strain a field trial was carried out. The number of pods increased by 216 % compared to the control, and the increases in seed and aerial part dry weights reached of 174 % and 198 %. This study is the first time that the effects of *P. brassicacearum* subsp. *neurantiaca* are evaluated in a field trial of rapeseed crops.

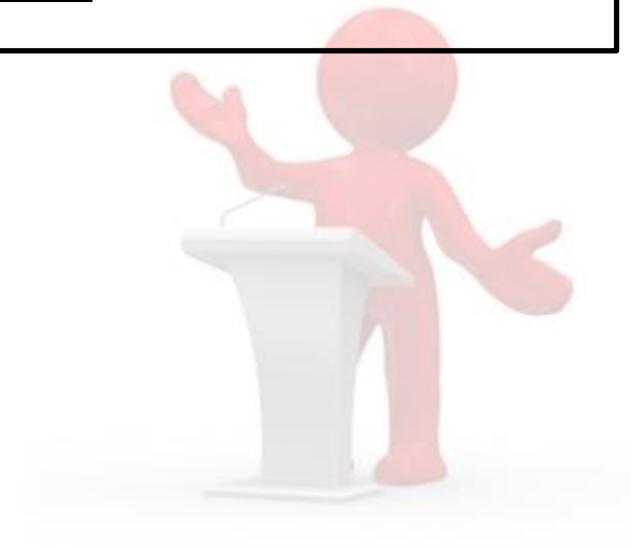
4. Conclusions

From the results of this thesis, it can be concluded that *Phaseolus vulgaris* nodules and *Brassica napus* roots have a high bacterial biodiversity, with bacteria belonging to 30 genera and 56 different species, some of them new species, which have not been previously described in the scientific literature as endophytes of bean nodules or rapeseed roots.

Besides the strains SCCPVE07, PEPV40 and CDVBN10 are excellent candidates to add as biofertilizers in coriander, spinach and rapeseed, respectively, due to their potential to colonize the roots, promote plant development and improve the nutritional quality of crops.

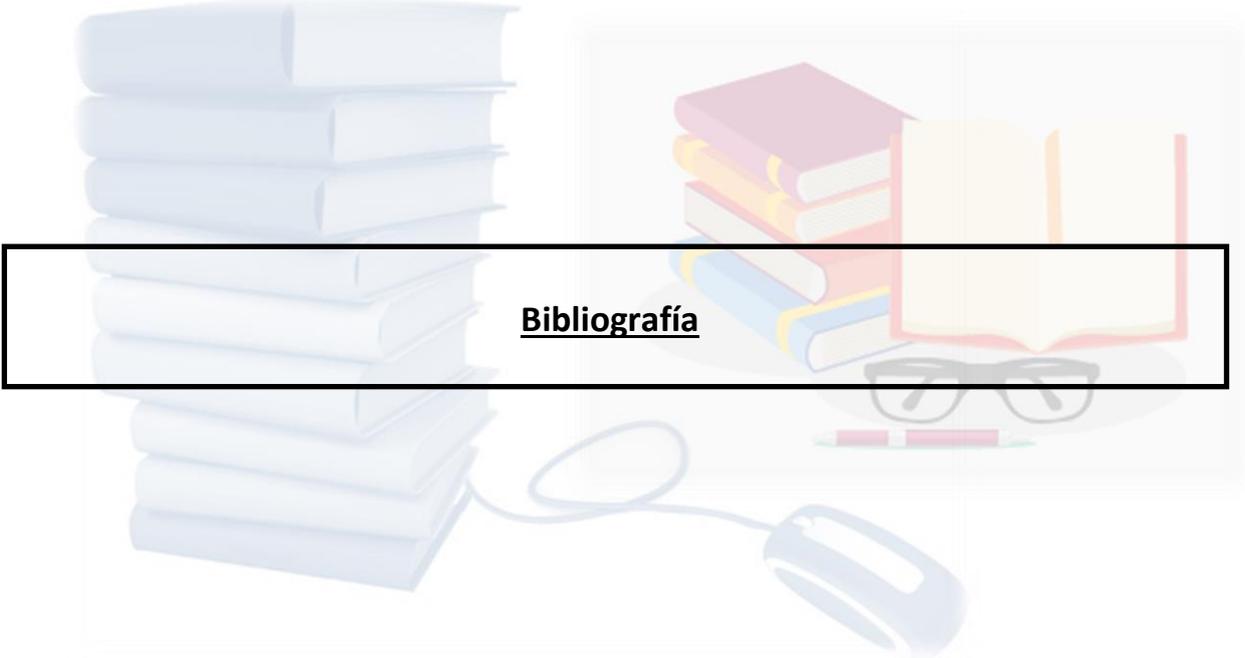
Moreover, it has been shown that bacterial putrescine influences the bacterial-plant interaction and determines the promotion of plant development of rapeseed crops. Putrescine is also a key enzyme in reducing the effects produced in saline stress conditions.

Conclusions



According to the results obtained in this work, the following conclusions can be established:

1. The bacterial biodiversity existing in *Phaseolus vulgaris* nodules and *Brassica napus* roots is higher than expected, since 20 and 36 different species have been isolated, respectively, and some of them have not been previously described in the literature scientific as endophytes of bean nodules or rapeseed roots. In addition, several are candidate to constitute new species. Therefore, both niches manifest a potential source of isolation of new bacterial species as demonstrated by the description of *Microvirga brassicacearum*.
2. The *R. laguerreae* PEPV40 strain is an excellent candidate to design an efficient bacterial biofertilizer suitable for spinach and escarole crops.
3. The strain *B. halotolerans* SCCPVE07 is a suitable candidate to be applied as biofertilizer for coriander crops, due to its potential to colonize the roots, promote plant development and improve the nutritional quality of the crop, both in normal and salinity stress conditions.
4. The strain *P. brassicacearum* CDVBN10 has demonstrated a positive biotechnological potential interacting with rapeseed plants, so it can be established as a promising biofertilizer for this crop.
5. The genome analysis of *R. laguerreae* PEPV40, *B. halotolerans* SCCPVE07 and *P. brassicacearum* CDVBN10 strains showed the genetic potential involved in plant growth promotion, subsequently testing the capacity of these three strains to promote various crops, which shows the usefulness of genome sequencing and analysis for bacterial selection with biotechnological potential for biofertilizers design.
6. Bacterial putrescine synthesized by *P. brassicacearum* CDVBN10 plays an essential role in the interaction bacterium - rapeseed plants, inducing the plant growth promotion and salinity stress resistance.



Bibliografía

- Abel, K., Deschmertzing, H., & Peterson, J. I. (1963). Classification of microorganisms by analysis of chemical composition I.: Feasibility of Utilizing Gas Chromatography. *Journal of Bacteriology*, 85(5), 1039-1044.
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., & Heulin, T. (2004). Phenotypic Variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a Plant Root-Colonization Strategy. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 17).
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., Kloepper, J. W. (2009). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial ecology*, 58(4), 921-929.
- Afzal, A. & Bano, A. (2008). Rhizobium and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). *Int J Agric Biol*, 10(1), 85-88.
- Agladze, K., Wang, X., & Romeo, T. (2005). Spatial Periodicity of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Microstructure Initiates during a Reversible, Polar Attachment Phase of Development and Requires the Polysaccharide Adhesin PGA Downloaded from. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 187(24), 8237–8246.
- Aguilar, N., Garcia, B., Cunningham, M., & David, S. (2016). Synthesis of a Parkinson's Disease Treatment Drug, the R , R -Tartrate Salt of R -Rasagiline: A Three Week Introductory Organic Chemistry Lab Sequence. *Journal of Chemical Education*, 93(5), 937–940.
- Ahmad Ansari, F., Ahmad, I., Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2018). Biofilm Development, Plant Growth Promoting Traits and Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: A Promising PGPR. *Advances in Microbiology*, 8, 235–251.
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Nazli, F., Akram, F., Arshad, M., & Khalid, M. (2013). Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1341–1348.
- 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.
- Ali, B., Sabri, A. N., & Hasnain, S. (2010). Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Ali, M., Ali, S., & Ishrat, R. (2018). In silico biochemical pathways for bacterial metabolite synthesis. In *In Silico Approach for Sustainable Agriculture* (pp. 239–250).
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., & Duchiron, F. (2011, August). Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, Vol. 46, pp. 1525–1537.
- Alrasbi, S., Hussain, N., & Schmeisky, H. (2010). Evaluation of the growth of date palm seedling irrigated with saline water in the Sultanate of Oman In *Proceeding of the Fourth International Date Palm*. 882, 233-246.
- Al-Waily, D. S., & Hassan, S. M. (2019). Effect of Two Bioformulation *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* with Manure in Controlling *Fusarium* wilt Disease in Pumpkin. In *Pure and Applied Sciences*. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 27(1), 446-456.
- Amarger, N., Macheret, V., & Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 996–1006.
- Amin, F., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 122, pp. 1017–1026.

- Aminun Naher, U., Othman, R., Shamsuddin, Z. H., Mohd Saud, H., & Razi Ismail, M. (2009). Growth Enhancement and Root Colonization of Rice Seedlings by Rhizobium and Corynebacterium spp. *Int. J. Agric. Biol*, 11, 586–590.
- An, Y. Q., Sun, L., Wang, X. J., Sun, R., Cheng, Z. Y., Zhu, Z. K., Bai, J. G. (2019). Vanillic Acid Mitigates Dehydration Stress Responses in Blueberry Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(5), 806–817.
- Anand, K., Kumari, B., & Mallick, M. A. (2016). Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. *J Pharm Pharm Sci*, 8, 37-40.
- Anandaraj, M., & Bini, Y. K. (2011). Potential of PGPR application for seed spices with special reference to coriander and fenugreek in India. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. Proceedings of the 2nd Asian PGPR Conference, Beijing, China.*
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., Vargas, L. K. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*.
- Asghari, B., Khademian, R., & Sedaghati, B. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition. *Scientia Horticulturae*, 263.
- Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. T., & Sandberg, G. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175(4), 532–538.
- Augimeri, R. V., Varley, A. J., & Strap, J. L. (2015). Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: Lessons learned from diverse biofilm-producing Proteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6.
- Badieyan, S., Bevan, D. R., & Zhang, C. (2012). Study and design of stability in GH5 cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1), 31–44.
- Bakare, M. K., Adewale, I. O., Ajayi, A., & Shonukan, O. O. (2005). Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 898–904.
- Bakker, E. P., Borchard, A., Michels, M., Altendorf, K., & Siebers, A. (1987). High-affinity potassium uptake system in *Bacillus acidocaldarius* showing immunological cross-reactivity with the Kdp system from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 4342–4348.
- Baltes, N. J., Hummel, A. W., Konecna, E., Cegan, R., Bruns, A. N., Bisaro, D. M., & Voytas, D. F. (2015). Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants*, 1(10).
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K., & Gannon, F. (1991). The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *Genome Research*, 1(1), 51-56.
- Béguin, P., & Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews*, 13(1), 25-58.
- Belbahri, L., Chenari Bouket, A., Rekik, I., Alenezi, F. N., Vallat, A., Luptakova, L., Rateb, M. E. (2017). Comparative Genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains Reveals a Core Genome with Traits for Habitat Adaptation and a Secondary Metabolites Rich Accessory Genome. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1438.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*.

- Bernabeu, P. R., Pistorio, M., Torres-Tejerizo, G., Estrada-De los Santos, P., Galar, M. L., Boiardi, J. L., & Luna, M. F. (2015). Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, 191, 113-120.
- Berners-Lee, M., Kennelly, C., Watson, R., & Hewitt, C. N. (2018). Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. *Elem Sci Anth*, 6(1), 52.
- Bhat, S. A., Singh, J., & Vig, A. P. (2018, July 1). Earthworms as Organic Waste Managers and Biofertilizer Producers. *Waste and Biomass Valorization*, Vol. 9, pp. 1073–1086.
- Bhattacharjee, R. B., Jourand, P., Chaintreuil, C., Dreyfus, B., Singh, A., & Mukhopadhyay, S. N. (2012). Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. *Biology and Fertility of Soils*.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bibikova, T., & Gilroy, S. (2002). Root hair development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 383-415.
- Birch, J., Van Calsteren, M. R., Pérez, S., & Svensson, B. (2019). The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 205, 565–570.
- Biswas, J. K., Banerjee, A., Rai, M., Naidu, R., Biswas, B., Vithanage, M., Meers, E. (2018). Potential application of selected metal resistant phosphate solubilizing bacteria isolated from the gut of earthworm (*Metaphire posthuma*) in plant growth promotion. *Geoderma*, 330, 117–124.
- Bloch, S. E., Ryu, M. H., Ozaydin, B., & Broglie, R. (2020). Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 62, pp. 181–188.
- Boğa, A., Binokay, S., & Sertdemir, Y. (2009). The toxicity and teratogenicity of gibberellic acid (GA 3) based on the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). *Turk J Biol*, 33, 181–188.
- Bollati, M., Villa, R., Gourlay, L. J., Benedet, M., Dehò, G., Polissi, A., Nardini, M. (2015). Crystal structure of LptH, the periplasmic component of the lipopolysaccharide transport machinery from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Journal*, 282(10), 1980–1997.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551–2561.
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta, A., Berta, G. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza*, 27(1).
- Borriss, R. (2017). Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: An update. In *Bacilli and Agrobiotechnology* (163–184).
- Böttcher, T., Kolodkin-Gal, I., Kolter, R., Losick, R., & Clardy, J. (2013). Synthesis and activity of biomimetic biofilm disruptors. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), 2927–2930.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229–1238.
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11621-11626.

- Bratkova, S., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Dimitrov, I., & Nikolova, K. (2012). Analysis of rhizospheric bacterial community in soils affected by the formation of calcrete. *Journal of Geochemical Exploration*.
- Braun, V., & Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, Vol. 529, pp. 78–85.
- Breedveld, M. W., Yoo, J. S., Reinhold, V. N., & Miller, K. J. (1994). Synthesis of glycerophosphorylated cyclic β -(1,2)-glucans by *Rhizobium meliloti* ndv mutants. *Journal of Bacteriology*, 176(4), 1047–1051.
- Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), 419–426.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807–838.
- Burland, V., Plunkett III, G., Daniels, D. L., & Blattner, F. R. (1993). DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. *Genomics*, 16(3), 551–561.
- Butaitė, E., Kramer, J., Wyder, S., & Kümmerli, R. (2018). Environmental determinants of pyoverdine production, exploitation and competition in natural *Pseudomonas* communities. *Environmental Microbiology*, 20(10), 3629–3642.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü., & Dönmez, M. F. (2007). The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.
- Çakmakçı, R., Turan, M., Kıtır, N., Güneş, A., Nikerel, E., Özdemir, S., Mokhtari, P. (2017). The Role of Soil Beneficial Bacteria in Wheat Production: A Review.
- Calugay, R. J., Takeyama, H., Mukoyama, D., Fukuda, Y., Suzuki, T., Kanoh, K., & Matsunaga, T. (2006). Catechol siderophore excretion by magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(5), 445–447.
- Cao, X., Xia, Y., Zeng, M., Wang, W., He, Y., & Liu, J. (2019). Caffeic Acid Inhibits the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Mitigates the AGEs-Induced Oxidative Stress and Inflammation Reaction in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Chemistry & Biodiversity*.
- Caputo, A., Lagier, J. C., Azza, S., Robert, C., Mouelhi, D., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2016). *Microvirga massiliensis* sp. nov., the human commensal with the largest genome. *MicrobiologyOpen*, 5(2), 307–322.
- Cardinale, M. (2014). Scanning a microhabitat: Plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation.
- Carro, L., Flores-Felix, J. D., Cerda-Castillo, E., Ramírez-Bahena, M. H., Igual, J. M., Tejedor, C., & Peix, A. (2013). *Paenibacillus endophyticus* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(12), 4433–4438.
- Carro, L., Nouioui, I., Sangal, V., Meier-Kolthoff, J. P., Trujillo, M. E., Montero-Calasanz, M. D. C., Goodfellow, M. (2018). Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Scientific Reports*, 8(1), 525.
- Celador-Lera, L., Jiménez-Gómez, A., Menéndez, E., & Rivas, R. (2018). Biofertilizers based on bacterial endophytes isolated from cereals: Potential solution to enhance these crops. In *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Stress Management and Agricultural Sustainability* (Vol. 1, pp. 175–203).
- Chai, Y. Y., Jiang, C. D., Shi, L., Shi, T. S., & Gu, W. B. (2010). Effects of exogenous spermine on sweet sorghum during germination under salinity. *Biologia Plantarum*, 54(1), 145–148.

- Chao, Y., Marks, L. R., Pettigrew, M. M., & Hakansson, A. P. (2014). *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4.
- Charlton, T., Shah, V., Lynch, T., Candreva, J., Chau, E., Yang, Y. X., Kim, J. R. (2018). Amyloid Aggregation of *Bacillus circulans* Xylanase under Native Conditions and its Modulation by β -Amyloid-Derived Peptide Fragments. *ChemBioChem*, 19(24), 2566–2574.
- Charpentier, E., & Doudna, J. A. (2013). Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature*, 495(7439), 50–51.
- Chauhan, P. S., Lata, C., Tiwari, S., Chauhan, A. S., Mishra, S. K., Agrawal, L., ... Nautiyal, C. S. (2019). Transcriptional alterations reveal *Bacillus amyloliquefaciens*-rice cooperation under salt stress. *Scientific Reports*, 9(1).
- Chen, C.J., Deng, A.J., Liu, C., Shi, R., Qin, H.-L., & Wang, A.P. (2011). molecules Hepatoprotective Activity of *Cichorium endivia* L. Extract and Its Chemical Constituents. *Molecules*, 16, 9049–9066.
- Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Computational Biology*, Vol. 1, pp. 0106–0112.
- Chen, L., He, L. yan, Wang, Q., & Sheng, X. fang. (2016). Synergistic effects of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and immobilizers on the growth and heavy metal accumulation of edible tissues of hot pepper. *Journal of Hazardous Materials*, 312, 123–131.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., . & Junge, H. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature biotechnology*, 25(9), 1007.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33–41.
- Cheng, H. P., & Walker, G. C. (1998). 1998-Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads. *J Bacteriol*, 180, 5183–5191.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., & Boudabous, A. (2016). Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1087–1097.
- Chhabra, R. (2017). *Soil salinity and water quality*. Routledge.
- Choudhary, D. K., Kasotia, A., Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Sharma, K. P., & Varma, A. (2016). Bacterial-Mediated Tolerance and Resistance to Plants Under Abiotic and Biotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 35, pp. 276–300.
- Chu, B. C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., Vogel, H. J. (2010). Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 23(4), 601–611.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Clément, C., Barka, E. A., & Nowak, J. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1685–1693.
- Compant, S., van der Heijden, M. G. A., & Sessitsch, A. (2010). Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), 197–214.
- Cong, L., & Zhang, F. (2014). Genome engineering using crispr-cas9 system. In *Chromosomal Mutagenesis: Second Edition* (pp. 197–217).

- Conway, G. R., & Barbie, E. B. (1988). After the green revolution: sustainable and equitable agricultural development. *Futures*, 20(6), 651-670.
- Cornelis, P. (2010, May). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 86, pp. 1637–1645.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnourne, M., Zimmermann, S., Véry, A. A., Fizames, C., & Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(15), 2511-2532.
- Cosgrove, D. J. (2000). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 109-124.
- Costa, L. E. de O., de Queiroz, M. V., Chaer Borges, A., de Moraes, C. A., & de Araújo, E. F. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1562–1575.
- Craig Venter, J., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
- Croes, S., Weyens, N., Janssen, J., Vercampt, H., Colpaert, J. V., Carleer, R., & Vangronsveld, J. (2013). Bacterial communities associated with *Brassica napus* L. grown on trace element-contaminated and non-contaminated fields: A genotypic and phenotypic comparison. *Microbial Biotechnology*, 6(4), 371–384.
- Crovadore, J., Calmin, G., Chablais, R., Cochard, B., Schulz, T., Lefort, F., Switzerland, G. (2016). Whole-Genome Sequence of *Bradyrhizobium elkanii* Strain UASWS1016, a Potential Symbiotic Biofertilizer for Agriculture.
- Crozier, A., Arruda, P., Jasmim, J. M., Monteiro, A. M., & Sandberg, G. (1988). Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Cruz-González, X., Laza-Pérez, N., F. Mateos, P., & Rivas, R. (2017). Analysis and effect of the use of biofertilizers on *Trifolium rubens* L., a preferential attention species in Castile and Leon, Spain, with the aim of increasing the plants conservation status. *AIMS Microbiology*, 3(4), 733–746.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., & Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological Reviews*, Vol. 50, pp. 314–352.
- da Silva Sa, F. V., Souto, L. S., de Paiva, E. P., Neto, M. F., da Silva, R. A., do Nascimento Silva, M. K., & Neto, A. A. (2016). Tolerance of coriander cultivars under saline stress. *African Journal of Agricultural Research*, 11(39), 3728-3732.
- Dąbrowska, G., Hryniewicz, K., Trejgell, A., & Baum, C. (2017). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the phytoextraction of Cd and Zn by *Brassica Napus* L. *International Journal of Phytoremediation*, 19(7), 597–604.
- Dai, A., Zhao, T., & Chen, J. (2018, September 1). Climate Change and Drought: a Precipitation and Evaporation Perspective. *Current Climate Change Reports*, Vol. 4, pp. 301–312.
- Dall'Asta, P., Velho, A. C., Pereira, T. P., Stadnik, M. J., & Arisi, A. C. M. (2019). *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(1), 167–176.
- Dardanelli, M. S., Fernández De Córdoba, F. J., Espuny, M. R., Rodríguez Carvajal, M. A., Soria Díaz, M. E., Serrano, A. M. G., Megías, M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress.
- Dardanelli, M. S., Manyani, H., González-Barroso, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., Gil-Serrano, A. M., Espuny, M. R., Ollero, F. J. (2010). Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium

- (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant and Soil*.
- Dastager, S. G., & Damare, S. (2013). Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Current Microbiology*, 66(5), 421–427.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (1992). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 64).
- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H. M., Abbas, I. H., & Hassan, M. M. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences*.
- De Carvalho, C. C. C. R., & Caramujo, M. J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules*. MDPI AG.
- De Carvalho, C. C., & Caramujo, M. J. (2014). Bacterial diversity assessed by cultivation-based techniques shows predominance of *Staphylococcus* species on coins collected in Lisbon and Casablanca. *FEMS microbiology ecology*, 88(1), 26–37.
- De Freitas, J. R., Banerjee, M. R., & Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*.
- De Kievit, T. R., & Lam, J. S. (1997). Isolation and characterization of two genes, *waaC* (*rfaC*) and *waaF* (*rfaF*), involved in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 inner-core biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3451–3457.
- de Souza, E. M., Bassani, V. L., Sperotto, R. A., & Granada, C. E. (2016). Inoculation of new rhizobial isolates improve nutrient uptake and growth of bean (*Phaseolus vulgaris*) and arugula (*Eruca sativa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- de Vasconcellos, R. L. F., & Cardoso, E. J. B. N. (2009). Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *BioControl*, 54(6), 807–816.
- Del Cerro, P., Pérez-Montaño, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F. J., Megías, M., Hungria, M., & Ollero, F. J. (2017). The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific reports*, 7, 46712.
- Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2013). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602.
- Deng, Z. S., Zhao, L. F., Kong, Z. Y., Yang, W. Q., Lindström, K., Wang, E. T., & Wei, G. H. (2011). Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(3), 463–475.
- Dent, D., & Cocking, E. (2017). Establishing symbiotic nitrogen fixation in cereals and other non-legume crops: The Greener Nitrogen Revolution. *Agriculture and Food Security*, Vol. 6.
- Dewi Puspita, I., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K., & Nakatsu, C. H. (2012). Are Uncultivated Bacteria Really Uncultivable? *Microbes and Environments*, 27(4), 356–366.
- Díaz-Alcántara, C. A., Ramírez-Bahena, M. H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A., González-Andrés, F. (2014). Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(2), 149–156.

- Diez-Mendez, A., Menéndez, E., García-Fraile, P., Celador-Lera, L., Rivas, R., & Mateos, P. F. (2015). *Rhizobium cellulositicum* as a co-inoculant enhances *Phaseolus vulgaris* grain yield under greenhouse conditions. *Symbiosis*.
- Ding, Y., Peng, N., Du, Y., Ji, L., & Cao, B. (2014). Disruption of Putrescine Biosynthesis in *Shewanella oneidensis* Enhances Biofilm Cohesiveness and Performance in Cr(VI) Immobilization.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1271–1281.
- Do, P. T., Drechsel, O., Heyer, A. G., Hinch, D. K., & Zuther, E. (2014). Changes in free polyamine levels, expression of polyamine biosynthesis genes, and performance of rice cultivars under salt stress: a comparison with responses to drought. *Frontiers in Plant Science*, 5, 182.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- Drummel-Smith, J. (2000). Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane. *The EMBO Journal*, 19(1), 57–66.
- Duan, S., Liu, Z., Feng, X., Zheng, K., Cheng, L., & Zheng, X. (2012). Diversity and characterization of ramie-degumming strains. *Scientia Agricola*, 69(2), 119–125.
- Duarah, I., Deka, M., Saikia, N., & Deka Boruah, H. P. (2011). Phosphate solubilizers enhance NPK fertilizer use efficiency in rice and legume cultivation. *3 Biotech*, 1(4), 227–238.
- Dubey, S. K., Meena, R. K., Sao, S., Patel, J., & Shukla, P. (2014). Isolation and Characterization of Cellulose Degrading Bacteria from Biogas Slurry and their RAPD profiling. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 416–421.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, Vol. 106, pp. 85–125.
- Dunfield, K. (2002). Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 38(1), 1–9.
- DuPont, M. S., Mondin, Z., Williamson, G., & Price, K. R. (2000). Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3957–3964.
- Earl, J. P., Adappa, N. D., Krol, J., Bhat, A. S., Balashov, S., Ehrlich, R. L., & Hammond, J. (2018). Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*, 6(1), 190.
- Egamberdiyeva, D., & Höflich, G. (2004). Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments*, 56(2), 293–301.
- El-Shafey, N. M., & AbdElgawad, H. (2014). Luteolin, a bioactive flavone compound extracted from *Cichorium endivia* L. subsp. *divaricatum* alleviates the harmful effect of salinity on maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6), 2165–2177.
- Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*.
- Esitken, A., Yildiz, H. E., Ercisli, S., Figen Donmez, M., Turan, M., & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124(1), 62–66.

- Etesami, H., & Beattie, G. A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Fåhræus, G. (1957). The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Microbiology*, 16(2), 374–381.
- Farahani, A., Lebaschi, H., Hussein, M., Amir Hussein, S., Ali Reza, V., & Jahanfar, D. (2008). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, different levels of phosphorus and drought stress on water use efficiency, relative water content and proline accumulation rate of Coriander (*Coriandrum sativum* L.). In *Journal of Medicinal Plants Research* (Vol. 2).
- Farooq, M., Wahid, A., & Lee, D. J. (2009). Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(5), 937–945.
- Fazili, N. A., & Naeem, A. (2015). Anti-fibrillation potency of caffeic acid against an antidepressant induced fibrillogenesis of human α -synuclein: Implications for Parkinson's disease. *Biochimie*, 108, 178–185.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. (2011). molecules Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules*, 16, 16.
- Fiedler, H. P., Krastel, P., Müller, J., Gebhardt, K., & Zeeck, A. (2001). Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species.(1). *FEMS Microbiology Letters*, 196(2), 147–151.
- Figuroa-Bossi, N., Lemire, S., Maloriol, D., Balbontín, R., Casadesús, J., & Bossi, L. (2006). Loss of Hfq activates the σ E -dependent envelope stress response in *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 62(3), 838–852.
- Fikry, E. M., Gad, A. M., Eid, A. H., & Arab, H. H. (2019). Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 878–886.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., & Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496–512.
- Fletcher, M. (2001). *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. Yuehuei H. An, Richard J. Friedman. *The Quarterly Review of Biology*, 76(2), 237–237.
- Flores, O., Prince, C., Nuñez, M., Vallejos, A., Mardones, C., Yañez, C., Bastías, R. (2018). Genetic and phenotypic characterization of indole-producing isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* obtained from Chilean Kiwifruit Orchards. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Flores-Félix, J. D (2018). Caracterización molecular y funcional de biofertilizantes bacterianos, y análisis de su potencial para mejorar la producción de cultivo de maíz, guisante, lechuga, fresa y zanahoria. Tesis Doctoral.
- Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivera, L. P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., Rivas, R. (2013). Use of Rhizobium leguminosarum as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.
- Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., García-Fraile, P., González-Andrés, F., Silva, L. R., & Rivas, R. (2018). Rhizobium and Phyllobacterium bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. *Food Research International*.
- Fould, S., Dieng, A. L., Davies, K. G., Normand, P., & Maitelle, T. (2001). Immunological quantification of the nematode parasitic bacterium *Pasteuria penetrans* in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(3), 187–195.

- Fox, A. R., Soto, G., Valverde, C., Russo, D., Lagares, A., Zorreguieta, Á., Ayub, N. D. (2016). Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3522–3534.
- Frary, A., Göl, D., Keleş, D., Ökmen, B., Pinar, H., Şığva, H. T., Doğanlar, S. (2010). Salt tolerance in *Solanum pennellii*: Antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*.
- Fuentes-Ramirez, L. E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R., & Caballero-Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil*.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., & Hirsch, A. M. (2008). *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 67(3), 504–515.
- Galet, J., Deveau, A., Hôtel, L., Frey-Klett, P., Leblond, P., & Aigle, B. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Pirates both Ferrioxamine and Ferricoelichelin Siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Gallagher, L. A., Shendure, J., & Manoil, C. (2011). Genome-scale identification of resistance functions in *Pseudomonas aeruginosa* using Tn-seq. *mBio*, 2(1).
- Gamalero, E., & Glick, Bernard, R. (2015). Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiology*, 169(January), pp.00284.2015.
- Gamalero, E., Lingua, G., Giusy Capri, F., Fusconi, A., Berta, G., & Lemanceau, P. (2004). Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 79-87.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(5), 404–411.
- García, J. A. L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M., & Mañero, F. J. G. (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie, EDP Sciences*, 24(4), 169–176.
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Fernández, M. T., Velázquez, E. (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE*.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Marcos-García, M., & Rivas, R. (2017). Bacterial probiotics: a truly green revolution. In *Probiotics and plant health* (pp. 131-162). Springer, Singapore.
- García-Rodríguez, T., Gutiérrez-Navarro, A. M., García, R., & Silva, J. P. (1982). Indole acetic acid production by *Rhizobium*: Effect of 2-ketoglutaric acid. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(2), 153–155.
- García-Seco, D., Zhang, Y., Gutierrez-Mañero, F. J., Martín, C., & Ramos-Solano, B. (2015). Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *PLoS ONE*, 10(11).
- Garg, N., & Sharma, A. (2019). Role of putrescine (Put) in imparting salt tolerance through modulation of put metabolism, mycorrhizal and rhizobial symbioses in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Symbiosis*.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.E.V., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA.

- Gaur, R., & Tiwari, S. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnology*, 15(1).
- Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., & Ludwig, B. (2010, December). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 42, pp. 2058–2067.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., De Freitas, J. R., & Seib, A. M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1), 43–50.
- Gerwig, J., Kiley, T. B., Gunka, K., Stanley-Wall, N., & Stülke, J. (2014). The protein tyrosine kinases EpsB and PtkA differentially affect biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 4), 682–691.
- Ghasemi, Z., Ghaderian, S. M., Rodríguez-Garrido, B., Prieto-Fernández, Á., & Kidd, P. S. (2018). Plant species-specificity and effects of bioinoculants and fertilization on plant performance for nickel phytomining. *Plant and soil*, 425(1-2), 265-285.
- Gilbert, J. A., Meyer, F., Jansson, J., Gordon, J., Pace, N., Tiedje, J., Knight, R. (2010). The earth microbiome project: Meeting report of the “1 st EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6 th 2010. *Standards in Genomic Sciences*, 3(3), 249–253.
- Glaser, P., Kunst, F., Arnaud, M., Coudart, M. -P, Gonzales, W., Hullo, M. -F, ... Danchin, A. (1993). *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325° to 333deg; *Molecular Microbiology*, 10(2), 371–384.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research* (pp. 329–339).
- Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*.
- Golkar, P., & Taghizadeh, M. (2018). In vitro evaluation of phenolic and osmolite compounds, ionic content, and antioxidant activity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(3), 357–368.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206, 131-140.
- Govind, P. (2011). Model organisms used in molecular biology or medical research.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., & Annapurna, K. (2010). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. *Microbiology Monographs*, 333–364.
- Graham, A., Papalopulu, N., Cell, R. K. (1989). The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. Elsevier.
- Granér, G., Persson, P., Meijer, J., & Alström, S. (2003). A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 224(2), 269–276.

- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977.
- Greetatorn, T., Hashimoto, S., Sarapat, S., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Uchiumi, T., & Teaumroong, N. (2019). Empowering rice seedling growth by endophytic *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2. *Letters in Applied Microbiology*, 68(3), 258–266.
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2000). Identification of DNA sequences that regulate the expression of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(12), 1159–1165.
- Grobelak, A., & Hiller, J. (2017). Bacterial siderophores promote plant growth: Screening of catechol and hydroxamate siderophores. *International Journal of Phytoremediation*, 19(9), 825–833.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*.
- Guang-Can, T. A. O., Shu-Jun, T. I. A. N., Miao-Ying, C. A. I., & Guang-Hui, X. I. E. (2008). Phosphate-solubilizing and-mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 18(4), 515-523.
- Gül, A., Kidoglu, F., & Tüzel, Y. (2008). Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum*, L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3), 422.
- Gumiere, T., Ribeiro, C. M., Vasconcellos, R. L. F., & Cardoso, E. J. B. N. (2014). Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and Slash Pine (*Pinus elliottii*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*.
- Gutiérrez-Zamora, M. L., & Martínez-Romero, E. (2001). Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). In *Journal of Biotechnology* (Vol. 91).
- Habib, S. H., Kausar, H., & Saud, H. M. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. *BioMed Research International*, 2016.
- Hakim, S., Mirza, B. S., Zaheer, A., Mclean, J. E., Imran, A., Yasmin, S., & Sajjad Mirza, M. (2018). Retrieved 16S rRNA and nifH sequences reveal co-dominance of *Bradyrhizobium* and *Ensifer* (*Sinorhizobium*) strains in field-collected root nodules of the promiscuous host *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 485–497.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914.
- Halterman, D., Guenther, J., Collinge, S., Butler, N., & Douches, D. (2016, February 1). Biotech Potatoes in the 21st Century: 20 Years Since the First Biotech Potato. *American Journal of Potato Research*, Vol. 93, pp. 1–20.
- Hamon, M. A., & Lazazzera, B. A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42(5), 1199–1209.
- Hamon, M. A., Stanley, N. R., Britton, R. A., Grossman, A. D., & Lazazzera, B. A. (2004). Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 52(3), 847–860.
- Han, H. S., & Lee, K. D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant soil and Environment*, 52(3), 130.
- Hanafy Ahmed, A. H., Darwish, E., & Alobaidy, M. G. (2017). Impact of putrescine and 24-epibrassinolide on growth, yield and chemical constituents of cotton (*Gossypium barbadense* L.) plant grown under drought stress conditions. *Asian Journal of Plant Sciences*, 16(1), 9–23.

- Hannoufa, A., Pillai, B. V. S., & Chellamma, S. (2014). Genetic enhancement of Brassica napus seed quality. *Transgenic Research*, 23(1), 39–52.
- Hansen, M., Kragelund, L., Nybroe, O., & Sørensen, J. (1997). Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(4), 353–360.
- Haque, M. A., Cho, K. M., Barman, D. N., Kim, M. K., & Yun, H. D. (2015). A potential cellulose microfibril swelling enzyme isolated from *Bacillus* sp. AY8 enhances cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*, 50(5), 807–815.
- Hartman, K., van der Heijden, M. G. A., Roussely-Provent, V., Walser, J. C., & Schlaeppi, K. (2017). Deciphering composition and function of the root microbiome of a legume plant. *Microbiome*, 5(1), 1–13.
- Harvey, P., Warren, R., Achouak, W., & Ryder, M. (2005). Geographic differentiation of *Pseudomonas brassicacearum* populations and bio-control of take-all disease of wheat and *Pythium* root rot of canola.
- Haselwandter, K., Häninger, G., Ganzera, M., Haas, H., Nicholson, G., & Winkelmann, G. (2013). Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal Basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 26(6), 969–979.
- Hassan, M. K., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2019). The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture*, 9(7), 142.
- Hatayama, K., Kawai, S., Shoun, H., Ueda, Y., & Nakamura, A. (2005). *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1539–1544.
- Heckmann, A. B., Sandal, N., Bek, A. S., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M. W., Stougaard, J. (2011). Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(11), 1385–1395.
- Heidari, M., & Golpayegani, A. (2012). Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(1), 57–61.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, Vol. 311, pp. 1–18.
- Hmida-Sayari, A., Gargouri-Bouزيد, R., Bidani, A., Jaoua, L., Saviouré, A., & Jaoua, S. (2005). Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science*, 169(4), 746-752.
- Hoagland, D.R. and Snyder, W. C. (1993). Nutrition of strawberry plant under controlled conditions.(a) Effects of deficiencies of boron and certain other elements,(b) susceptibility to injury from sodium. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 30, 288-294.
- Höfte, M., & Bakker, P. A. H. M. (2007). Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In *Microbial Siderophores* (pp. 121–133).
- Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69(5), 480-482.
- Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, 70(8), 712-715.

- Hubner, P., Willison, J. C., Vignais, P. M., & Bickle, T. A. (1991). Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 173(9), 2993–2999.
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11), e1000255.
- Hussain, F., Jahan, N., Sultana, B., & Jamil, S. (2018). Identification of Hypotensive Biofunctional Compounds of *Coriandrum sativum* and Evaluation of Their Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition Potential.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 619–626.
- Igual, J. M., Valverde, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2003). Genomic fingerprinting of *Frankia* strains by PCR-based techniques. Assessment of a primer based on the sequence of 16S rRNA gene of *Escherichia coli*. In *Frankia Symbiosis* (pp. 115–123). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Imada, E. L., Rolla Dos Santos, A. A. de P., Oliveira, A. L. M. de, Hungria, M., & Rodrigues, E. P. (2017). Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology*, 168(3), 283–292.
- Immanen, J., Nieminen, K., Smolander, O. P., Kojima, M., Alonso Serra, J., Koskinen, P., Helariutta, Y. (2016). Cytokinin and Auxin Display Distinct but Interconnected Distribution and Signaling Profiles to Stimulate Cambial Activity. *Current Biology*, 26(15), 1990–1997.
- Isfahani, F. M., Isfahani, S. M., Besharati, H., & Tarighaleslami, M. (2013). Yield and concentration of some macro and micro nutrients of cucumber as influenced by bio-fertilizers. *Annals of Biological Research*, 4(8), 61-67.
- Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M. S., Riaz, M., Shahzad, S. M., Imran, Q., & Ali, I. (2016). Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 456–467.
- Ivanova, E. P., Christen, R., Bizet, C., Clermont, D., Motreff, L., Bouchier, C., Kiprianova, E. A. (2009). *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neourantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2476–2481.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (2000). The endo- β -1,4-glucanase *CelA* of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(7), 703–714.
- Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Jang, I. C., Oh, S. J., Seo, J. S., Choi, W. Bin, Song, S. I., Kim, C. H., Kim, J. K. (2003). Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology*, 131(2), 516–524.
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575.
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.

- Jazo, I. Z., & Pottosin, I. (2018). Methods related to polyamine control of cation transport across plant membranes. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1694, pp. 257–276). Humana Press Inc.
- Jha, B., Gontia, I., & Hartmann, A. (2012). The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil*, 356(1–2), 265–277.
- Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., & Gao, C. (2015). Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants*, 1(10).
- Jiang, R., Hodgson, J. M., Mas, E., Croft, K. D., & Ward, N. C. (2016). Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *Journal of Nutritional Biochemistry*.
- Jiang, W. Z., Henry, I. M., Lynagh, P. G., Comai, L., Cahoon, E. B., & Weeks, D. P. (2017). Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 15(5), 648–657.
- Jiménez-Gómez, A., Celador-Lera, L., Fradejas-Bayón, M., & Rivas, R. (2017). Plant probiotic bacteria enhance the quality of fruit and horticultural crops. *AIMS Microbiology*, 3(3), 483–501.
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Menéndez, E., Velázquez, E., & Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*.
- Jiménez-Gómez, A., Menéndez, E., Flores-Félix, J. D., García-Fraile, P., Mateos, P. F., & Rivas, R. (2016). Effective colonization of spinach root surface by *Rhizobium*. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*.
- Jiménez-Gómez, Saati-Santamaría, Igual, Rivas, Mateos, & García-Fraile. (2019). Genome Insights into the Novel Species *Microvirga brassicacearum*, a Rapeseed Endophyte with Biotechnological Potential. *Microorganisms*, 7(9), 354.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
- Johnson, G. (2019). High throughput DNA extraction of legume root nodules for rhizobial metagenomics. *AMB Express*, 9(1).
- Joshi, F. R., Desai, D. K., Archana, G., & Desai, A. J. (2009). Enhanced survival and nodule occupancy of pigeon pea nodulating *Rhizobium* sp. ST1 expressing *fegA* gene of *Bradyrhizobium japonicum* 61A152. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 9(2), 40–51.
- Jung, H., Kim, J., Woo, S., Biological, S. K.A. (2007). Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. Koreascience.or.kr.
- Jupe, S. C., Causton, D. R., & Scott, I. M. (1988). Cellular basis of the effects of gibberellin and the pro gene on stem growth in tomato. *Planta*, 174(1), 106–111.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 33, pp. 188–203.
- Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M., & Heulin, T. (2005). Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): Characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Research in Microbiology*, 156(4), 522–531.
- Kalappurakkal, R., Thomas, S., Mathew, L., & Rishad, K. S. (2018). Isolation and Molecular Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria, *Bacillus licheniformis* UBPSB-07 Capable of Enhancing Seed Germination in *Vigna radiata* L. Solid Waste Management through Paper recycling View project

Bioprospecting of hydrolytic bacteria from mangroves View project Isolation and Molecular Identification of Phosphate Solubilizing Bacteria, *Bacillus licheniformis* UBPSB-07 Capable of Enhancing Seed Germination in *Vigna radiata* L. In An International Journal of Plant Morphology (Vol. 68).

Kaloudas, D., Pavlova, N., R. P.-B. and B., (2019). EBWS: Essential bioinformatics Web services for sequence analyses. *DI.acm.org*.

Kamali, H., Ahmadzadeh Sani, T., Mohammadi, A., Alesheikh, P., Khodaverdi, E., & Hadizadeh, F. (2018). A comparison between pressurized hot water and pressurized liquid extraction for optimizing phenolic and antioxidants capacity of the wooden layer between of walnut seed. *Journal of Supercritical Fluids*.

Kambouris, M. E., Pavlidis, C., Skoufas, E., Arabatzis, M., Kantzanou, M., Velegraki, A., & Patrinos, G. P. (2018). Culturomics: A new kid on the block of OMICS to enable personalized medicine. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 22(2), 108–118.

Kamran, M. A., Eqani, S. A. M. A. S., Bibi, S., Xu, R. K., Amna, Monis, M. F. H., ... Chaudhary, H. J. (2016). Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 256–263.

Kang, J. P., Huo, Y., Kim, Y. J., Ahn, J. C., Hurh, J., Yang, D. U., & Yang, D. C. (2019). *Rhizobium panacihumi* sp. nov., an isolate from ginseng-cultivated soil, as a potential plant growth promoting bacterium. *Archives of Microbiology*, 201(1), 99–105.

Kannahi, M., & Senbagam, N. (2014). Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4), 1142-1145.

Kanso, S., & Patel, B. K. C. (2003). *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 401–406.

Kao, C. M., Chen, S. C., Chen, Y. S., Lin, H. M., & Chen, Y. L. (2003). Detection of *Burkholderia pseudomallei* in rice fields with PCR-based technique. *Folia Microbiologica*, 48(4), 521–524.

Kapoor, R., Soni, R., & Kaur, M. (2016). Gibberellins production by fluorescent *Pseudomonas* isolated from Rhizospheric soil of *Malus* and *Pyrus*. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9(2), 193.

Kasak, L., Horak, R. I. T. A., & Kivisaar, M. (1997). Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3134-3139.

Kashyap, B. K., Solanki, M. K., Pandey, A. K., Prabha, S., Kumar, P., & Kumari, B. (2019). *Bacillus* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Promising Green Agriculture Technology. In *Plant Health Under Biotic Stress* (pp. 219–236).

Kaur, J., Verma, M., & Lal, R. (2011). *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus hirsch* and *müller* 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(5), 1218–1225.

Kaur, S. J., & Gupta, V. K. (2017). Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Annals of Microbiology*, 67(4), 333–342.

Kawaka, F., Makonde, H., Dida, M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., & Muoma, J. (2018). Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. *PLoS ONE*, 13(11), 1–13.

Khan, A. A. (1992). Preplant physiological seed conditioning. *Horticultural reviews*, 13(1), 131-181.

- Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Lee, I. J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 58–64.
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Adhikari, A., Jan, R., Ali, S., Lee, I. J. (2019). Halotolerant Rhizobacterial Strains Mitigate the Adverse Effects of NaCl Stress in Soybean Seedlings. *BioMed Research International*, 2019.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology* (pp. 31–62).
- Khush, G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature reviews genetics*, 2(10), 815.
- Kimes, N. E., López-Pérez, M., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Igual, J. M., Peix, A., Velázquez, E. (2015). *Pseudorhizobium pelagicum* gen. nov., sp. nov. isolated from a pelagic Mediterranean zone. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(5), 293–299.
- Kisa, D., Elmastaş, M., Öztürk, L., & Kayır, Ö. (2016). Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Applied Biological Chemistry*, 59(6), 813–820.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M., & Shimizu, S. (1995). Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(3), 714–718.
- Koch, M., Kruse, J., Eichler-Löbermann, B., Zimmer, D., Willbold, S., Leinweber, P., & Siebers, N. (2018). Phosphorus stocks and speciation in soil profiles of a long-term fertilizer experiment: Evidence from sequential fractionation, P K-edge XANES, and ³¹P NMR spectroscopy. *Geoderma*, 316, 115–126.
- Kopycińska, M., Lipa, P., Cieśla, J., Kozieł, M., & Janczarek, M. (2018). Extracellular polysaccharide protects *Rhizobium leguminosarum* cells against zinc stress in vitro and during symbiosis with clover. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3), 355–368.
- Kuiper, I., Bloemberg, G. V., Noreen, S., Thomas-Oates, J. E., & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Increased Uptake of Putrescine in the Rhizosphere Inhibits Competitive Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens* Strain WCS365 (Vol. 14).
- Kumar Mishra, B., Prakash Aishwath, O., & Kishore Sharma, Y. (2017). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on coriander (*Coriandrum sativum*) growth and yield under semi-arid condition of India Assessment of edaphic stresses and nutrient management for sustainable seed spices production View project Harnessing P mobilizing capacity of *Foeniculum vulgare*: An innovative and eco-friendly approach for P acquisition by plant in degraded soil ecosystem View project. In *Article in Indian Journal of Agricultural Sciences*.
- Kumar, I., & Sharma, R. K. (2018). Production of secondary metabolites in plants under abiotic stress: an overview. *Significan. Bioeng. Biosci.*, 2, 1-5.
- Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. (2008, May). Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 35, pp. 377–391.
- Kumari, S., Panjabinee Sabharwal, V., Kushwaha, H. R., Sopory, S. K., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2009). Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. *Functional and Integrative Genomics*, 9(1), 109–123.
- Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M., Pizzatti, C., Chen, X., & Cortesi, P. (2016). Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–11.

- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, Vol. 228, pp. 367–381.
- Kwak, Y., Kwon Jung, B., & Shin, J.-H. (2015). Complete genome sequence of *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5T (=DSM 16299T), a phosphate-solubilizing rhizobacterium for bacterial biofertilizer Archaeal DNA replication. *Journal of Biotechnology*, 193, 137–138.
- Ladha, J. K., De Bruijn, F. J., & Malik, K. A. (1997). Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice-a frontier project. *Plant and Soil*, 194(1-2), 1-10.
- Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Raoult, D. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12), 1185–1193.
- Lally, R. D., Galbally, P., Moreira, A. S., Spink, J., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2017). Application of endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a bacterial consortium to *Brassica napus* can increase plant height and biomass under greenhouse and field conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J., & Strøm, A. R. (1991). DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 5(5), 1049–1064.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S. R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T. H., Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional and Integrative Genomics*, Vol. 15, pp. 141–161.
- Larcher, M., Rapior, S., & Cleyet-Marel, J. C. (2008). Bacteria from the rhizosphere and roots of *Brassica napus* influence its root growth promotion by *Phyllobacterium brassicacearum*. *Acta Botanica Gallica*, 155(3), 355–366.
- Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M., & Bettaieb, T. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*, Vol. 103, pp. 9–26.
- Läuchli, A., & Grattan, S. R. (2007). Plant growth and development under salinity stress. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 1–32).
- Lavakush, Yadav, J., Verma, J. P., Jaiswal, D. K., & Kumar, A. (2014). Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering*.
- Lay, C. Y., Bell, T. H., Hamel, C., Harker, K. N., Mohr, R., Greer, C. W., St-Arnaud, M. (2018). Canola root-Associated microbiomes in the Canadian Prairies. *Frontiers in Microbiology*.
- Lee, C. C., Smith, M., Kibblewhite-Accinelli, R. E., Williams, T. G., Wagschal, K., Robertson, G. H., & Wong, D. W. S. (2006). Isolation and characterization of a cold-active xylanase enzyme from *Flavobacterium* sp. *Current Microbiology*, 52(2), 112–116.
- Lee, K. D., Han, H. S., & Lee, K. D. (2005). Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. In *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* (Vol. 1).
- Lee, K. D., Han, H. S., & Lee, K. D. (2005). Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity. In *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* (Vol. 1).
- Lee, S., Ka, J. O., & Song, H. G. (2012). Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. *Journal of Microbiology*.
- Leigh, J. A., & Walker, G. C. (1994). Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics*, 10(2), 63–67.

- Leong, S. A., & Neilands, J. B. (1982). Siderophore production by phytopathogenic microbial species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 218(2), 351–359.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., & Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344(6268), 781–784.
- Lessie, T. G., & Phibbs, P. V. (1984). Alternative Pathways of Carbohydrate Utilization in *Pseudomonads*. *Annual Review of Microbiology*, 38(1), 359–388.
- Leveau, J. H. J. (2007, November). The magic and menace of metagenomics: Prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 119, pp. 279–300.
- Levy, I., Shani, Z., engineering, O. S.-B., (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4- β -glucanase and cellulose-binding domains.
- Li, Q., Chen, L., & Yang, A. (2019, January 1). The Molecular Mechanisms Underlying Iron Deficiency Responses in Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21.
- Li, Y., Wang, Z., Zhou, Y., Zhu, G., & Lin, L. (2019). Enzymatic identification and functional sites study of a novel cold-active cellulase (MkCel5) from *Microbacterium kitamiense*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 739–747.
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3(3).
- Liu, B., Bian, C., Huang, H., Yin, Z., Shi, Q., & Deng, X. (2016). Complete genome sequence of a marine bacterium, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain S1, with high mercury resistance and bioaccumulation capacity. *Genome Announcements*, 4(3).
- Liu, F., Guo, Y., Gu, D., Xiao, G., Chen, Z., & Chen, S. (1997). Salt tolerance of transgenic plants with BADH cDNA. *Acta Genetica Sinica*, 24(1), 54-58.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., & Ma, B. (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 9155–9164.
- Liu, H., Zhang, L., Meng, A., Zhang, J., Xie, M., Qin, Y., ... Qiu, L. (2017). Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. *PLoS ONE*, 12(10), 1–11.
- Liu, X., Zhao, H., & Chen, S. (2006). Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*.
- Liu, Z., Beskrovnyaya, P., Melnyk, R. A., Hossain, S. S., Khorasani, S., O, L. R., Steven Lindow, E. E. (2018). A Genome-Wide Screen Identifies Genes in Rhizosphere-Associated *Pseudomonas* Required to Evade Plant Defenses.
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole.
- Loboguerrero, A. M., Campbell, B., Cooper, P., Hansen, J., Rosenstock, T., & Wollenberg, E. (2019). Food and Earth Systems: Priorities for Climate Change Adaptation and Mitigation for Agriculture and Food Systems. *Sustainability*, 11(5), 1372.
- Loganathan, M., & Saha, S. (2014). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) induces resistance against *Fusarium* wilt and improves lycopene content and texture in tomato Toxicological investigations on the novel insecticide molecules and plant origin insecticides against major insect pests of vegetables View project Genetic improvement of tomato through resistance breeding for EB. *African Journal of Microbiology Research*.

- Loman, N. J., & Pallen, M. J. (2015). Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(12), 787–794.
- Loper, J. E., & Henkels, M. D. (1999). Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *Applied and environmental microbiology* (Vol. 65).
- Loper, J. E., Gross, H., & Loper, J. E. (2014). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp *Erwinia amylovora* View project Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp.
- López-Bucio, J., De la Vega, O. M., Guevara-García, A., & Herrera-Estrella, L. (2000). Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology*, 18(4), 450–453.
- López-Gómez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Muñoz-Sánchez, J. R., Marín-Peña, A. J., Lluch, C., & Herrera-Cervera, J. A. (2017). Polyamines contribute to salinity tolerance in the symbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* by preventing oxidative damage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 116, 9–17.
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Velázquez, E., Rogel, M. A., Acosta, J. L., González, V., & Martínez-Romero, E. (2012). *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Systematic and applied microbiology*, 35(6), 353-358.
- López-Lázaro, M. (2009). Chemopreventive-cytotoxic activity of compounds isolated from natural products. *Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin*.
- Lowe-Power, T. M., Hendrich, C. G., von Roepenack-Lahaye, E., Li, B., Wu, D., Mitra, R., ... Allen, C. (2018). Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1330–1349.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J., & Lee, M. D. (2003). Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Applied and environmental microbiology*, 69(11), 6816–6824.
- Lu, K., Wei, L., Li, X., Wang, Y., Wu, J., Liu, M., ... Li, J. (2019). Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement. *Nature Communications*, 10(1). h
- Lue, Y. (2016). Complete genome of *Planococcus rifietoensis* M8T, a halotolerant and potentially plant growth promoting bacterium. *Journal of Biotechnology*, 221, 114–115.
- Ma, W., Sebestianova, S. B., Sebestian, J., Burd, G. I., Guinel, F. C., & Glick, B. R. (2003). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(3), 285-291.
- Machado, R., & Serralheiro, R. (2017). Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth. Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization. *Horticulturae*, 3(2), 30.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Mairböurl, H. (2013). Red blood cells in sports: Effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in Physiology*.
- Majumdar, R., Minocha, R., Lebar, M. D., Rajasekaran, K., Long, S., Carter-Wientjes, C., Cary, J. W. (2019). Contribution of maize polyamine and amino acid metabolism toward resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Frontiers in Plant Science*, 10.

- Makarewicz, O., Dubrac, S., Msadek, T., & Borriss, R. (2006). Dual Role of the PhoPP Response Regulator: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 Phytase Gene Transcription Is Directed by Positive and Negative Interactions with the phyC Promoter. *Journal of bacteriology*, 188(19), 6953–6965.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... Koonin, E. V. (2011, June). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 9, pp. 467–477.
- Maldonado-González, M. M., Prieto, P., Ramos, C., & Mercado-Blanco, J. (2013). From the root to the stem: Interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 6(3), 275–287.
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 98, pp. 6599–6607.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, Vol. 5, pp. 359–368.
- Marimuthu, M., Sorimuthu, A., & Muruganatham, S. (2019). Production and Optimization of Xylanase Enzyme from *Bacillus subtilis* using Agricultural Wastes by Solid State Fermentation. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 9(4), 169–173.
- Marschner, P., Crowley, D., & Yang, C. H. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261(1–2), 199–208.
- Martín, L., Saenz de Miera, L. E., & Martín, M. T. (2014). AFLP and RAPD characterization of *Phaeoacremonium aleophilum* associated with *Vitis vinifera* decline in Spain. *Journal of Phytopathology*, 162(4), 245–257.
- Martinez, V., Mestre, T. C., Rubio, F., Girones-Vilaplana, A., Moreno, D. A., Mittler, R., & Rivero, R. M. (2016). Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*.
- Martínez-Molina, E., Morales, V. M., & Hubbell, D. H. (1979). Hydrolytic Enzyme Production by *Rhizobium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(6), 1186–1188.
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: Overview and perspectives. In *Plant and Soil* (Vol. 252, pp. 11–23).
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293–319.
- Mascherpa, D., Carazzone, C., Marrubini, G., Gazzani, G., & Papetti, A. (2012). Identification of phenolic constituents in *cichorium endivia* Var. *crispum* and Var. *latifolium* salads by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(49), 12142–12150.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009, October). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, Vol. 17, pp. 458–466.
- Mateos, P. F., Baker, D. L., Petersen, M., Velázquez, E., Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Molina, E., Dazzo, F. B. (2001). Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6), 475–487.
- Mateos, P. F., Baker, D. L., Philip-Hollingsworth, S., Squartini, A., Paruffo, A. D. B., Nuti, M. P., & Dazzo, F. B. (2009). Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. *Canadian Journal of Microbiology*.

- Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martinez-Molina, E., ... Dazzo, F. B. (1992). Cell-Associated Pectinolytic and Cellulolytic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifolii*. *Applied and environmental microbiology*.
- Mathur, N., Goswami, G. K., & Nath Pathak, A. (2015). Bacterial and Fungal Xylanase. *Biomedical Data Mining*, 4(1), 112.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 525-532.
- Maurya, B. R., Meena, V. S., & Meena, O. P. (2014). Influence of Inceptisol and Alfisol's potassium solubilizing bacteria (KSB) isolates on release of K from waste mica. *Vegetos*, 27(1), 181-187.
- McCann, M. C., & Roberts, K. (1994). Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany*, 1683-1691.
- Mcrose, D. L., Seyedsayamdost, M. R., & Morel, F. M. M. (2018). Multiple siderophores: bug or feature? *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(3), 983–993.
- Mehmood, U., Inam-ul-Haq, M., Saeed, M., Altaf, A., Azam, F., & Hayat, S. (2018). A brief review on plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a key role in plant growth promotion. *Plant Prot*, 2(2), 77-82.
- Mena-Violante, H. G., & Olalde-Portugal, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 103-106.
- Menendez, E., Garcia-Fraile, P., & Rivas, R. (2015). Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioengineering*, 2(3), 163–182.
- Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., Fabryová, A., Igual, J. M., Benada, O., Mateos, P. F., García-Fraile, P. (2015). *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), 2852–2858.
- Menéndez, E., Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Rivas, R., Murray, J. D., & Mateos, P. F. (2019). Legumes display common and host-specific responses to the rhizobial cellulase CelC2 during primary symbiotic infection. *Scientific Reports*, 9(1).
- Menéndez, Esther, Ramírez-Bahena, M. H., Fabryová, A., Igual, J. M., Benada, O., Mateos, P. F., García-Fraile, P. (2015). *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), 2852–2858.
- Mens, C., Li, D., Haaima, L. E., Gresshoff, P. M., & Ferguson, B. J. (2018). Local and systemic effect of cytokinins on soybean nodulation and regulation of their Isopentenyl Transferase (IPT) biosynthesis genes following Rhizobia inoculation. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of bacteriology*, 162(1), 328-334.
- Merín, M. G., Martín, M. C., Rantsiou, K., Cocolin, L., & Inés Morata De Ambrosini, V. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape.
- Merlin, A., He, Z. L., & Rosolem, C. A. (2013). Ruzigrass affecting soil-phosphorus availability. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*.
- Metzker, M. L. (2009). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11.

- Michael, A. J. (2016, July 15). Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 291, pp. 14896–14903.
- Miller, S. H., Mark, G. L., Franks, A., & O’Gara, F. (2008). *Pseudomonas-Plant Interactions*. In *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory* (pp. 353–376).
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2017). Superficies y producciones de cultivos.
- Mishra, P., Singh, P. P., Singh, S. K., & Verma, H. (2019). Sustainable agriculture and benefits of organic farming to special emphasis on PGPR. In *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology* (pp. 75-87).
- Mitra, S., Mukherjee, A., Wiley-Kalil, A., Das, S., Owen, H., Reddy, P. M., & Gyaneshwar, P. (2016). A rhamnose-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium* sp. IRBG74 is defective in root colonization and beneficial interactions with its flooding-tolerant hosts *Sesbania cannabina* and wetland rice. *Journal of experimental botany*, 67(19), 5869-5884.
- Mojica, F. J. M., & Garrett, R. A. (2013). Discovery and Seminal Developments in the CRISPR Field. In *CRISPR-Cas Systems* (pp. 1–31).
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, Vol. 36, pp. 244–246.
- Mojica, F. J. M., Ferrer, C., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 17(1), 85–93.
- Montalbán, B., Croes, S., Weyens, N., Lobo, M. C., Pérez-Sanz, A., & Vangronsveld, J. (2016). Characterization of bacterial communities associated with *Brassica napus* L. growing on a Zn-contaminated soil and their effects on root growth. *International Journal of Phytoremediation*, 18(10), 985–993.
- Montes-BERRUETA, D., DUGARTE-DA SILVA, S., ROJAS-DUQUE, N., SALMEN, S., & BERRUETA, L. (2012). Muerte celular inducida por condiciones ambientales adversas en *Calibrachoa parviflora* (Petunia). *Avances en Biomedicina*, 1(1), 9-17.
- Mora-Ruiz, M. del R., Font-Verdera, F., Díaz-Gil, C., Urdiain, M., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Rosselló-Móra, R. (2015). Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily Salicornioideae (Amaranthaceae). *Systematic and Applied Microbiology*, 38(6), 406–416.
- Mostajeran, A., Amooaghaie, R., & Emtiazi, G. (2007). The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. *Plant and Soil*, 291(1–2), 239–248.
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2015). Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma*, 252(2), 461–475.
- Msaada, K., Jemia, M. Ben, Salem, N., Bachrouch, O., Sriti, J., Tammar, S., ... Marzouk, B. (2017). Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit varieties. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3176–S3183.
- Msaddak, A., Rejili, M., Durán, D., Rey, L., Imperial, J., Palacios, J. M., ... Mars, M. (2017). Members of *Microvirga* and *Bradyrhizobium* genera are native endosymbiotic bacteria nodulating *Lupinus luteus* in Northern Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(6), 1–11.

- Mur, L. A. J., Simpson, C., Kumari, A., Gupta, A. K., & Gupta, K. J. (2017). Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of Botany*, 119(5), 703–709.
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., ... Peters, J. W. (2016). Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3698–3710.
- Mwenda, G. M., O'Hara, G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J. (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 291–299.
- Nabavi, S. F., Braidy, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Woźniak, K., & Nabavi, S. M. (2015, October 1). Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*, Vol. 119, pp. 1–11.
- Nakada, Y., & Itoh, Y. (2003). Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology*, 149(3), 707–714.
- Nam, Y. Do, Chang, H. W., Kim, K. H., Roh, S. W., Kim, M. S., Jung, M. J., Bae, J. W. (2008). Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. *Journal of Microbiology*, 46(5), 491–501.
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., & Yuan, Z. C. (2018, August 1). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology*, Vol. 19, pp. 2036–2050.
- Nardoza, S., Cooney, J., Boldingh, H. L., Hewitt, K. G., Trower, T., Jones, D., ... Richardson, A. C. (2020). Phytohormone and Transcriptomic Analysis Reveals Endogenous Cytokinins Affect Kiwifruit Growth under Restricted Carbon Supply. *Metabolites*, 10(1), 23.
- Narkthewan, P., & Makkapan, W. (2019). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Cellulase activity of *Bacillus velezensis* isolated from soil in a dairy farm Cellulase activity of *Bacillus velezensis* isolated from soil in a dairy farm. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 346, 12040.
- Naser, H. M., Hanan, E. H., Elsheery, N. I., & Kalaji, H. M. (2016). Effect of biofertilizers and putrescine amine on the physiological features and productivity of date palm (*Phoenix dactylifera*, L.) grown on reclaimed-salinized soil. *Trees - Structure and Function*, 30(4), 1149–1161.
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2003). Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. *Plant growth regulation*, 40(2), 97-106.
- Nautiyal, C. S., Govindarajan, R., Lavania, M., & Pushpangadan, P. (2008). Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: Involvement of plant growth promoting rhizobacteria NRRL B-30488. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Nawaz, S., & Bano, A. (2019). Effects of PGPR (*Pseudomonas* sp.) and Ag-nanoparticles on enzymatic activity and physiology of cucumber. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*.
- Neik, T. X., Barbetti, M. J., & Batley, J. (2017). Current status and challenges in identifying disease resistance genes in brassica napus. *Frontiers in Plant Science*. *Frontiers in plant science*, 8, 1788.
- Neilands, J. B. (2003). Microbial Iron Compounds. *Annual Review of Biochemistry*.
- Nelson, D. M., Glawe, A. J., Labeda, D. P., Cann, I. K. O., & Mackie, R. I. (2009). *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(7), 1708–1714.

- Neocleous, D., Koukounaras, A., Siomos, A. S., & Vasilakakis, M. (2014). Assessing the Salinity Effects on Mineral Composition and Nutritional Quality of Green and Red “Baby” Lettuce. *Journal of Food Quality*.
- Nesse, L. L., Berg, K., & Vestby, L. K. (2015). Effects of Norspermidine and Spermidine on Biofilm Formation by Potentially Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Wild-Type Strains.
- Nett, R. S., Contreras, T., & Peters, R. J. (2017). Characterization of CYP115 As a Gibberellin 3-Oxidase Indicates That Certain Rhizobia Can Produce Bioactive Gibberellin A4. *ACS Chemical Biology*, 12(4), 912–917.
- Nett, R. S., Dickschat, J. S., Peters, R. J., & Carver, R. J. (2016). Labeling Studies Clarify the Committed Step in Bacterial Gibberellin Biosynthesis Scheme 1. Reaction Catalyzed by CYP114 + Fd GA in Bacterial GA Biosynthesis. *Org. Lett.*, 18, 5974–5977.
- Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., & Osakabe, Y. (2016). Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 6, 31481.
- Nosheen, A., Bano, A., Yasmin, H., Keyani, R., Habib, R., Shah, S. T. A., & Naz, R. (2016). Protein quantity and quality of safflower seed improved by NP fertilizer and rhizobacteria (*Azospirillum* and *azotobacter* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Nuyens, F., Van Zyl, W. H., Iserentant, D., Verachtert, H., & Michiels, C. (2001). Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo- β -xylanase (*xynA*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 431–434.
- Ochoa-Velasco, C. E., Valadez-Blanco, R., Salas-Coronado, R., Sustaita-Rivera, F., Hernández-Carlos, B., García-Ortega, S., & Santos-Sánchez, N. F. (2016). Effect of nitrogen fertilization and *Bacillus licheniformis* biofertilizer addition on the antioxidants compounds and antioxidant activity of greenhouse cultivated tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L. var. Sheva). *Scientia Horticulturae*, 201, 338–345.
- O’Gara, F., & Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia export of fixed N₂ as NH₄⁺. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 437(2), 313–321.
- Ordookhani, K., Khavazi, K., Moezzi, A., & Rejali, F. (2010). Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research*, 5(10), 1108–1116.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111(1), 38–43.
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G. P., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., Martínez-Romero, E. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics*, 13(1).
- Ortuño Castro, N., Gutierrez, C., Isabel Claros Magnus, M., & Antonio Castillo, J. (2014). Bacteria associated with the cultivation of quinoa in the Bolivian Altiplano and their biotechnological potential Pathogen diversity in a country with highly general biodiversity View project. R
- Oueslati, M., Mulet, M., Gomila, M., Berge, O., Hajlaoui, M. R., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2019). New species of pathogenic *Pseudomonas* isolated from citrus in Tunisia: Proposal of *Pseudomonas kairouanensis* sp. nov. and *Pseudomonas nabeulensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(3), 348–359.
- Özcengiz, G., biotechnology, İ. Ö.N. (2015). Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic. Elsevier.

- Pacheco L., N., Cano-Sosa, J., Poblano C., F., Rodríguez-Buenfil, I., & Ramos-Díaz, A. (2016). Different Responses of the Quality Parameters of *Coriandrum sativum* to Organic Substrate Mixtures and Fertilization. *Agronomy*, 6(2), 21.
- Paço, A., Brígido, C., Alexandre, A., Mateos, P. F., & Oliveira, S. (2016). The Symbiotic Performance of Chickpea Rhizobia Can Be Improved by Additional Copies of the *clpB* Chaperone Gene. *PLoS One*, 11(2), e0148221.
- Pandya, N. D., & Desai, P. V. (2014). Screening and characterization of GA 3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. In *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (Vol. 3).
- Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Sordelli, B., Spini, V., Carazzone, C., & Gazzani, G. (2008). Hydroxycinnamic acid derivatives occurring in *Cichorium endivia* vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2), 472–476.
- Park, J. Y., Kang, B. R., Ryu, C. M., Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2018). Polyamine is a critical determinant of *Pseudomonas chlororaphis* O6 for GacS-dependent bacterial cell growth and biocontrol capacity. *Molecular Plant Pathology*, 19(5), 1257–1266.
- Park, Y. G., Mun, B. G., Kang, S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W., Yun, B. W. (2017). *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE*, 12(3).
- Passari, A. K., Mishra, V. K., Leo, V. V., Gupta, V. K., & Singh, B. P. (2016). Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from *Clerodendrum colebrookianum* Walp. *Microbiological Research*, 193, 57–73.
- Paterson, J., Jahanshah, G., Li, Y., Wang, Q., Mehnaz, S., & Gross, H. (2017). The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3), 1–12.
- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S., Mavrodi, D. V., Dodson, R. J. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature biotechnology*, 23(7), 873.
- Pearson, W. R., & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison (amino acid/nucleic acid/data base searches/local similarity). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M., Infection, E. V.-, and, G. (2018) The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. Elsevier.
- Pereira, S. I. A., & Castro, P. M. L. (2014). Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Pereira, S. I. A., Monteiro, C., Vega, A. L., & Castro, P. M. L. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology*, Vol. 5, pp. 53–63.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131.
- Pérez-Montañó, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, Vol. 169, pp. 325–336.

- Perez-Vizcaino, F., & Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Perley, J. E., & Stowe, B. B. (1966). On the Ability of *Taphrina deformans* to Produce Indoleacetic Acid from Tryptophan by Way of Tryptamine. *Plant Physiology*, 41(2), 234–237.
- Persmark, M., Pittman, P., Buyer, J. S., Schwyn, B., Gill, P. R., & Neilands, J. B. (1993). Isolation and Structure of Rhizobactin 1021, a Siderophore from the Alfalfa Symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. *Journal of the American Chemical Society*, 115(10), 3950–3956.
- Pignata, G., Niñirola, D., Casale, M., Lo Turco, P. E., Egea-Gilabert, C., Fernández, J. A., & Nicola, S. (2015). Inherent Quality and Safety of Watercress Grown in a Floating System Using *Bacillus subtilis*.
- Pikovskaya, & RI. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370.
- Pingali, P. L. (2012). *Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead*.
- Pinto, R. S., & Reynolds, M. P. (2015). Common genetic basis for canopy temperature depression under heat and drought stress associated with optimized root distribution in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Pittalá, V., Salerno, L., Romeo, G., Acquaviva, R., Di Giacomo, C., & Sorrenti, V. (2018). Therapeutic Potential of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in Diabetes. *Current Medicinal Chemistry*, 25(37), 4827–4836.
- Plant, S. S., Environment, C. (2000). Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Wiley Online Library*.
- Pliego, C., Crespo-Gómez, J., (2019). Response of the biocontrol agent *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 to *Rosellinia necatrix* exudate. *Am Soc Microbiol*.
- Polissi, A., & Sperandeo, P. (2014). The Lipopolysaccharide Export Pathway in *Escherichia coli*: Structure, Organization and Regulated Assembly of the Lpt Machinery. *Marine Drugs*, 12(2), 1023–1042.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., & Sa, T. (2007). Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in planta conditions. *Research in Microbiology*, 158(3), 287–294.
- Posada, L. F., Álvarez, J. C., Romero-Tabarez, M., de-Bashan, L., & Villegas-Escobar, V. (2018). Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiological Research*, 217, 69–80.
- Pottosin, I., & Shabala, S. (2014). Polyamines control of cation transport across plant membranes: Implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation.
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653–663.
- Prell, J., Mulley, G., Haufe, F., White, J. P., Williams, A., Karunakaran, R., ... Poole, P. S. (2012). The PTSNtr system globally regulates ATP-dependent transporters in *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology*, 84(1), 117–129.

- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B., & Mercado-Blanco, J. (2011). Root Hairs Play a Key Role in the Endophytic Colonization of Olive Roots by *Pseudomonas* spp. with Biocontrol Activity. *Microbial Ecology*, 62(2), 435–445.
- Prunty, M. P., Noone, D., & Devine, K. M. (2018). The distinct PhoPR mediated responses to phosphate limitation in *Bacillus subtilis* subspecies *subtilis* and *spizizenii* stem from differences in wall teichoic acid composition and metabolism. *Molecular Microbiology*, 109(1), 23–40.
- Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2015). Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 210–216.
- Qiang-Sheng, W. U., Ying-Ning, Z. O. U., Min, L. I. U., & Cheng, K. (2012). Effects of exogenous putrescine on mycorrhiza, root system architecture, and physiological traits of *Glomus mosseae*-colonized trifoliolate orange seedlings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2), 80–85.
- Qu, L., She, P., Wang, Y., Liu, F., Zhang, D., Chen, L., Wu, Y. (2016). Effects of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 402–412.
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Plant Cell wall degrading and remodeling proteins: Current perspectives. *Biotecnología Aplicada*, 28(4), 194–215.
- Rabhi, N. E. H., Silini, A., Cherif-Silini, H., Yahiaoui, B., Lekired, A., Robineau, M., ... Sanchez, L. (2018). *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(6), 1836–1851.
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., & Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104(3), 321–330.
- Rahman, M. (2017). *Bacillus* spp.: A promising biocontrol agent of root, foliar, and postharvest diseases of plants. In *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 113–141).
- Rahman, M. S., Choi, Y. S., Kim, Y. K., Park, C., & Yoo, J. C. (2019). Production of Novel Polygalacturonase from *Bacillus paralicheniformis* CBS32 and Application to Depolymerization of Ramie Fiber.
- Rajkumar, M., Ma, Y., & Freitas, H. (2013). Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *Journal of Environmental Management*, 128, 973–980.
- Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N., & Joshi, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*.
- Ramón-Peréz, M. L., Díaz-Cedillo, F., Contreras-Rodríguez, A., Betanzos-Cabrera, G., Peralta, H., Rodríguez-Martínez, S., Cancino Diaz, J. C. (2015). Different sensitivity levels to norspermidine on biofilm formation in clinical and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. *Microbial Pathogenesis*, 79, 8–16.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380–1389.
- Ranjard, L., Poly, F., & Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. *Microbiology*, 151(3), 167–177.
- Rape, O., Gkarmiri, K., Mahmood, S., Ekblad, A., & Alström, S. (2017). crossm Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere, 83(22), 1 Reetha, S., Selvakumar, G., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., & Ravimycin, T. (2014). Screening of cellulase and pectinase by using

- Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences*, 8(2), 75–80–14.
- Rasool, S., Ahmad, A., Siddiqi, T. O., & Ahmad, P. (2013). Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*.
- Rauf, A., Imran, M., Patel, S., Muzaffar, R., & Bawazeer, S. S. (2017). Rutin: Exploitation of the flavonol for health and homeostasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Vol. 96, pp. 1559–1561.
- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017, September 1). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, Vol. 16, pp. 381–394.
- Reddy Sultanpuram, V., Mothe, T., Chintalapati, S., & Ramana Chintalapati, V. (2017). *Bacillus catenulatus* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from a soda lake. 199, 1391–1397.
- Reetha, S., Selvakumar, G., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., & Ravimycin, T. (2014). Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences*, 8(2), 75–80.
- Reetha, S., Selvakumar, G., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., & Ravimycin, T. (2014). Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences*, 8(2), 75–80.
- Reid, M. S. (1985). Ethylene and abscission. *HortScience*, 20(1), 45-50.
- Riaz, U., Kharal, M. A., Murtaza, G., & Zaman, Q. (2018). Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review Heavy metal Pollution View project Safe Use of Wastewater in Agriculture (SUWA). Article in *Pakistan Journal of Agricultural Research*.
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., & McNeill, A. M. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.
- Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S. M., & Triplett, E. W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*, 28(9), 829-836.
- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P. F., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2006). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant and Soil*, 287(1–2), 23–33.
- Rivera, D., Mora, V., Lopez, G., Rosas, S., Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Cassan, F. (2018). New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(6), 1774–1785. 0
- Robledo Garrido, M. (2010). Análisis molecular y funcional de la celulasa celc2 en la simbiosis rizobia-leguminosas. Tesis Doctoral.
- Robledo, M., Jimenez-Zurdo, J. I., Velazquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Pineiro, J. L., Ramirez-Bahena, M. H., Mateos, P. F. (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7064-7069.
- Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J. I., Rivas, R., Dazzo, F., Velázquez, E., Mateos, P. F. (2012). Role of Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11(1), 125.
- Robledo, Marta, Jiménez-Zurdo, J. I., Soto, M. J., Velázquez, E., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., & Mateos, P. F. (2011). Development of Functional Symbiotic White Clover Root Hairs and Nodules Requires Tightly Regulated Production of Rhizobial Cellulase CelC2. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 24(7), 798–807.

- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339.
- Romero, D., & Kolter, R. (2011). Will biofilm disassembly agents make it to market? *Trends in Microbiology*.
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology*, Vol. 23, pp. 545–557.
- Ruginescu, R., Cojoc, R., Enache, M., Environmental, V. (2018). Preliminary Characterization of a Cellulase Producing Bacterial Strain Isolated from a Romanian Hypersaline Lake. *Journal of Environmental Protection*, 9(10), 1066.
- Rütschlin, S., Gunesch, S., & Böttcher, T. (2018). One Enzyme to Build Them All: Ring-Size Engineered Siderophores Inhibit the Swarming Motility of *Vibrio*. *ACS Chemical Biology*, 13(5), 1153–1158.
- Rybakova, D., Mancinelli, R., Wikström, M., Birch-Jensen, A. S., Postma, J., Ehlers, R. U., ... Berg, G. (2017). The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens. *Microbiome*, 5(1), 104.
- Sabry, S. R. S., Saleh, S. A., Batchelor, C. A., Jones, J., Jotham, J., Webster, G., ... Cocking, E. C. (1997). Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1380), 341–346.
- Safronova, V. I., Stepanok, V. V., Engqvist, G. L., Alekseyev, Y. V., & Belimov, A. A. (2006). Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biology and Fertility of Soils*, 42(3), 267–272.
- Sagredo-Beltrán, J., De La Cruz-Rodríguez, Y., Alvarado-Rodríguez, M., Vega-Arreguín, J., Rodríguez-Guerra, R., Alvarado-Gutiérrez, A., & Fraire-Velázquez, S. (2018). Genome sequence of *Bacillus halotolerans* strain MS50- 18A with antifungal activity against phytopathogens, isolated from saline soil in San Luís Potosí, Mexico. *Genome Announcements*, 6(10).
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984-3999.
- Saïdi, S., Ramírez-Bahena, M.-H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., Velázquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 242–247.
- Sairam, R. K. (2004). *Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants Book in Current science*.
- Sajeed Ali, S., & Vidhale, N. (2013). Review Article Bacterial Siderophore and their Application: A review. In *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (Vol. 2).
- Saleem, A. R., Brunetti, C., Khalid, A., Rocca, G. Della, Raio, A., Emiliani, G., Centritto, M. (2018). Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. *PLoS ONE*, 13(2).
- Samanta, A. K., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., & Jayapal, N. (2011). A simple and efficient diffusion technique for assay of endo β -1, 4-xylanase activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1349-1353.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, Vol. 27, pp. 185–194.
- Sangeeth, K., Bhai, R. S., & Srinivasan, V. (2012). *Paenibacillus gluconolyticus*, a promising potassium solubilizing bacterium isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) rhizosphere.

- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, Vol. 183, pp. 92–99.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9275–9282.
- Sarhan, M. S., Hamza, M.A., Youssef, H.H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., Hegazi, N.A. (2019, September 1). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review. *Journal of Advanced Research*, Vol. 19, pp. 15–27.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.
- Saxena, S., Verma, J., Shikha, & Raj Modi, D. (2014). RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic variability. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 27–35.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- See-Too, W. S., Convey, P., Pearce, D. A., Lim, Y. L., Ee, R., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2016). Complete genome of *Planococcus rifietoensis* M8 T, a halotolerant and potentially plant growth promoting bacterium. *Journal of Biotechnology*, 221, 114–115.
- Sekula, B., Ruskowski, M., Malinska, M., & Dauter, Z. (2016). Structural investigations of N-carbamoylputrescine amidohydrolase from *Medicago truncatula*: Insights into the ultimate step of putrescine biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Seldin, L., Van Elsas, J. D., & Penido, E. G. C. (1984). *Bacillus azotofixans* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Species from Brazilian Soils and Grass Roots. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(4), 451–456.
- Sene, G., Samba-Mbaye, R., Thiao, M., Khasa, D., Kane, A., Manga, A., Sylla, S. N. (2012). The abundance and diversity of legume-nodulating rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungal communities in soil samples from deforested and man-made forest systems in a semiarid Sahel region in Senegal. *European Journal of Soil Biology*, 52, 30–40.
- Seneviratne, G., Weerasekara, M. L. M. A. W., Seneviratne, K.C.N., Zavahir, J. S., Kecskés, M. L., & Kennedy, I. R. (2010). Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action.
- Serna, M., Hernández, F., Coll, F., Coll, Y., & Amorós, A. (2013). Effects of brassinosteroid analogues on total phenols, antioxidant activity, sugars, organic acids and yield of field grown endive (*Cichorium endivia* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1765–1771.
- Seyis Bilkay, I., Karakoç, Ş., & Aksöz, N. (2010). Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. *Turkish Journal of Biology*, 34(3), 313-318.
- Shaharoon, B., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 42(2), 155–159.
- Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia horticulturae*, 78(1-4), 5-38.
- Sharma, D. K., Dubey, A. K., Srivastav, M., Singh, A. K., Pandey, R. N., & Dahuja, A. (2013). Effect of paclobutrazol and putrescine on antioxidant enzymes activity and nutrients content in salt tolerant citrus rootstock sour orange under sodium chloride stress. *Journal of Plant Nutrition*, 36(11), 1765–1779.

- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, Vol. 2.
- Shen, F., Zhu, T., Teng, M., Chen, Y., Liu, M., Hu, F., & Li, H. (2016). [Effects of interaction between vermicompost and probiotics on soil nronerty, yield and quality of tomato]. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology, 27(2), 484–490.
- Shen, Z., Ruan, Y., Xue, C., Zhong, S., Li, R., & Shen, Q. (2015). Soils naturally suppressive to banana Fusarium wilt disease harbor unique bacterial communities. Plant and Soil, 393(1–2), 21–33.
- Sheng, X. F., Xia, J. J., Jiang, C. Y., He, L. Y., & Qian, M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. Environmental Pollution, 156(3), 1164–1170.
- Si, X., Quan, X., Li, Q., & Wu, Y. (2014). Effects of d-amino acids and norspermidine on the disassembly of large, old-aged microbial aggregates. Water Research, 54, 247–253.
- Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., Yim, W. jong, & Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annum L.*) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. Plant Physiology and Biochemistry, 49(4), 427–434.
- Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Chesson, A. (2019). Safety evaluation of the food enzyme xylanase from *Bacillus pumilus* (strain BLXSC). EFSA Journal, 17(11).
- Silva, F., & Domingues, F. C. (2017). Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(1), 35–47.
- Silva, L. R., Azevedo, J., Pereira, M. J., Carro, L., Velazquez, E., Peix, A., Andrade, P. B. (2014). Inoculation of the nonlegume *Capsicum annum L.* with *Rhizobium* strains. 2. changes in sterols, triterpenes, fatty acids, and volatile compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Simon, R., Priefer, U., Bio/technology, A. P. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/technology, 1(9), 784.
- Singh, A., Maurya, S., Singh, R., & Singh, U. P. (2012). Antibiotic potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against *Sclerotium rolfsii*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 45(14), 1655–1662.
- Singh, N., Singh, G., Aggarwal, N., & Khanna, V. (2018). Yield enhancement and phosphorus economy in lentil (*Lens culinaris Medikus*) with integrated use of phosphorus, *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Plant Nutrition, 41(6), 737–748.
- Singh, R. K., Singh, V., Vivekananda, M., Krishi, P., Sansthan, A., & Meena, R. K. (n.d.). Can we use Maize (*Zea mays*) *Rhizobacteria* as Plant Growth Promoter? Agriculturally important microbes (AIMs) for sustainable agriculture View project National Mission on Himalayan Studies (NMHS).
- Singh, S., & Kapoor, K. K. (1999). Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. Biology and Fertility of Soils, 28(2), 139–144.
- Singh, V., Gupta, G., Singh Parihar, S., Kumar Ahirwar, N., & Kumar Snehi, S. (2015). Plant Growth Promoting *Rhizobacteria* (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. J Microb Biochem Technol, 7(2), 96–102.
- Smit, G., Kijne, J. W., Lugtenberg, B. J. J., Smit, G., Kijne, J. W., Lugtenberg, B. J. J., & Bacteriol, J. (1987). Involvement of both Cellulose Fibrils and a Ca²⁺-Dependent Adhesin in the Attachment of *Rhizobium leguminosarum* to Pea Root Hair Tips. In JOURNAL OF BACTERIOLOGY.

- Sohail, M., & Latif, Z. (2016). Phylogenetic analysis of polygalacturonase-producing *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from plant waste material. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(1).
- Sokolova, M. G., Akimova, G. P., & Vaishlya, O. B. (2011). Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3), 274–278.
- Spaepen, S. (2015). Plant hormones produced by microbes. In *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 247–256).
- Spaepen, S., Das, F., Luyten, E., Michiels, J., & Vanderleyden, J. (2009). Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512: Research Letter. *FEMS Microbiology Letters*, 291(2), 195–200.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Stanojković-sebić, A., Pivić, R., Dinić, Z., Ilić, R., Latković, D., & Jošić, D. (2018). Effect of indigenous *pseudomonas* sp. and *bacillus* sp. strains on yield and main chemical growth parameters of radicchio. *The Serbian Journal of Agricultural Sciences*, 67(1), 20–26.
- Stout, V. (1996). Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 178(14), 4273–4280.
- Subasinghe, R. (2017). Investigation of Host Cell Wall Degrading Strategies of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa). Tesis Doctoral
- Sugiyama, A., & Yazaki, K. (2014). Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnology*, 31(5), 431–443.
- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B. M., & Mirza, M. S. (2018). Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PLOS ONE*, 13(9), e0204408.
- Sun, J., Wang, Q., Jiang, Y., Wen, Z., Yang, L., Wu, J., & Yang, S. (2018). Genome editing and transcriptional repression in *Pseudomonas putida* KT2440 via the type II CRISPR system. *Microbial Cell Factories*, 17, 41.
- Taktek, S., Trépanier, M., Servin, P. M., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J. A., & Antoun, H. (2015). Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 1-9.
- Talamantes, D., Biabini, N., Dang, H., Abdoun, K., & Berlemont, R. (2016). Natural diversity of cellulases, xylanases, and chitinases in bacteria. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 133.
- Tamilselvi, S. M., Thiyagarajan, C., & Uthandi, S. (2016). Calcite dissolution by *brevibacterium* sp. SOTI06: A futuristic approach for the reclamation of calcareous sodic soils. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Tan, M. S. F., White, A. P., Rahman, S., & Dykes, G. A. (2016). Role of Fimbriae, Flagella and Cellulose on the Attachment of *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 to Plant Cell Wall Models. *PLOS ONE*, 11(6), e0158311.
- Tang, L., Mao, B., Li, Y., Lv, Q., Zhang, L., Chen, C., Zhao, B. (2017). Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports*, 7(1).
- Tang, T. H., Bachellerie, J. P., Rozhdestvensky, T., Bortolin, M. L., Huber, H., Drungowski, M., & Hüttenhofer, A. (2002). Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7536-7541.
- Tanimoto, E. (2005). Regulation of root growth by plant hormones - Roles for auxin and gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 24, pp. 249–265.

- Tapase, S. R., Mawlankar, R. B., Sundharam, S. S., Krishnamurthi, S., Dastager, S. G., & Kodam, K. M. (2017). *Microvirga indica* sp. Nov., an arsenite-oxidizing Alphaproteobacterium, isolated from metal industry waste soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3525–3531.
- Teixeira, M. F. S., Lima Filho, J. L., & Durán, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 286–290.
- Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W. J., & Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod - Box NB15 Modulate Expression of the γ wEFG Locus That Is Required for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W. J., & Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, No. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(10), 1153–1161.
- Thokchom, E., Thakuria, D., Kalita, M. C., Sharma, C. K., & Talukdar, N. C. (2017). Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. *European Journal of Soil Biology*, 79, 48–56.
- Tian, Y., Zeng, T., Tan, L., Wu, Y., Yu, J., Huang, J., & Pei, Z. (2018). BPI-ANCA in chronic obstructive pulmonary disease with pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* colonisation: a novel indicator of poor prognosis. *British Journal of Biomedical Science*, 75(4), 206–208.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2013). Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 15(6), 971–981.
- Tsurumaru, H., Okubo, T., Okazaki, K., Hashimoto, M., Kakizaki, K., Hanzawa, E., ... Minamisawa, K. (2015). Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes and Environments*, 30(1), 63–69.
- Tudzynski, B., Studt, L., & Rojas, M. C. (2018). Gibberellins in fungi, bacteria and lower plants: biosynthesis, function and evolution. *Annual Plant Reviews online*, 121-151.
- Turan, M., Ekinci, M., Yildirim, E., Güneş, A., Karagöz, K., Kotan, R., & Dursun, A. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*.
- Ude, S., Arnold, D. L., Moon, C. D., Timms-Wilson, T., & Spiers, A. J. (2006). Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environmental Microbiology*, 8(11), 1997–2011.
- Ullman, W. J., Kirchman, D. L., Welch, S. A., & Vandevivere, P. (1996). Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology*, 132(1-4), 11-17.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., & Singh, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- Urbanova, T., & Leubner-Metzger, G. (2018). Gibberellins and Seed Germination. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 253–284).
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews. Genetics*, 11(9), 636–646.
- Valetti, L., Iriarte, L., & Fabra, A. (2018). Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 132, 1–10.
- Valverde, A., Fterich, A., Mahdhi, M., Ramírez-Bahena, M. H., Caviedes, M. A., Mars, M., Rodríguez-Llorente, I. D. (2010). *Paenibacillus prosopidis* sp. nov., isolated from the nodules of *Prosopis farcta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2182–2186.

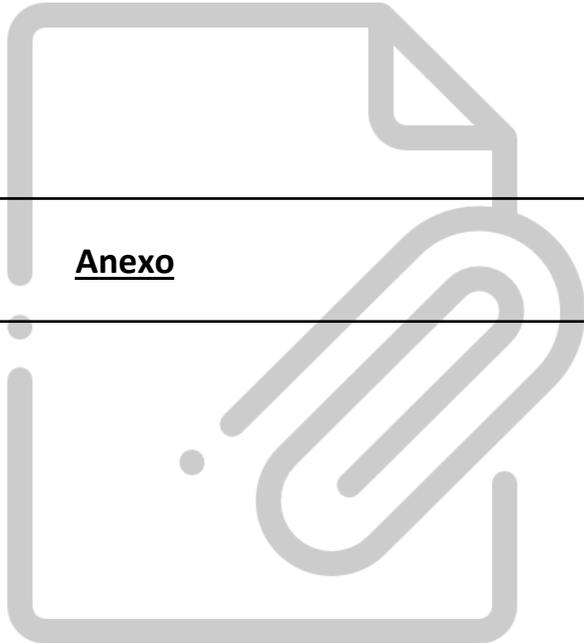
- Van Berkum, P., Beyene, D., & Eardly, B. D. (1996). Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 240–244.
- Vassilev, N., & Vassileva, M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 61, pp. 435–440.
- Velmourougane, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017, July 1). Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 57, pp. 548–573.
- Vilas, J. M., Romero, F. M., Rossi, F. R., Marina, M., Maiale, S. J., Calzadilla, P. I., ... Gárriz, A. (2018). Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Physiology*, 231, 281–290.
- Villadas, P. J., Lasa, A. V., Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Fernández-López, M. (2017). Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 92–101.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... Lorito, M. (2014). *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1), 127–139.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- VINCENT, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria.
- Wagh, J., Shah, S., Bhandari, P., Archana, G., & Kumar, G. N. (2014). Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 5117–5129.
- Walker, S. A., & Downie, J. A. (2000). Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires nodO or nodE. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(7), 754–762.
- Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News*, 532(7599), 293.
- Wanasundara, J. P. D. (2011). Proteins of Brassicaceae oilseeds and their potential as a plant protein source. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 635–677.
- Wang, F., Yang, L., Deng, J., Liu, X., Lu, Y., Chen, W., & Wu, J. (2019). *Microvirga calopogonii* sp. nov., a novel alphaproteobacterium isolated from a root nodule of *Calopogonium mucunoides* in Southwest China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 5.
- Wang, M., Li, S., Chen, S., Meng, N., Li, X., Zheng, H., & Wang, D. (2019). Manipulation of the rhizosphere bacterial community by biofertilizers is associated with mitigation of cadmium phytotoxicity. *Science of The Total Environment*, 649, 413-421.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9), 947–951.
- Wanner, B. L., & Chang, B. D. (1987). The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5569–5574.
- Warwate, S. I., Kandoliya, U. K., Bhadja, N. V., & Golakiya, B. A. (2017). The effect of seed priming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) seedling. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(3), 1926-1934.

- Weber, N. F., Herrmann, I., Hochholdinger, F., Ludewig, U., & Neumann, G. (2018). PGPR-induced growth stimulation and nutrient acquisition in maize: do root hairs matter?. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 49(3), 164-172.
- Wencewicz, T. (2013). Biscatecholate–monohydroxamate mixed ligand siderophore–carbacephalosporin conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Acinetobacter*. ACS Publications.
- Wencewicz, T. A., Long, T. E., Möllmann, U., & Miller, M. J. (2013). Trihydroxamate siderophore-fluoroquinolone conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Staphylococcus aureus*. *Bioconjugate Chemistry*, 24(3), 473–486.
- Weon, H. Y., Kwon, S. W., Son, J. A., Jo, E. H., Kim, S. J., Kim, Y. S., Ka, J. O. (2010). Description of *Microvirga aerophila* sp. nov. and *Microvirga aerolata* sp. nov., isolated from air, reclassification of *Balneimonas flocculans* Takeda et al. 2004 as *Microvirga flocculans* comb. nov. and emended description of the genus *Microvirga*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(11), 2596–2600.
- Wijman, J. G. E., De Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1481-1488.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274-276.
- Wilson, D. B. (2011, June). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 14, pp. 259–263.
- Winkelmann, G. (2007). Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals*, 20(3–4), 379–392.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Wöhler, I. (1997). Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiological Research*, 152(4), 399–405.
- Wongsa, P., Khampa, N., Horadee, S., Chaiwarith, J., & Rattanapanone, N. (2019). Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. *Food Chemistry*.
- Wood, P. J., Erfle, J. D., & Teather, R. M. (1988). Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases. *Methods in Enzymology*, 160(C), 59–74.
- Wortham, B. W., Oliveira, M. A., & Patel, C. N. (2007). Polyamines in bacteria: Pleiotropic effects yet specific mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 603, 106–115.
- Wu, Q. S., Zou, Y. N., Peng, Y. H., & Liu, C. Y. (2011). Root morphological modification of mycorrhizal citrus (*Citrus tangerine*) seedlings after application with exogenous polyamines. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(1), 20-25.
- Wu, Q. S., Zou, Y. N., Peng, Y. H., & Liu, C. Y. (2011). Root morphological modification of mycorrhizal citrus (*Citrus tangerine*) seedlings after application with exogenous polyamines. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(1), 20-25.
- Xiao, A. W., Li, Z., Li, W. C., & Ye, Z. H. (2020). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on arsenic accumulation and the growth of rice plants (*Oryza sativa* L.). *Chemosphere*, 242, 125136.

- Xiao, Z., Zhang, C., Tang, F., Yang, B., Zhang, L., Liu, J., Li, N. (2019). Identification of candidate genes controlling oil content by combination of genome-wide association and transcriptome analysis in the oilseed crop *Brassica napus*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1).
- Xu, G. W., & Gross, D. C. (1986). Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology*, 76(4), 414-422.
- Xu, R., Yang, Y., Qin, R., Li, H., Qiu, C., Li, L., & Yang, J. (2016). Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of genetics and genomics*, 43(8), 529.
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7564–7569.
- Yang, H. Y., Wu, H., Wang, X. F., Cui, Z. J., & Li, Y. H. (2011). Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. *Bioresource Technology*.
- Yang, H., Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2017). Substrate utilization by endophytic bacteria *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R that may facilitate bacterial entrance and survival inside diverse plant hosts. *FACETS*, 2(1), 120–130.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155–189.
- Yang, X., Wei, S., Liu, B., Guo, D., Zheng, B., Feng, L., Huang, D. (2018). A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa*. L) varieties. *Horticulture Research*, 5(1).
- Yi, Y., Li, Z., Song, C., & Kuipers, O. P. (2018). Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system. *Environmental Microbiology*, 20(12), 4245–4260.
- Yigit, F., & Dikilitas, M. (2007). Control of fusarium wilt of tomato by combination of fluorescent *Pseudomonas*, non-pathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T-22 in greenhouse conditions. *Plant Pathology Journal*, 6(2), 159-163.
- Yildirim, E., Turan, M., Dursun, A., Ekinci, M., Kul, R., Karagoz, F. P., Kitir, N. (2016). Integrated Use of Nitrogen Fertilization and Microbial Inoculation: Change in the Growth and Chemical Composition of White Cabbage. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(19), 2245–2260.
- Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., & Murata, K. (2011). *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 932–938.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613.
- Yoon, Y. E., Kuppasamy, S., Cho, K. M., Kim, P. J., Kwack, Y. B., & Lee, Y. B. (2017). Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). *Food chemistry*, 215, 185-192.
- Yu, J., Yu, Z. H., Fan, G. Q., Wang, G. H., & Liu, X. B. (2016). Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Producing Root Endophytic Bacteria and Their Potential for Promoting Crop Growth. In *J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 18).

- Yu, S., Teng, C., Bai, X., Liang, J., Song, T., Dong, L., Qu, J. (2017). Optimization of Siderophore Production by *Bacillus* sp. PZ-1 and Its Potential Enhancement of Phytoextraction of Pb from Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1500–1512.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138–145.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., & Mao, C. (2011). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils*.
- Zafar-ul-Hye, M., Danish, S., Abbas, M., Ahmad, M., & Munir, T. M. (2019). ACC Deaminase Producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with Biochar Improve Wheat Productivity under Drought Stress. *Agronomy*, 9(7), 343.
- Zapata, S., Piedrahita, A. M., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*, 16(1), 25-36.
- Zeng, N., Zhao, F., Collatz, G. J., Kalnay, E., Salawitch, R. J., West, T. O., & Guanter, L. (2014). Agricultural Green Revolution as a driver of increasing atmospheric CO₂ seasonal amplitude. *Nature*, 515(7527), 394–397.
- Zhang, A., Zhao, G., Gao, T., Wang, W., Li, J., Zhang, S., & Zhu, B. (2013). Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: A soil microorganism with biological control potential. *African Journal of Microbiology Research*, 7(1), 41–47.
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B. H. (2017). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, Vol. 10, pp. 5–24.
- Zhang, X. J., Zhang, J., Yao, Q., Feng, G. Da, & Zhu, H. H. (2019). *Microvirga flavescens* sp. Nov., a novel bacterium isolated from forest soil and emended description of the genus *Microvirga*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(3), 667–671.
- Zhang, Y. feng, He, L. yan, Chen, Z. jin, Wang, Q. ya, Qian, M., & Sheng, X. fang. (2011). Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 83(1), 57–62.
- Zhang, Y., Gao, X., Shen, Z., Zhu, C., Jiao, Z., Li, R., & Shen, Q. (2019). Pre-colonization of PGPR triggers rhizosphere microbiota succession associated with crop yield enhancement. *Plant and Soil*, 439(1–2), 553–567.
- Zhang, Y., Sederoff, R. R., & Allona, I. (2000). Differential expression of genes encoding cell wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees. *Tree Physiology*, 20(7), 457–466.
- Zhou, C., Zhu, L., Ma, Z., & Wang, J. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* SAY09 increases cadmium resistance in plants by activation of auxin-mediated signaling pathways. *Genes*, 8(7).
- Zouari, I., Jlaiel, L., Tounsi, S., & Trigui, M. (2016). Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. *Biological control*, 100, 54-62.
- Zuan Tan, K., Tan, K. Z., Radziah, O., Khairuddin, A. R., & Shamsuddin, Z. H. (2015). Assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and rhizobia as multi-strain biofertilizer on growth and N₂ fixation of rice plant. In *AJCS* (Vol. 9).
- Zuo, Y., & Zhang, F. (2011). Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant and Soil*, Vol. 339, pp. 83–95.

Anexo



Anexo I: Composiciones de los medios de cultivo y soluciones utilizadas.

Tabla 2: Composición del medio YMA.

Medio YMA (Yeast Manitol Agar)	g/L
KH ₂ PO ₄ (Fluka®)	0.5
MgSO ₄ (Fluka®)	0.2
NaCl (Fluka®)	0.1
Manitol (Fluka®)	10.0
Extracto de levadura (Difco™)	0.2
Agar (Conda™)	20.0
Agua destilada	1 L

Tabla 3: Composición del medio TSA.

Medio TSA (Tryptic Soy Agar)	g/l
Digerido pancreático de caseína	15.0
Digerido papínico de soja	5.0
NaCl (Fluka®)	5.0
Agar (Conda™)	20.0
Agua destilada	1 l

Tabla 4: Composición de los medios 869 y 869 - 1/10.

Medio 869 y 869 1/10	869 (g/L)	869 - 1/10 (g/L)
Triptona (Difco™)	10	1
Extracto de levadura (Difco™)	5	0.5
NaCl (Fluka®)	5	0.5
D-glucosa (Sigma®)	1	0.1
CaCl ₂ (Codex®)	0.345	0.035
Agar (Conda™)	20	20
Agua destilada	1L	1L

Tabla 5: Composición de la solución III.

Solución III	g/mL
Sacarosa (Panreac®)	2.0
Manitol (Fluka®)	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Panreac®)	493.0
CaCl ₂ (Codex®)	11.0
MnSO ₄ ·H ₂ O (Panreac®)	1.17
H ₃ BO ₃ (Panreac®)	1.4
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Panreac®)	0.04
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Panreac®)	1.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (Panreac®)	1.0

Tabla 6: Composición del medio JMM.

Medio JMM	Cantidad
K ₂ HPO ₄ (Panreac®)	0.006 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Panreac®)	0.004 g
NaCl (Panreac®)	0.002 g
Elementos traza (Tabla x)	2 µL
Solución de vitaminas (tabla X)	8 µL
Glucosa (Panreac®)	0.04 g
Manitol (Fluka™)	0.08 g
Piruvato sódico (Sigma®)	0.08 g
H ₂ O	10 mL

Tabla 7: Composición de la solución de elementos traza.

Solución elementos traza	mg/L
H ₃ BO ₃	145.0
FeSO ₄ ·H ₂ O	125.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	59.0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	108.0
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	125.0

Tabla 8: Composición de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	g/L
Riboflavina	20.0
Ácido P-amino benzoico	20.0
Ácido nicotínico	20.0
Biotina	20.0
Tiamina-HCl	20.0
Piridoxina-HCl	20.0
Pantonetato cálcico	20.0
Inositol	20.0

Tabla 9: Composición del medio TY.

Medio TY (Tryptone Yeast)	g/L
Cl ₂ Ca (Codex™)	0.9
Extracto de levadura (Difco™)	3.0
Triptona (Difco™)	5.0
Agar (Conda™)	20.0
Agua destilada	1 L

Tabla 10: Composición del medio M9.

Medio M9	mL/L
M9 salt solution (Na ₂ HPO ₄ 33.7 mM; KH ₂ PO ₄ 22.0 mM; NaCl 8.55 mM; NH ₄ Cl 9.35 mM)	100
Cl ₂ Ca 1M (Codex™)	0.3
MgSO ₄ 1M (Fluka®)	1
N-acetilglutamato (Sigma®) (200 g/L)	20
Biotina (1mg/mL) (Sigma®)	1
Tiamina (1mg/mL) (Sigma®)	1
Elementos traza (100X)	10

Tabla 12: Composición del medio LB.

Luria Bertani (LB)	g/L
Triptona-Peptona (Difco™)	10.0
Extracto de levadura (Difco™)	5.0
NaCl (Fluka®)	10.0
Agar (Conda™)	20.0
Agua destilada	1 L

Tabla 18: Composición del medio mínimo.

Medio mínimo	g/l
KH ₂ PO ₄ (Fluka®)	0.3
K ₂ HPO ₄ (Fluka®)	0.3
MgSO ₄ (Fluka®)	0.15
Cl ₂ Ca (Codex™)	0.05
NaCl (Fluka®)	0.1
NH ₄ NO ₃ (Panreac®)	0.1
Manitol (Prolabo)	0.1
Agar (Conda™)	20.0
Agua destilada	1 L

El medio mínimo se ajustó con KH₂PO₄ y K₂HPO₄ a pH 7.0. Después de su esterilización se agregaron las cantidades necesarias de elementos traza (tabla 7) y solución de vitaminas (tabla 8).

